



Universidad Central De Venezuela
Facultad De Ciencias
Escuela De Biología
Departamento De Biología Celular



**ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS LINFOCITOS TCD8 Y Treg EN
EL ESTABLECIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR
FRENTE A LA VACUNA BCG EN NIÑOS INFECTADOS CON
VIH BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela por el bachiller
Eduardo Aníbal Navarro Sánchez
como requisito para optar al título de
Licenciado en Biología**

**Tutor:
Dr. Miguel A. Alfonzo Díaz**

**Asesor Académico:
Guillermina Alonzo**

Caracas, Venezuela

Octubre, 2014

DEDICATORIA

"A mis padres y a Teodocía Sánchez, sin ustedes esto no podría ser posible, ni imaginable."

"Las matemáticas son el alfabeto con el cual Dios ha escrito el universo" Galileo Galilei (1564-1642)

RESUMEN

El blanco primario del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) son las células TCD4 que exhiben alteraciones cuantitativas y cualitativas; no obstante, el deterioro de la inmunidad mediada por células es multifactorial e incluye además la actividad alterada de células TCD8 y de células presentadoras de antígeno. En años recientes se ha demostrado que las células T reguladoras (Treg) tienen un papel importante en la modulación de la respuesta específica al VIH, así como en la patogénesis de esta infección. En la actualidad, la infección por el VIH es uno de los mayores problemas de salud pública. ONUSIDA estimó para el año 2012 que en todo el mundo existen 35,3 millones de personas infectadas, de los cuales 3,3 millones correspondían a niños menores de 15 años. Al menos un tercio de las personas con VIH están infectadas por el bacilo de la tuberculosis (TB), y corren un riesgo mucho mayor de padecer la TB activa. Ambas infecciones ejercen un sinergismo que generalmente es mortal. El efecto devastante de la epidemia del VIH ha tenido el mayor impacto sobre poblaciones con alta prevalencia de infección por *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y, esto ha tenido un profundo efecto en la epidemia de la TB.

Con el advenimiento de la terapia antirretroviral de alta eficiencia (TAAE) ha cambiado la historia natural de la infección VIH/SIDA, al retardar la evolución de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los individuos infectados. El tratamiento en el niño, es difícil por la no disponibilidad de presentaciones pediátricas en todas las drogas antirretrovirales. Sin embargo, este tratamiento no logra eliminar por completo el virus en el individuo infectado, además la información que se tiene del efecto de TAAE en el establecimiento de la respuesta inmune frente a *M. tuberculosis* en niños infectados por VIH vacunados con BCG es muy escasa. Es por ello que en este trabajo nos propusimos estudiar si los niños VIH⁺ cuando son tratados con el TAAE, son capaces de desarrollar una respuesta de inmunización al ser vacunados con la BCG, mediante la realización de ensayos *ex vivo* e *in vitro* en la subpoblación de linfocitos TCD8, así como también estudiar el papel que juegan las células Treg en este proceso de inmunización. Para ello procedimos a determinar el número de células TCD4 y TCD8 (Totales, vírgenes y memoria) sanguíneas, la

frecuencia *ex vivo* de apoptosis en células TCD8, como también la expresión *ex vivo* de moléculas (Fas, PD-1, IL-7r) en estas células. Para el estudio de los efectos de los linfocitos Treg sobre la funcionalidad *in vitro* de los linfocitos TCD8 utilizamos un protocolo novel de purificación de estas células reguladoras y realizamos cultivos de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) en presencia o ausencia de Treg autólogas y finalmente estudiamos la producción de citocinas Th1 y Th2 en plasma y sobrenadantes de cultivos de CMSP.

Nuestros resultados sugieren que la infección por el VIH genera un incremento de las subpoblaciones de células TCD8 totales y memoria en sangre, y un descenso en la cantidad de células TCD8 vírgenes, asimismo observamos que la administración de TAAE promueve la estabilización de los valores de las subpoblaciones total y memoria, y un aumento relativo de la cantidad de linfocitos TCD8 vírgenes, así como la disminución significativa de la carga viral. Los linfocitos TCD4, por su parte presentaron una marcada disminución en las subpoblaciones total, vírgenes y memoria a causa de la infección, sin embargo, observamos recuperación parcial en corto tiempo en estas subpoblaciones una vez iniciado el TAAE. Por otra parte, encontramos que la administración del TAAE induce una lenta disminución en la tasa de apoptosis de las células TCD8, presumiblemente, producto de la normalización parcial de la expresión de las moléculas asociadas a este proceso. Nuestros resultados indican que la actividad efectora de los linfocitos TCD8 se ve alterada en los niños infectados, afectando la actividad proliferativa y de síntesis de perforina en esta subpoblación. Sin embargo, el TAAE logra recuperar en cierta medida estas funciones inmunológicas encontrándose una respuesta efectora en presencia de la vacuna BCG. De igual forma, observamos que el TAAE normalizó progresivamente la producción de IL-6, IL-10 y TNF- α , relacionándose con la normalización de otros parámetros fenotípicos y efectores de los linfocitos TCD8 estudiados. En síntesis, nuestro trabajo sugiere que la administración de la vacuna BCG en combinación con una oportuna administración del TAAE, podría incrementar la posibilidad efectiva del establecimiento de protección inmunológica a largo plazo frente a *M. tuberculosis* en niños infectados por el VIH.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a esa fuerza promotora que algunos llaman Dios, Jah, Yave, Fuerza Universal, El Todo o como yo la llamo: “Sistema de Ondas Energéticas Perfectamente Ordenadas” por darme existencia y vida, lo único necesario para hacer cumplir nuestras metas.

A mi Yeya, Teodocia Sánchez, mi abuela, mi madre, mi amiga, confidente, guía y referencia en todo lo que hago en mi vida, ojala estuvieras conmigo para compartir este logro que es tan mío como tuyo. A mi mamá, Lucía Sánchez, por darme alas, pasión, compromiso, ganas de seguir, pero por sobre todas las cosas por ser quien es en mi vida, mi amor incondicional. A mi papá, Eduardo Navarro, quien con su forma de ser, su carácter y su filosofía única, me enseñó esa forma tan suya de ver al mundo. A Marcos Sembergman, mi amigo y mentor, a quien debo mucha de esa hambre de conocimiento con la que me regocijo día a día. A mi tío Omar Sánchez, quien es modelo del hombre que quiero llegar a ser, por su sapiencia, consejo oportuno, conocimiento basto y calidad humana inmensas, gracias por ser “el tío más Grande del Mundo”.

Al Doctor Miguel Alfonzo, quien me brindo el honor de guiarme en esta etapa de mi vida, a él agradezco conocimiento, guía, sensatez, y sobre todo paciencia, muchas gracias doctor. A mis compañeros del laboratorio de Inmunofisiología de la escuela de Medicina J. M. Vargas, una familia que siempre llevare conmigo, a Ydelis Fuentes, guía y maestra en esos primeros pasos en el laboratorio, a Abelardo Carrero, compañero y amigo que encamino mis pasos al laboratorio, al Doctor Edwin Escobar, amigo invaluable, de palabra, guía y gestos oportunos, y en especial a Wolfgang Vivas, más que un amigo, un hermano de laboratorio, sin ustedes no lo hubiera logrado.

A todos mis profesores de carrera, quienes día a día nos bridan su alma en sus enseñanzas dentro y fuera del aula, quienes sumado al conocimiento me enseñaron a querer buscarlo y hacerlo mío, en especial a la profesora Laura “Lauryn” Delgado, mi madre académica, quien con sus palabras oportunas me llevaron a donde hoy me encuentro.

A todas las personas del Instituto de Biomedicina del Hospital J. M. Vargas, su conocimiento, apoyo y experiencias son invaluable. Igualmente a todas las personas que laboran en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del J. M. de Los Ríos, muy especialmente a las Doctoras Luigina Siciliano y María Graciela López, quienes nos brindaron su apoyo y conocimiento desde el comienzo. A todas las personas que trabajan en el Complejo Cultural Teatro Teresa Carreño, el tiempo que pase allí fue de incalculable valor.

A todos mis compañeros de la Facultad de Ciencias de la U.C.V. quienes me han acompañado todo este tiempo y me han brindado tanta alegría y apoyo: Selene, Katy,

Dennis, Olga, Nelson, Javier, Carlos, Maga, Miguel, Cho y tantos otros que se me va un libro entero en nombrar.

A mis hermanos de vida, Ernesto “mi Compa” Chacon, Alfonso “Fonsito” Licir, Dario “coco” Justo, Andres “Andrecho” Sequea, Johnatan “El capi” Loaiza, Gabriela “Sakura” Guzman, Karina “mi kary” Fernández, Sharif “Cotoco” Sánchez, Omar “Nuno” Sánchez, Sumaya “Sumi” Sánchez mis hermanos de vida, más allá de la sangre, quienes con su apoyo incondicional me han ayudado a mantener el paso, lento pero firme en la vida.

A Isamar Guevara, “mi Aurora Boreal” quien ha sido y es mi par en este camino, quien me ha brindado consejo, cariño, apoyo, presencia, conocimiento, amor, fuerza y constancia incondicional y con quien me alimento para seguir día a día.

A la música, mi cama de estudios y pensamiento, mi motor de arranque y mi centro de paz.

Y finalmente a la Universidad Central de Venezuela, la casa que vence las sombras, y en especial a la Facultad de Ciencias, mi segundo hogar, y más que academia, escuela de vida, en donde desde el primer día y por siempre conseguí mi gentilicio, Ucevista.

INDICE DE CONTENIDO

I.- INTRODUCCIÓN.....	7
II.- MARCO TEORICO.....	8
1.- Los linfocitos TCD8	8
1.1.- Fenotipo de los linfocitos TCD8.....	9
1.2.- La respuesta inmune frente a la infección viral.	11
2.- Los linfocitos T reguladores (Treg).	14
2.1.- Los linfocitos T reguladores en la infección por VIH.	16
3.- El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	18
3.1.- Estructura del VIH.	18
3.2.- Epidemiología de la infección por VIH.	20
3.3.- Ciclo de replicación del VIH.	22
3.4.- La respuesta inmune contra el VIH.	26
3.5.- La inmunopatología de la infección por el VIH	30
3.6.- La infección del VIH en niños.	32
3.7.- El Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia.	34
4.- La Tuberculosis.	35
4.1.- Ciclo de vida de <i>M. tuberculosis</i>	36
4.2.- La inmunopatología de la Tuberculosis.....	37
4.3.- La Vacuna BCG.	39
4.4.- La co-infección Tuberculosis/VIH.....	40
III.- OBJETIVOS.....	43
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS:	44
4.1.- Grupo de estudio	44
4.2.- Ensayos ex vivo.	45
4.2.1.-Medición ex vivo del receptor Fas en linfocitos TCD8.....	46

4.2.2.- Medición <i>ex vivo</i> del receptor PD-1 en linfocitos TCD8	47
4.2.3. Medición <i>ex vivo</i> de la molécula de superficie CD127 en linfocitos TCD8	47
4.2.4.- Medición <i>ex vivo</i> de la apoptosis en linfocitos TCD8	48
4.3. - Ensayos <i>in vitro</i>	48
4.3.1. - Purificación de linfocitos T reguladores de sangre periférica.	48
4.4. -Cultivo de las CMSP y linfocitos T reguladores	51
4.4.1. - Determinación de la proliferación celular de linfocitos TCD8.....	52
4.4.2.- Medición <i>in vitro</i> de Perforina intracelular de células TCD8	53
4.5.-Determinación <i>in vitro</i> de citocinas Th1 y Th2 de plasma y sobrenadantes de CMSP en cultivo.....	53
4.6. -Análisis Estadístico.....	54
VI. - RESULTADOS	54
Ensayos <i>ex vivo</i>	56
MEDICION DE SUBPOBLACIONES TCD4 Y TCD8.	57
Ensayos <i>in vitro</i>	70
PRODUCCION DE CITOCINAS Th1/Th2.	75
VII. -DISCUSIÓN	87
VIII. - CONCLUSIONES	110
IX. -BIBLIOGRAFIA	111
X. - ANEXOS	128

INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1. Interacción molecular entre las células dendríticas y los linfocitos TCD8.	9
Fig. 2. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	19
Fig. 3. Distribución de la epidemia por VIH en el mundo.....	21
Fig. 4. Esquema del ciclo de replicación del VIH.....	23
Fig. 5. Mecanismos efectores de los linfocitos TCD8 y sitios de acción del VIH en su activación. 29	
Fig. 6. Curso de desarrollo de la infección por VIH en pacientes sin tratamiento antirretroviral.31	

Fig. 7. Esquema de desarrollo del protocolo de ensayos ex vivo e in vitro	44
Fig. 8. Carga Viral de los Niños Infectados vs Tiempo de tratamiento.....	56
Fig. 9. N° total de células de las subpoblaciones linfocitarias TCD4 y TCD8 en sangre periférica vs tiempo de tratamiento.	58
Fig. 10. Porcentaje de Linfocitos TCD4 totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) en sangre periférica vs tiempo de tratamiento.....	58
Fig. 11. Porcentaje de Linfocitos TCD8 totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) en sangre periférica vs tiempo de tratamiento.	60
Fig. 12. Relación entre Linfocitos TCD4 y TCD8 vs el tiempo.	61
Fig. 13. Células Treg vs tiempo de tratamiento.	62
Fig. 14. Expresión de la Molécula Fas en Linfocitos TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento.	63
Fig. 15. Expresión de la Molécula PD-1 en células TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento.	64
Fig. 16. Expresión de la Molécula CD127 en células TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento.	65
Fig. 17. Frecuencia de Apoptosis en células TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento..	66
Fig. 18. Purificación de linfocitos T reguladores de niños infectados y grupo control.	68
Fig. 19. Purificación de linfocitos T reguladores.	69
Fig. 20. Proliferación de linfocitos TCD8 in vitro mediante la medición de incorporación de BrdU intracelular vs tiempo de tratamiento.....	71
Fig. 21. Frecuencia de la producción intracelular de perforina en linfocitos TCD8 vs el tiempo.....	74
Fig. 22. Determinación de la producción de citocinas en CMSP y sobrenadante de cultivo celular.	75
Fig. 23. Producción de citocinas Th1 (A) y Th2 (B) en plasma de sangre periférica vs tiempo de tratamiento.....	77
Fig. 24. Producción de IL-2 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8vs tiempo de tratamiento.	79
Fig. 25. Producción de TNF- α en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.	80
Fig. 26. Producción de INF- γ en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T Cd8 vs tiempo de tratamiento.	81
Fig. 27. Producción de IL-4 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos TCD8 vs el tiempo de tratamiento.	82
Fig. 28. Producción de IL-6 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos TCD8 vs el tiempo de tratamiento.	83
Fig. 29. Producción de IL-10 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos TCD8 vs el tiempo de tratamiento.	84

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos de VIH/SIDA según sexo. Venezuela.....	21
Tabla 2. Fracciones celulares obtenidas en cada etapa de purificación.....	51
Tabla 3. Condiciones de Cultivo Celular.....	52
Tabla 4. Clasificación de los niños según edad, sexo y grupo.	55
Tabla 5. Producción de IL-2 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8vs tiempo de tratamiento.	128

Tabla 6. Producción de TNF-α en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.	128
Tabla 7. Producción de INF-γ en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.	128
Tabla 8. Producción de IL-4 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.	129
Tabla 9. Producción de IL-6 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.	130
Tabla 10. Producción de IL-10 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.	130

ABREVIATURAS

AcMcs. Anticuerpos Monoclonales

ADN. Ácido Desoxirribonucleico

APC. Aloficocianina (siglas en inglés Allophycocyanin)

ARN. Ácido Ribonucleico

ARV. Terapia antirretroviral

BCG. Bacilo de Camett y Guerin

BrdU. Bromodeoxiuridina

CD. Células Dendriticas

CMH. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

CMSP. Células mononucleares de sangre periférica

CMV. Citomegalovirus

CPA. Célula Presentadora de Antígeno

CRF. Formas recombinantes Circulares

CTL. Linfocitos T citotóxicos (siglas en inglés Citotoxic Lymphocyte T)

DTH. Hipersensibilidad de tipo retardada (siglas en inglés Delayed Type Hypersensitivity)

FITC. Isotiocianato de Fluoresceína (siglas en inglés Fluorescein Isothiocyanate)

FoxP3. Forkhead box Protein 3

Ig. Inmunoglobulina

IL. Interleucina o Interleuquina

INF- γ . Interferón Gamma

iTreg. Linfocitos T Reguladores Inducidos

LEMP. Leucoencefalopatía multifocal progresiva

LTR. Secuencias Repetidas Largas (siglas en inglés Long Term Repeat)

MFI. Promedio de Intensidad de Fluorescencia

M. tuberculosis. *Mycobacterium tuberculosis*

PD-1. Proteína de Muerte Programada 1 (siglas en inglés Programmed Cell Death 1)

PE. Ficoeritrina (siglas en inglés Phycoerythrin)

PerCP. Peridin chlorophyll protein

PHA. Fitohematoglutinina (siglas en inglés Phytohaemagglutin)

PLC. Fosfolipasa

SI. Sistema Inmunitario

SIDA. Síndrome de Inmunodeficiencia Humana

TAAE. Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia

TB. Tuberculosis

TCR. Receptor de Linfocito T (siglas en inglés T Cell Receptor)

TGF- β . Factor de Crecimiento Transformante Beta (siglas en inglés Transforming growth factor beta)

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa (siglas en inglés Tumor Necrosis Factor Alfa)

Treg. Células T Reguladoras

VHS. Virus del Herpes Simple

VIH. Virus de la Inmunodeficiencia Humana

VIS. Virus de la Inmunodeficiencia en Simios

VVZ. Virus Varicela Zoster

ZAP70 LcK. Tirosin-cinasa

I. - INTRODUCCIÓN.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Kumar y col., 2007), que compromete principalmente los pulmones, pero puede propagarse a otros órganos. La vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin (BCG) no previene la infección contra *M. tuberculosis*, pero limita y retrasa la multiplicación bacilar en el foco primario, lo que previene es la diseminación linfo-hematógena y por tanto, el desarrollo de las formas diseminadas (miliar o meníngea) (Carrizo, 2008). Como la vacuna BCG no es efectiva al 100%, en algunos países, no se aplica ni a los niños ni a los adultos de forma sistemática.

Por otra parte, a partir de 1983 se descubrió un agente viral, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), cuyo blanco primario celular son los linfocitos TCD4, que sin tratamiento puede conllevar a un estado de inmunodeficiencia (SIDA), caracterizado por un deterioro del sistema inmunitario (Crum y col., 2006). Al menos un tercio de los 35,3 millones de personas que hay en el mundo infectadas por el VIH también están infectadas por el bacilo de la TB, y corren un riesgo mucho mayor de padecer la TB activa. Ambas infecciones ejercen un sinergismo que generalmente es mortal. El VIH promueve la progresión de una infección por tuberculosis reciente o latente y, la tuberculosis acelera el curso de la enfermedad por VIH. El efecto devastante de la epidemia del VIH ha tenido el mayor impacto sobre poblaciones con alta prevalencia de infección por *M. tuberculosis* y, esto ha tenido un profundo efecto en la epidemia de la TB (Onusida, 2013).

Los actuales medicamentos antirretrovirales, combinados entre sí, han mejorado de forma muy sensible la expectativa y la calidad de vida de los pacientes infectados, han

reducido notablemente la aparición de complicaciones infecciosas, retrasan la progresión de la infección por VIH y aumentan la supervivencia de estos pacientes. Sin embargo, este tratamiento no elimina por completo el virus del cuerpo (Seisida, 2011). Los efectos sobre la respuesta inmune específica a *M. tuberculosis* que ocurren en niños infectados con VIH cuando son vacunados con la BCG se conocen muy poco y mucho menos, sí el tratamiento antirretroviral que se esté suministrando está favoreciendo una mejora en tal respuesta. Es por ello que este trabajo de investigación está enfocado en el estudio de la respuesta específica a BCG por parte de linfocitos TCD8 de pacientes pediátricos VIH⁺ bajo tratamiento antirretroviral por 22 meses.

II.- MARCO TEORICO

1.- Los linfocitos TCD8

Los linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés Cytolytic T Lymphocyte) pertenecen a la línea de los linfocitos T encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular. Son responsables de neutralizar las células infectadas por microorganismos intracelulares, mediante un ataque directo a las células infectadas, inyectando enzimas tóxicas que provocan su destrucción. Se les llama comúnmente linfocitos TCD8, por la presencia del receptor de membrana denominado CD8 (Muñoz y col., 2005).

Efectivamente, esta subpoblación celular posee una molécula de superficie que lo identifica, la molécula CD8, la cual es una glicoproteína cuyos ligandos naturales son las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I. La molécula CD8 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Igs), su estructura está formada por

dos cadenas homólogas alfa y beta, que pueden formar heterodímeros o, en menor proporción homodímeros (/) (Muñoz y col., 2005).

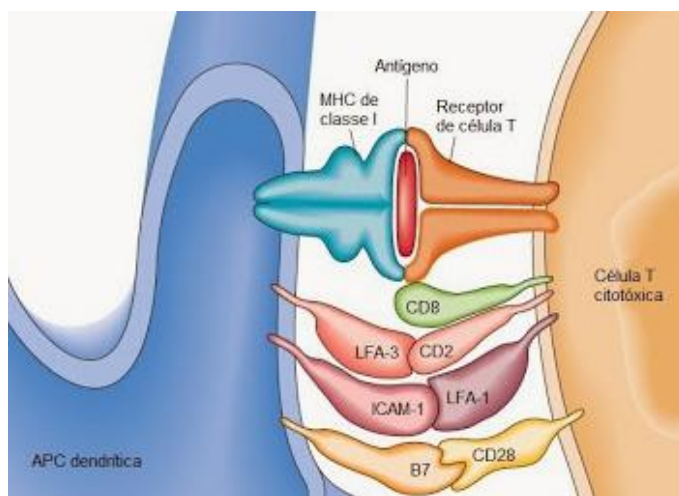


Fig. 1. Interacción molecular entre las células dendríticas y los linfocitos TCD8. Tomado de: http://cienciamedica04.blogspot.com/2013/11/grupo-2-universidad-tecnologica-de_12.html

Las interacciones de estas moléculas CD8 con el antígeno leucocitario humano (HLA), juegan un papel esencial en la maduración tímica de los linfocitos. De hecho, el fenotipo CD4/CD8 de un determinado linfocito T determina su función efectora. Así, mientras el CD4 se expresa en la mayoría de los linfocitos T cooperadores, la molécula CD8 se presenta, principalmente, en aquellos linfocitos T con función citotóxica. Es lógico que las células T con fenotipo CD8⁺ reconozcan antígenos en el contexto de moléculas CMH de clase I, ya que éstas tienen una distribución tisular universal, pudiéndose realizar así la función citotóxica, reconocimiento y lisis, de cualquier célula del organismo que se encuentre infectada por un determinado virus (Muñoz y col., 2005).

1.1.- Fenotipo de los linfocitos TCD8.

El complejo CD3 se encuentra en todos los linfocitos T y se compone de las cadenas polipeptídicas γ , δ , ϵ y ζ . El complejo CD3 constituye la unidad de transducción de señales

del receptor de linfocitos T (TCR). Las tirosina cinasas (ZAP70, Lck) se asocian al complejo CD3 cuando el antígeno se liga al complejo TCR, inducen una cascada de fosforilaciones de proteínas, activan la fosfolipasa C (PLC) y otros acontecimientos intracelulares (Murray y col., 2009).

Las proteínas CD4 y CD8 son correceptores para TCR, dado que facilitan la interacción entre éste y la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) presentadora de antígeno y pueden amplificar la respuesta de activación. La molécula CD8 al unirse a las moléculas del CMH de clase I en la superficie de la célula diana, en su extremo citoplasmático se asocian a una tirosina cinasa (p56lck) que potencia la activación celular inducida por el TCR al fijarse a las células presentadoras de antígenos (CPA) o bien a la célula diana. Las moléculas de CD4 o CD8 se expresan en los linfocitos T α/β , pero no en los γ/δ (Murray y col., 2009).

Dentro de los gránulos de las CTLs se encuentran proteínas importantes como la perforina, que forma trímeros y se inserta en la membrana de las células infectadas para formar un poro que facilita la entrada de las granzimas y granulinas, principales componentes de los gránulos. Aquella, se la ha señalado como la responsable directa de la muerte de *M. tuberculosis* al actuar sobre los lípidos en la pared de la micobacteria (Stenger y col., 1998; Murray y col., 2009).

Por otra parte, entre las moléculas accesorias expresadas en el linfocito T figuran diversos receptores de proteínas de la superficie celular que interaccionan con proteínas de las CPA y las células diana para activar dicho linfocito, lo cual favorece interacciones más

estrechas entre estas células, o bien, facilita la destrucción de la célula diana. Estas moléculas accesorias son las siguientes:

1. **CD45RA (linfocitos T vírgenes)** o **CD45RO (linfocitos T de memoria)**, es una tirosina fosfatasa transmembrana (PTP).

2. **CD28** o proteína-4 asociada a linfocitos T citotóxicos (**CTLA-4**) (en los linfocitos T activados), la cual se une a la proteína B7 de las CPA para suministrar una señal coestimuladora o inhibidora al linfocito T.

3. **CD154 (CD40L)**, la cual se encuentra en todos los linfocitos T y facilita la activación al unirse a CD40 en las células dendríticas (CD), macrófagos y células B.

4. **FasL**, el cual inicia el proceso de apoptosis en una célula diana que exprese **Fas** en su superficie (Stenger y col., 1999).

1.2.- La respuesta inmune frente a la infección viral.

Los linfocitos TCD8 cumplen un papel central en la defensa inmunitaria, en particular contra células infectadas por virus, bacterias y protozoos(Harty y col., 2000), además, se han relacionado con la eliminación de algunas células tumorales y células con CMH I incompatible en trasplantes. La respuesta inmune celular adaptativa es el principal mecanismo antiviral mediante la actividad citotóxica de estas células T (Cerwenka y col., 1998).

De manera adicional, las células TCD8 participan en respuesta a una amplia variedad de enfermedades (Stenger y col., 1999). Su función efectora se realiza a través de dos mecanismos básicos: citotoxicidad y liberación de citocinas. Para lograr su función

citotóxica, las células T CD8 emplean dos mecanismos complementarios, uno mediado por la exocitosis de gránulos líticos que contienen moléculas como perforina, la cual, como ya se mencionó, es capaz de insertarse en la membrana lipídica y formar poros, lo que resulta en el colapso del potencial de membrana; sin embargo, su papel más importante tal vez sea servir de paso a otras moléculas de los gránulos líticos de la familia de las catepsinas; una de ellas, la granzima B, activa directamente la cascada de señalización de apoptosis mediada por caspasas (Kägi y col., 1996). La expresión en membrana de FasL/CD95L media el otro mecanismo citotóxico e induce la trimerización de su receptor Fas/CD95 en las células blanco para inducir apoptosis a través de la activación de la caspasa 8 (Kägi y col., 1996).

La respuesta específica de las células TCD8 contra un patógeno se inicia a través del reconocimiento de antígenos presentados de modo adecuado por moléculas CMH I y señales derivadas de co-estimulación, sobre todo a través de la molécula CD40 (Cerwenka y col., 1998; Jiang y col., 2004). Cada una de estas células tiene más de 15 divisiones para producir una progenie de más de 10^4 células en siete días de estimulación antigénica (Bourgeois y col., 2002). Pese a ello, esta respuesta no es del todo independiente de otros tipos celulares. Las células TCD4 y las CDs son requeridas para una adecuada respuesta de las células TCD8 (Schoenberger y col., 1998). Si bien sólo las CPA especializadas pueden efectuar una adecuada coestimulación a la célula TCD8, en la mayoría de los casos el blanco final no son siempre estas mismas CPA (Doherty, 1998). De esta manera, es preciso un mecanismo que permita activar a las células TCD8 para inducir su expansión clonal, el desarrollo de su función efectora y la generación de memoria. Para ello se ha señalado que

existe un proceso regulado de cooperación entre las células TCD8, las células TCD4 y las CDs.

El modelo planteado hasta el momento sobre la participación de las CDs en la activación de las células TCD8 señala que las CDs capturan el antígeno por varias vías y pueden fagocitarlo directamente si se encuentra libre en el medio extracelular o bien adquirirlo de células apoptóticas o necróticas. Con posterioridad lo procesan y presentan a través de CMH II a las células TCD4, las cuales sobrerregulan la expresión de la molécula CD40L y, mediante la interacción con CD40, activan o inducen a las CDs para estimular la respuesta de células TCD8 vírgenes que reconocen al CMH I en las CD (Ridge y col., 1998; Hernandez y col., 2002; Smith y col., 2004).

1.2.1.- Mecanismos efectores de linfocitos TCD8.

Los componentes críticos de la inmunidad adaptativa en la respuesta antiviral son los linfocitos TCD8 citotóxicos y los anticuerpos neutralizantes. Estos linfocitos T reconocen y eliminan células infectadas y además secretan citocinas con actividad inmunomoduladora y antiviral como INF- γ y el TNF- α . Se ha asumido que la principal función protectora de los linfocitos TCD8 es contribuir a la producción de INF- γ (Murray y col., 2009).

Los linfocitos TCD8 efectores abandonan el ganglio por el vaso eferente y llegan a la circulación sanguínea por un conducto torácico, para extravasarse luego en el tejido inflamado. A los pocos días de comenzado el proceso infeccioso ya pueden detectarse los primeros linfocitos TCD8 citotóxicos específicos en el foco infeccioso. Allí, las CPA infectadas por el virus procesan los antígenos por vía endógena y presentan los péptidos antigénicos a través de las moléculas de clase I del CMH. Los linfocitos TCD8 que llegan a este tejido

vuelven a reconocer los péptidos para los cuales son específicos sus TCR. Esta interacción molecular del CMH I/péptido-TCR, que no requiere en esta instancia de la participación de moléculas co-estimuladoras, dispara la activación de los mecanismos citotóxicos de los linfocitos TCD8, los que pueden estar mediados a través de 2 sistemas ya mencionados: granzimas y perforinas (mecanismo secretorio) y sistema Fas/FasL (mecanismo no secretorio). Ello conduce a la apoptosis de la célula infectada y a su rápida eliminación, junto con los virus contenidos en ella, por células fagocíticas profesionales o no (Fainboim y col., 2005).

Si bien se ha demostrado la actividad citotóxica de los linfocitos TCD8 en el control de algunos virus, cuando la infección compromete gran cantidad de células, estos linfocitos pueden verse superados ampliamente en número por la cantidad de células diana infectadas, e incluso, en infecciones extensas de órganos vitales, como el hígado o el cerebro, la destrucción de células infectadas puede comprometer la vida del hospedero, por lo que se ha descrito que los linfocitos TCD8 pueden mediar una acción antiviral sin inducir la muerte de las células infectadas, mediante la producción de la citocina INF- γ , lo que induce la síntesis intracelular de proteínas antivirales capaces de inhibir la replicación viral (Fainboim y col., 2005).

2.- Los linfocitos T reguladores (Treg).

La habilidad para mantener el equilibrio entre la activación y la inhibición de la respuesta inmune es un requisito necesario para evitar el proceso de desarrollo de eventos inmunopatológicos. La regulación inmune o inmunosupresión desempeña un papel trascendental en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos propios, evita la aparición

de enfermedades autoinmunes, controla el desarrollo de una respuesta inmune exacerbada frente a agentes patógenos o frente a distintos alérgenos, ayuda a disminuir el masivo estímulo proinflamatorio de la microflora comensal del tracto digestivo y favorece el escape de las células tumorales al control inmunológico (Vergara, 2009; Montoya, 2010).

Ya para la década de los 70 se tenía noción de la existencia de una subpoblación de linfocitos que ejercía control sobre la respuesta inmunitaria, ya fuese suprimiendo la síntesis de anticuerpos o como inhibidores de la actividad de otras subpoblaciones de linfocitos T (Ulrich, 1979). Sakaguchi y col. (1995) describieron una subpoblación de linfocitos T presentes basalmente en el sistema inmune sano, que constituía aproximadamente el 5% de la población total de linfocitos T en sangre, especializada en la inmunosupresión. Para el 2003, demuestran que esta subpoblación celular expresa el factor de transcripción Foxp3 de forma exclusiva (Sakaguchi y col., 1995; 2003), denominada como linfocitos T reguladores Treg, los cuales son una subpoblación de linfocitos TCD4 cuya función es suprimir la respuesta inmunitaria y mantener la autotolerancia. La mayoría de estos linfocitos Treg expresan cantidades elevadas de la cadena β del receptor de interleucina-2 (CD25). Un mecanismo mediante el cual las Tregs controlan la respuesta inmunitaria es a través de la secreción de citocinas inmunosupresoras como la IL-10, que inhibe la función de macrófagos y de las células dendríticas. En muchos modelos experimentales la función de los linfocitos Tregs también parecen depender de la citocina del factor de crecimiento- β (TGF- β) (Abbas y col., 2012).

En los últimos años los avances en la caracterización de los Tregs han sido vertiginosos, sobre todo por el descubrimiento del relevante rol desempeñado por el factor

de transcripción Foxp3. Se ha observado que en determinadas condiciones *in vitro*, linfocitos T vírgenes CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ se pueden convertir en linfocitos T reguladores inducibles Foxp3⁺ (iTregs), mediante diversos protocolos de conversión y/o expansión (Vergara, 2009).

En la actualidad, se sabe que las células T reguladoras naturales (nTreg) CD4⁺/CD25^{high}/FoxP3⁺ se originan durante el proceso normal de maduración de los linfocitos T en el timo y que constituyen, aproximadamente, entre el 5% y el 10% de las células TCD4 de sangre periférica. A diferencia de lo observado para los linfocitos T efectores convencionales, la selección tímica de las nTreg requiere interacciones de mayor avidéz entre su TCR y el complejo péptido/CMH expresado en las células del estroma del timo. Además, las células nTreg son dependientes de la vía de señalización del receptor de la IL-2 para su desarrollo, expansión y función en la periferia (Montoya, 2010).

2.1.- Los linfocitos T reguladores en la infección por VIH.

En años recientes se ha demostrado que las células Treg tienen un papel importante en la modulación de la respuesta específica al VIH, así como en la patogénesis de esta infección. Al respecto, se han planteado dos teorías que contrastan entre sí. Por una parte, las células Treg pueden presentar un papel benéfico, debido a su capacidad de controlar la activación inmune característica de esta infección y son responsables, en parte, de la eliminación de células activadas (Rueda y col., 2009). A la fecha, aún no hay evidencias claras de este efecto benéfico durante la infección por el VIH. Algunos informes sugieren indirectamente este efecto, basados en la correlación inversa que hay entre la cantidad de estas células (las Treg) y la expresión de marcadores de hiperactivación inmune por células

T de la sangre periférica en individuos considerados como no progresores (Chase y col., 2008). Asimismo, se ha descrito la asociación entre la disminución de la cantidad de células Treg en la sangre periférica de individuos VIH⁺ que ya han desarrollado SIDA con un efecto protector de estas células. Finalmente, también se ha descrito que alteraciones cuantitativas y funcionales de las células Treg de la *lamina propria* están asociadas con hiperactivación de células T durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS); estas alteraciones incluyen la merma de la inhibición de la proliferación, así como de la expresión de FoxP3, comparados con macacos no infectados (Eggena y col., 2005).

Por otra parte, la activación y expansión de las Treg pueden tener un papel perjudicial debido a que pueden afectar el desarrollo de la respuesta específica contra el virus, y permitir así la replicación viral descontrolada, que favorece el progreso de la infección por el VIH (Rueda y col., 2009). Prueba de ello es que la eliminación *in vitro* de la subpoblación CD4⁺CD25⁺ del total de células mononucleares de la sangre periférica (CMSP) de pacientes VIH⁺ y macacos VIS⁺, incrementa la respuesta inmune específica contra los virus (Aandahl y col., 2004; Weiss y col., 2004; Eggena y col., 2005). En un estudio *in vitro* de interacción células Treg-VIH se demostró que la exposición de células TCD4 a la glicoproteína viral gp120 favorecía la acumulación y la expansión de células Treg, posiblemente al promover la supervivencia de esta población celular cuyo mecanismo se asoció a la acumulación de células Treg en individuos infectados que exhiben replicación activa (Ji y col., 2009).

3.- El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El VIH presenta dos tipos: el VIH tipo 1 (VIH-1) y el VIH tipo 2 (VIH-2), ambos son transmitidos por contacto sexual, a través de la sangre y de madre a hijo. Los dos tipos pueden producir una sintomatología similar en el humano, así como también son similares morfológicamente y comparten el mismo linfotropismo celular CD4 (Grant y col., 1990; Grant y col., 1998). El blanco primario del VIH son las células TCD4 que exhiben alteraciones cuantitativas y cualitativas; no obstante, el deterioro de la inmunidad mediada por células es multifactorial e incluye además la actividad alterada de células TCD8 y de células presentadoras de antígeno, estas últimas principales reservorios del virus (Paranjape, 2005). Comparten, además la misma citopatogenicidad y poseen proteínas estructurales y replicativas, incluyendo la transcriptasa reversa. Por estudios genéticos se ha demostrado que el VIH-2 presenta diferencias en su genoma que lo distinguen del VIH-1, y que lo hacen menos susceptible a los dideoxynucleosidos; como el AZT (azidotimidina o zidovudina) que es un potente inhibidor de la replicación viral y es usado como medicamento contra el SIDA. El VIH-2, sin embargo, se encuentra solo en África Occidental y en la India, mientras que el VIH-1 es el virus que está más extendido a nivel mundial y es el principal causante del SIDA (Jaffar y col., 2004).

3.1.- Estructura del VIH.

El VIH pertenece a la familia de los retrovirus, que posee ARN como material genético y que se distingue por la presencia de una enzima llamada transcriptasa reversa, que traduce ese ARN viral en ADN con la capacidad de integrarse en el genoma del hospedador (Bernal, 2008).

La estructura del virus se asemeja a un icosaedro cuyo diámetro no sobrepasa los 110 nm. Se distinguen una cobertura y un núcleo. La cobertura presenta aproximadamente 70 prominencias compuestas por glicoproteínas (gp120 y gp41) las cuales van a hacer interacción con los componentes proteicos del receptor CD4 de las células localizadas a nivel del sistema hematopoyético, gastrointestinal, linfóide y sistema nervioso. El núcleo posee cuatro proteínas virales, la p24 -la de mayor tamaño-, p17-matriz del virus- y dos proteínas estructurales del genoma viral -p7 y p9-. Dentro de estas estructuras están presentes tres enzimas indispensables para la replicación del virus: la transcriptasa reversa, la integrasa y la proteasa. La composición genética del virus es compleja y heterogénea comparada con otras estructuras virales (Bernal, 2008).

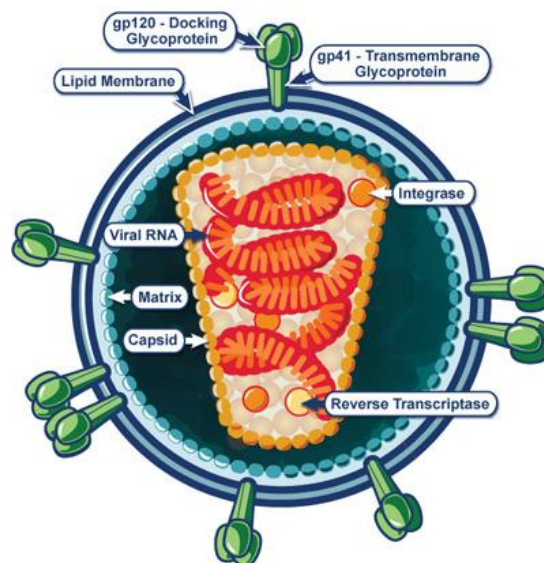


Fig. 2. Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH). Tomado de <http://www.niaid.nih.gov/Pages/default.aspx>

El genoma del VIH contiene dos genes encargados de la estructura o ensamblaje viral (gag y env) y un gen enzimático (pol) que en conjunto con proteínas reguladoras de la expresión viral (Tat y Rev) y proteínas moduladoras (Nef, Vif, Vpu y Vpr) constituyen la

magnitud de la infección para interactuar con los diferentes receptores celulares, especialmente el CD4 (Bernal, 2008).

El VIH tipo 1 (VIH-1) presenta un alto grado de diversidad genética, lo que es atribuible a su rápido ciclo de replicación, una alta tasa de error en la actividad de la transcriptasa inversa y la recombinación de 2 genomas de ARN durante la síntesis de ADN viral. Esta alta variabilidad permite la gran diversidad de los tipos de VIH, subtipos, formas recombinantes circulantes (CRF), y formas recombinantes únicas. Tres grupos de VIH-1 han sido identificados: el grupo M (mayor), grupo el O (outlier), grupo y el N (nuevo no-M-no-O). El virus M es el más frecuente y representa más del 95% de las infecciones globales (Kiwanuka y col., 2008). Las diferencias en las características genéticas de VIH pueden desempeñar un papel en la dinámica de esta infección El VIH tipo 1 es más virulento que el tipo 2, y los virus del grupo M parecen tener una mayor tasa de replicación y capacidad de transmisión que las cepas VIH tipo 2 o el grupo O (Kiwanuka y col., 2008).

3.2.- Epidemiología de la infección por VIH.

La infección por el VIH, es actualmente uno de los mayores problemas de salud pública. ONUSIDA estimó para el año 2012 que en todo el mundo existen 35,3 millones de personas que viven con VIH, de los cuales 3,3 millones corresponden a niños menores de 15 años, con un promedio de 260.000 nuevas infecciones en ese mismo año. Asimismo, la epidemia mundial de SIDA ha causado 1,6 millones de muertes para dicha fecha (Onusida, 2013).

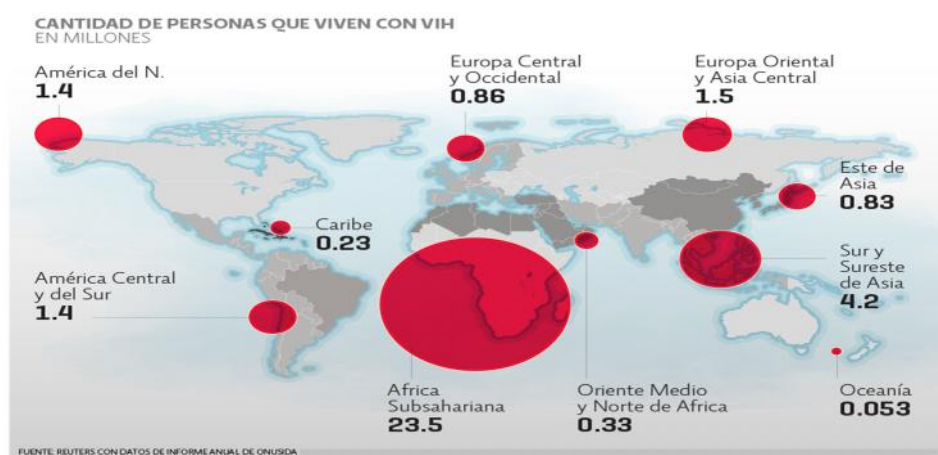


Fig. 3. Distribución de la epidemia por VIH en el mundo. (Onusida, 2013)

En Venezuela se estima que la epidemia es de tipo concentrada, con una prevalencia en la población general menor del 1% y superior al 5% en grupos de población más vulnerable, especialmente en hombres que tienen sexo con hombres (HS) (Mpps, 2011).

Estas estimaciones se basan en revisiones documentales e investigaciones puntuales realizadas por diferentes autores, pues hasta la fecha no se han realizado estudios de prevalencia de gran alcance. Para el periodo 2006–2011, los casos nuevos notificados, se muestran en el siguiente cuadro.

Tabla 1. Casos de VIH/SIDA según sexo. Venezuela (Mpps, 2011).

**Casos de VIH/SIDA según Sexo.
Venezuela, 2006-2011**

Años	Masculinos		Femeninos		Total	
	Nº	Tasa*	Nº	Tasa*	Nº	Tasa*
2006	9.884	80	1.913	20	11.997	44,38
2007	4.869	32,85	1.217	18,25	6.086	22,14
2008	5.482	81,59	1.833	27,62	7.315	26,19
2009	8.725	61,67	2.487	20,13	11.212	39,50
2010	9.226	63,82	2.443	16,99	11.669	40,47
2011	8.976	61,18	2.513	17,21	11.489	39,24
Total	47.162	-	12.406	-	59.768	-

F.I. Programa Nacional de SIDA/ITS * Tasa por 100.000 habitantes.

3.3.- Ciclo de replicación del VIH.

El VIH posee dos glicoproteínas de cubierta (Env) derivadas por endólisis de un único precursor: la gp160; la gp120, que deriva de la porción amino-terminal, e interviene en la unión al receptor y dirige el proceso de fusión; la proteína transmembrana gp41, que deriva de la porción carboxiterminal y media en la fusión de membranas (Choe y col., 1996; Strebel y col., 1999) (ver figura 4). Estas glicoproteínas se exponen solamente cuando el virus está lo suficientemente cerca de la membrana celular como para iniciar la entrada, evitando la exposición de estos dominios al sistema inmunológico. La proteína viral gp120 reconoce en la superficie de células presentadoras de antígeno al receptor DC-SIGN y actúan como vehículo para llevar el virus hasta los linfocitos TCD4 en los tejidos linfoides. La proteína gp120 del VIH se une al receptor CD4, esta unión provoca un cambio conformacional que permite la exposición del sitio de unión al correceptor (CCR5 o CXCR4). Con ello se activa la exposición de un fragmento de la proteína gp41 que se inserta en la membrana celular llevando a cabo la fusión de las membranas viral y celular. La proteína gp41 contiene un péptido hidrofóbico rico en glicina, esencial para la fusión y conformado en dos regiones, C-terminal y N-terminal (Choe y col., 1996). Con la activación se conforma primero una pre-estructura que lleva a la inserción de la región N-terminal en la membrana diana, la cual se une posteriormente a la región C-terminal, con lo cual da lugar a una estructura en forma de arpón que facilita la aproximación y la fusión de las membranas celular y vírica, mediante la formación conjunta de un poro de fusión (Lehman-Che y col., 2004).

Inmediatamente después de la entrada en el citoplasma, el *core* del VIH empieza un proceso de desensamblaje. La mayoría de las proteínas de la cápside del virus maduro están

libres, no asociadas al *core*, y su liberación en el citoplasma provoca la disolución del *core* por un proceso de dilución, que va ligado al inicio de la retro-transcripción iniciada al contactar el complejo ribonucleoproteínico inicial con los desoxirribonucleótidos citoplasmáticos. El transporte del complejo de pre-integración del virus al núcleo es bastante rápido, por ello parte del proceso de transcripción reversa ocurre en el citoplasma y continúa en el núcleo. La transcripción reversa ocurre más eficientemente en células en activa proliferación, dando como producto ADN viral de doble hebra flanqueado en ambos extremos por una secuencia nucleotídica denominada secuencias repetidas largas (LTRs), que luego de su integración actúan como receptores e iniciadores del proceso de transcripción viral. Se ha demostrado *in vivo* que la transcripción reversa del VIH en células en reposo no es muy eficiente y la principal forma de ADN viral encontrada en esta condición son genomas de ADN no integrados (Asante y col., 1999).

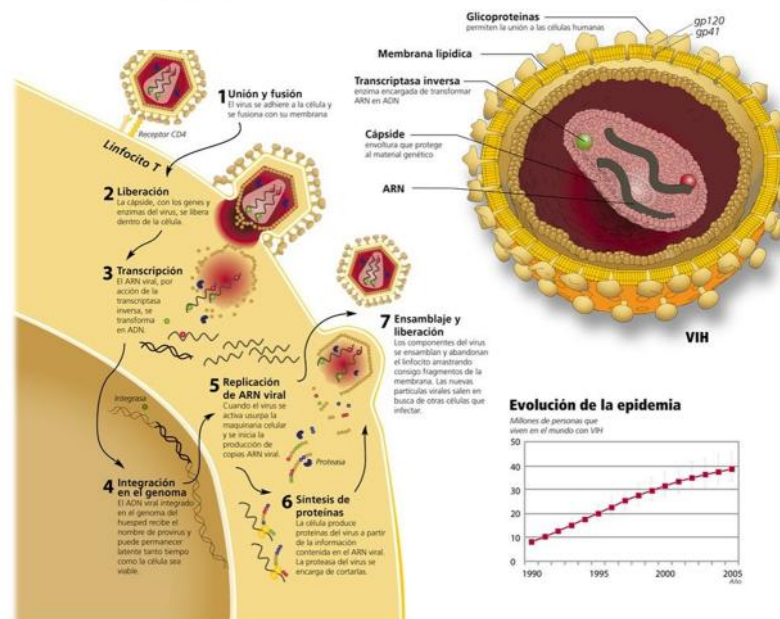


Fig. 4. Esquema del ciclo de replicación del VIH. Tomado de: <http://elmercaderdelasalud.blogspot.com/2012/03/el-sida-iii.html>

La transcriptasa reversa (TR) cataliza la formación de una primera cadena de ADN a partir del ARN viral. La TR posee tres actividades diferentes: ADN-polimerasa dependiente de ARN, ADN-polimerasa dependiente de ADN y ribonucleasa H. La ADN-polimerasa dependiente de ARN sintetiza una copia de ADN de cadena sencilla a partir del ARN, la ribonucleasa degrada parcialmente el molde ARN original y la segunda polimerasa sintetiza una segunda cadena de ADN a partir de la primera cadena (Popov y col., 1998).

La entrada del complejo de integración, ocurre tanto con la membrana nuclear intacta (células en reposo) como en la disrupción de la membrana nuclear (células en mitosis). La enzima viral integrasa dirige la integración del ADN viral en el genoma celular para formar un provirus. El ADN retroviral puede integrarse en numerosos sitios del genoma humano; enzimas celulares reparan los sitios de unión del provirus con el ADN genómico de la célula hospedadora. Una vez integrado el provirus establece una infección latente o productiva. La integración contribuye a la replicación viral de 2 maneras importantes: el ADN no se replica de manera autónoma, por lo tanto depende de la integración para mantenerse en células en división. A partir de la integración, el VIH puede permanecer latente, replicarse de forma controlada o replicarse de forma masiva, con el consiguiente efecto citopático en la célula infectada. El inicio de la transcripción depende de factores celulares y se produce en ausencia de proteínas víricas (Asante y col., 1999). Una vez integrado, el provirus es sintetizado durante la replicación del ADN celular y se transmite como un elemento integral del genoma celular. Además, la integración estabiliza el ADN viral evitando su degradación (Popov y col., 1998; Asante y col., 1999).

Los LTRs son sensibles a la mayoría de los factores de transcripción celulares y transactivadores de otros virus. En consecuencia, diversos estímulos biológicos propios de la célula, así como señales provenientes de otras infecciones virales, pueden activar la transcripción del VIH e iniciar un ciclo de replicación. Dado que la transcripción del virus produce sus propios factores activadores, este ciclo se repite muchas veces a partir de un sólo estímulo. La regulación de la expresión génica del VIH se realiza a nivel transcripcional y post transcripcional (Ramirez De Arellano y col., 2006). Existen trabajos que demuestran que la transcripción del genoma viral requiere de la maquinaria transcripcional celular y de proteínas virales reguladoras. Productos de este proceso son ARNs genómicos que son encapsidados en las nuevas partículas virales, y subgenómicos (ARNm) que se traducen como proteínas virales. La transcripción de los ARNm procede por fases; primero se expresan los genes reguladores (tat, rev, nef) y luego gag, pol, env, vpr, vpu, y vif, los cuales dependen de Rev para alcanzar su localización citoplasmática y ser expresados (Liang y col., 2002).

El ensamblaje del virus es comandado por la unión de un segmento de p17 a la cara interna de la membrana celular. Al complejo así formado se agregan dos copias de ARN genómico, proteínas reguladoras y accesorias, a las que se agregan las proteínas estructurales. Las proteínas de envoltura deben insertarse en la membrana citoplasmática para completar el proceso. Estas proteínas son sintetizadas en el retículo endoplásmico y transportadas al aparato de Golgi en forma de gp160, donde es cortada en sus péptidos de superficie gp120 y transmembrana gp41 para ser transportadas por vías secretorias a la superficie celular. La partícula que sale por gemación de la membrana celular es aún

inmadura y no infectiva. Durante este proceso las proteínas estructurales son procesadas por la proteasa viral y obtienen su tamaño y estructura final, generando un virus maduro infectivo que puede iniciar un nuevo ciclo de replicación en otras células blanco (Malim y col., 1989; Arrigo y col., 1991; Geijtenbeek y col., 2000).

3.4.- La respuesta inmune contra el VIH.

Los linfocitos TCD4 son los principales moduladores de todas las respuestas inmunes, desde el reconocimiento, procesamiento y presentación de antígenos, a la respuesta humoral y celular. La infección y destrucción progresiva de este sistema celular lleva inexorablemente a un deterioro de la respuesta inmune (Parnes y col., 1989).

La respuesta inmunitaria desplegada frente a la infección por el VIH restringe la infección vírica, pero contribuye a la patogenia. Se generan anticuerpos neutralizantes frente a la gp120 y participan en las respuestas de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Sin embargo, el virus recubierto de anticuerpos continúa siendo infeccioso y es fagocitado por los macrófagos (Murphy, 2009). La fase aguda inicial de la infección que ocurre conforme se desarrolla la respuesta inmunitaria adaptativa va seguida por la fase crónica, semi-estable, que finalmente culmina en SIDA. Actualmente se cree que la citopatocidad mediada por el virus es muy importante durante la infección temprana, y que esto origina un agotamiento considerable de células TCD4, en particular, en las mucosas. Después de la fase aguda hay una buena recuperación inicial, pero los linfocitos citotóxicos dirigidos contra células infectadas por el VIH, la activación inmunitaria (directa e indirecta), la citopatocidad, y la generación insuficiente de células T, se combinan para establecer el estado crónico, durante el cual aparece la inmunodeficiencia (Murray y col., 2009).

El VIH induce la producción de anticuerpos neutralizantes lo cual ocurre entre el primero y el tercer mes de la primoinfección. Estos anticuerpos, aunque no se ha demostrado una función protectora *in vivo*, en ensayos *in vitro* pueden neutralizar el virus antes de perder la envoltura y penetrar en la célula. La mayoría de ellos están dirigidos contra proteínas de la envoltura del virus, particularmente contra una estructura en forma de asa dentro de la región hipervariable de la glicoproteína gp120 conocido también como dominio principal de neutralización (V3 loop), así como contra los epítopes de la región implicada en la fijación al receptor CD4. Los anticuerpos están presentes durante todo el curso evolutivo de la infección aunque sólo en las fases avanzadas pueden disminuir de concentración; sin embargo, no se ha demostrado correlación entre los títulos de estos anticuerpos y la progresión de la infección (González y col., 2011).

El papel principal de los linfocitos TCD4 cooperadores en el inicio de la respuesta inmunitaria y de la hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) queda subrayado por la magnitud de la desaparición de la respuesta inmunitaria originada por la infección por VIH. Los linfocitos TCD4 activados desencadenan las respuestas inmunitarias al secretar las citocinas necesarias para la activación de los macrófagos, otros linfocitos T, linfocitos B y linfocitos citotóxicos naturales. Cuando no existen linfocitos TCD4 o no son funcionales (recuentos de linfocitos TCD4 <a 200/mL de sangre), las respuestas inmunitarias específicas de antígeno (especialmente las respuestas inmunitarias celulares) se ven alteradas y las respuestas humorales carecen de control alguno. La desaparición de los linfocitos TCD4 responsables de la DTH permite la adquisición de muchas infecciones intracelulares oportunistas características del SIDA (p. ej., hongos y bacterias intracelulares). La reducción

en el número y la incapacidad de activar los linfocitos TCD8 aumenta el riesgo de recurrencia de los virus latentes, entre los que se incluyen las infecciones por poliomavirus causante de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LEMP) y por el virus del Herpes simple (VHS), virus varicela zoster (VVZ) y citomegalovirus (CMV) y también los linfomas asociados al virus de Epstein-Barr (VEB) y el sarcoma de Kaposi asociado al virus del herpes humano 8 (VHH-8) (Murray y col., 2009).

3.4.1.- El papel de linfocitos TCD8 frente al VIH.

Las células citotóxicas TCD8 reconocen la fusión entre las proteínas derivadas del virus y las dependientes del linfocito TCD4, inhibiendo la replicación a nivel nuclear con efecto variable sobre la integridad celular (Douek y col., 2003). Los linfocitos TCD8 pueden destruir las células infectadas mediante una acción citotóxica directa y la síntesis de factores supresores que restringen la replicación vírica, como quimiocinas que también inhiben la unión del virus a su correceptor. Asimismo, los linfocitos TCD8 desempeñan un papel crucial en el control de la replicación del VIH durante la fase precoz de la infección (Clark y col., 1999; Migueles y col., 2002). En esta fase tiene lugar una expansión clonal de linfocitos CD8 con actividad citotóxica. Esta respuesta celular es especialmente acusada en la primoinfección y su intensidad se correlaciona con el control de la replicación vírica (ver figura 5). Aunque la respuesta celular CD8 es especialmente intensa frente a proteínas del *core*, se han descrito clones frente a distintos epítopes de la proteína de la envoltura, la transcriptasa reversa, así como frente a proteínas reguladoras (Barboza, 2011).

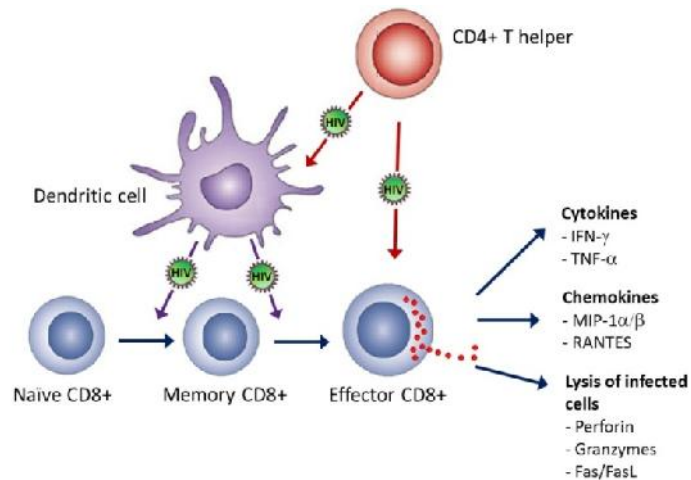


Fig. 5. Mecanismos efectores de los linfocitos TCD8 y sitios de acción del VIH en su activación. (De Haes y col., 2012)

La aparición de linfocitos TCD8 específicos frente al VIH lleva a la rápida caída de la carga viral, que se detecta antes incluso de la aparición de la respuesta humoral. No obstante, la respuesta celular específica no se limita a la actividad de los linfocitos TCD8, sino que se ha demostrado que una respuesta CD4 específica es importante no sólo para la puesta en marcha de una respuesta inmunitaria eficaz frente al VIH, sino por su propia actividad antiviral. Sin embargo, los linfocitos TCD8 han de ser activados por los linfocitos TCD4 y se ha observado que el número de linfocitos TCD8 desciende en paralelo al número de linfocitos TCD4, esta reducción guarda relación con la progresión de la enfermedad al SIDA (Murray y col., 2009). Esto último está basado en la teoría conocida como del escape viral, el cual establece que los linfocitos TCD8 comienzan a perder su capacidad de reconocer las secuencias genéticas del VIH a consecuencia de las mutaciones que van apareciendo en la cepa salvaje. Otra teoría postula que el VIH puede lesionar algunos clones del repertorio de CD8. Otra teoría propone que se produce un defecto en la activación y proliferación de linfocitos TCD8 específicos frente al VIH. Finalmente, es claro que la

actividad de los linfocitos T CD8 es determinante para modular la velocidad de progresión de la infección por el VIH (Echeverría y col., 2006).

3.5.- La inmunopatología de la infección por el VIH

En la transmisión de la infección viral por la vía sexual, las primeras células diana del virus son las células dendríticas y de Langerhans, situadas en la submucosa y los linfocitos circundantes. Debido a la presencia de CDs señalizadoras, los fenómenos de presentación antigénica y activación linfocitaria que ocurren en este microambiente, lo hace especialmente favorable a la infección de los linfocitos TCD4. Una vez que se produce esta infección de la "primera estación" submucosa, la diseminación viral es inmediata y explosiva. La migración de células presentadoras y linfocitos infectados, primero a ganglios regionales y posteriormente a órganos linfoides distantes, hace que el virus se disemine a todos los órganos linfoides en una semana. En este momento el número de linfocitos infectados es similar al observado en la fase crónica de la infección. En las semanas siguientes, simultáneamente con la aparición de una enérgica respuesta inmune, la carga viral baja y alcanza un estado de equilibrio cuyo nivel es predictor de la evolución posterior de la infección, progresando más rápido hacia una infección clínica aquellos pacientes con carga viral más alta (González y col., 2005).

Tal como se observa en la figura 6, tras esta fase inicial aparece un período de duración variable (entre dos a diez años) en el que el individuo infectado permanece asintomático. Durante este período la sangre presenta menos cantidad del virus, a pesar que el mismo continua replicándose en tejidos linfoides, nerviosos, etc. La infección crónica causa una reducción progresiva y continuada del número de Linfocitos T, con el

consiguiente deterioro del sistema inmune. Este período asintomático termina con la aparición de las primeras manifestaciones clínicas (fiebre, pérdida de peso, diarreas, anergia cutánea, etc.), que se denomina en conjunto «complejo relacionado con el SIDA» (CRS), junto con las primeras infecciones oportunistas (*Herpes zoster*, candidiasis oral, tuberculosis), que son los indicadores de la progresión a SIDA en un plazo corto de tiempo. Una de las primeras manifestaciones del SIDA es la neumonía, que es la causa de muerte en muchos casos, a la que siguen numerosas infecciones oportunistas (microorganismos que no son patogénicos en individuos inmunocompetentes), diferentes neoplasias (sarcoma de Kaposi, linfoma no Hodgkin) y trastornos neurálgicos (encefalopatía), que en conjunto terminan siendo letales para el enfermo (Alcamí, 2000).

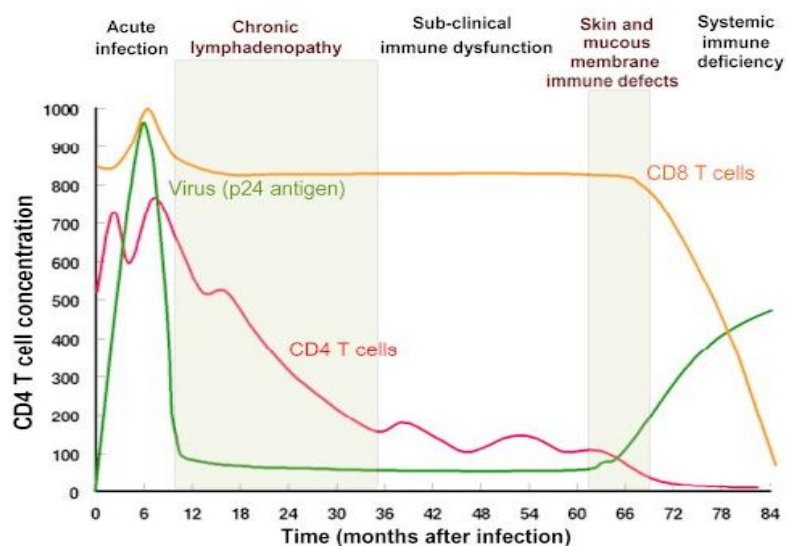


Fig. 6. Curso de desarrollo de la infección por VIH en pacientes sin tratamiento antirretroviral.
Tomado de: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/virol-span.htm>

El deterioro del sistema inmunológico y por consecuencia la respuesta inmunológica que contiene al VIH, conlleva a un aumento de la replicación viral acelerándose la progresión clínica. Los cambios cuantitativos de la carga viral se asocian también a cambios cualitativos del virus, que produce nuevas variantes virales o quasi-

especies en cada ciclo de replicación, acumulándose en el tiempo un progresivo número de variantes genéticas con diverso tropismo celular y virulencia. Esta replicación acelerada permite una mayor generación de mutantes, con lo cual aumenta la posibilidad de evasión viral y la generación de variantes más citopáticas. La elevación de la carga viral y el rápido descenso en la cifra de linfocitos TCD4 son los marcadores de una replicación "salvaje" del virus en ausencia de mecanismos de control inmunológico (Alcamí, 2000). Desde el punto de vista patogénico, la emergencia de variantes de VIH con nuevos epítopes de neutralización, provocan que el sistema inmunológico deba reconocer y desarrollar nuevas respuestas inmunes periódicamente para mantener controlada la infección (Parnes y col., 1989).

3.6.- La infección del VIH en niños.

La transmisión del virus VIH se produce a través de tres vías: contacto sexual, contacto parenteral con sangre y a través de la transmisión vertical, de madre a hijo. En niños el mecanismo más importante de infección es el vertical, responsable de más del 90% de los casos (Chávez, 2000).

La transmisión vertical puede ocurrir durante el embarazo (intrauterino), durante el trabajo de parto y en el parto (intraparto), o bien en el período postnatal, a través de lactancia materna. Diversos estudios han demostrado que en el 50-70% de los casos la transmisión ocurre intraparto, constituyendo por lo tanto este período el de mayor riesgo de infección para el niño (Chávez, 2000).

La infección por VIH en niños condiciona una grave inmunodeficiencia con características especiales que la distinguen de la del adulto. El virus, al incidir en la ontogénesis y diferenciación del feto, tiene un efecto patogénico directo e indirecto sobre los componentes del sistema inmune. Resulta especialmente dramático en el recién nacido y lactante, en los cuales los síntomas pueden manifestarse en los primeros meses de vida (González y col., 2005).

El VIH, aún en los estadios más tempranos de la infección, puede afectar severamente el desarrollo infantil, tanto el crecimiento físico, la evolución mental, o el bienestar emocional (Sharp, 2009). El déficit inmune es global, afecta tanto la inmunidad celular como la humoral. La pérdida progresiva de células TCD4 es un marcador del curso de la enfermedad en niños y su disminución es mucho más rápida que la observada en el adulto. En niños ocurre normalmente la apoptosis de células T en un alto grado en el timo, lo que ocasiona la prematura involución de este órgano, incluyendo timitis en pequeños que padecen de SIDA. Las alteraciones inmunes más graves se correlacionan con un peor pronóstico de la infección por VIH en la edad pediátrica (Chávez, 2000).

El sistema inmunológico de los niños es diferente al de los adultos. En los niños el VIH daña rápidamente el sistema inmunológico que controla el común de las infecciones, como son las infecciones bacterianas respiratorias y las de los oídos; y las virales como la varicela. El VIH también impide que el sistema inmunológico produzca linfocitos de memoria, los cuales son utilizados en la adultez para evitar infecciones que comprometen la vida como la neumonía por *Pneumocystis* (PCP), el complejo *Mycobacterium avium*(MAC) y el CMV (Sharp, 2009).

En los adolescentes y adultos, los síntomas persistentes o severos pueden aparecer recién 10 años o más después de que el VIH entró a su cuerpo. Este período “asintomático” de la infección varía mucho entre una persona y otra. Pero, durante el período asintomático, el VIH está activo infectando y eliminando a las células del sistema inmunitario. Su efecto más evidente es la disminución de los recuentos (cantidad) de células TCD4 en la sangre, que son los elementos clave del sistema inmunitario para combatir las infecciones. Al principio, el virus desactiva o destruye estas células sin causar síntomas (Rojo, 2012).

El diagnóstico de un niño infectado por el VIH por lo general se establece cuando tiene SIDA, que es cuando el sistema inmunitario ya tiene un daño severo o aparecen otros tipos de infecciones. A medida que el sistema inmunitario se debilita, empiezan a aparecer las complicaciones (Rojo, 2012).

3.7.- El Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia.

Los conocimientos de la estructura molecular, la etiopatogenia y el tratamiento de la infección por el VIH han evolucionado marcadamente en los últimos 10 años (Rojo, 2012). La terapia antirretroviral de alta eficiencia (TAAE) ha cambiado la historia natural de la infección VIH/SIDA, al retardar la evolución de la enfermedad y mejorar la calidad de vida de los individuos infectados (Afaní y col., 2005). A partir de 1995-1996, se inició la aplicación de esta terapia, donde se utiliza un inhibidor de la proteasa viral en combinación con dos agentes inhibidores de la transcriptasa reversa viral (Carpenter y col., 1998).

En ausencia de pruebas de que la erradicación del VIH de una persona infectada sea factible, la meta establecida de la terapia antirretroviral es la reducir la carga viral a niveles

tan bajos como sea posible por el mayor tiempo posible. Para lograr esto es necesaria una adecuada selección de los componentes del tratamiento de combinación para obtener una óptima respuesta antiviral (Afaní y col., 2005). La elección de los fármacos debe guiarse por la tolerabilidad de los perfiles y las consideraciones de la cobertura de la gama más amplia de las células infectadas, vías de penetración, las interacciones farmacocinéticas y, lo más importante, la capacidad de un agente o una combinación para limitar las opciones terapéuticas a través de la selección de virus resistentes (Moyle y col., 1998).

El tratamiento en el niño, es difícil por la no disponibilidad de presentaciones pediátricas en todas las drogas antiretrovirales, muchas veces, el sabor y la preparación es una limitante, aunque se siguen utilizando para aquel las presentaciones de adulto. En un intento para poder garantizar adherencia en el paciente pediátrico y disminuir los costos del tratamiento antirretroviral, se ideó un sistema de suministro, donde según el peso del paciente se calcula la dosis y se le suministra la droga, del esquema asignado cada mes, lográndose un ahorro sustancial en el presupuesto y una adecuada adherencia al tratamiento (Moronta y col., 2005).

4. - La Tuberculosis.

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa y contagiosa, producida por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis* o Bacilo de Koch (Liebermann, 1958; Garcia y col., 2010). Se transmite por la exposición al bacilo tuberculoso, normalmente al entrar en contacto con las secreciones respiratorias que despiden las personas con tuberculosis pulmonar o de otras partes del árbol respiratorio, cuando tosen, cantan o estornudan

(Pelini, 2013). Afecta principalmente a los pulmones originando la tuberculosis pulmonar. Puede localizarse en otras partes del cuerpo como los ganglios, pleura, aparato génito-urinario, meninges y otros. Una forma muy grave es la tuberculosis miliar (forma diseminada por vía hematológica) y la meningitis tuberculosa a las cuales los niños sin vacuna BCG son más susceptibles. El *Mycobacterium bovis* también puede producir enfermedad tuberculosa, especialmente al consumir leche de vaca no hervida ni pasteurizada, o vísceras provenientes de animales enfermos con tuberculosis (García y col., 2010).

La prevalencia de TB es muy alta en los países del tercer mundo llamados también países en desarrollo, donde la condición socioeconómica a la que están sometidas sus poblaciones, determina pobreza, desnutrición, promiscuidad e insalubridad ambiental. Por el contrario, la prevalencia es baja en los países desarrollados; sin embargo, en estos también la TB resurge debido a ciertas circunstancias como el incremento de la inmigración procedente del tercer mundo, el incremento de la población de ancianos y, a la deprivación socioeconómica de algunas de sus comunidades: en ambos, se considera al SIDA como un factor de incremento de la tuberculosis (Knechel, 2009).

4.1.- Ciclo de vida de *M. tuberculosis*

Un individuo con TB pulmonar expelle aerosoles cargados con *M. tuberculosis*, los que al ser inhalados por personas cercanas son fagocitados por los macrófagos alveolares. Mientras, los macrófagos de individuos inmunocompetentes controlan eficazmente la proliferación del bacilo, éste crece rápidamente dentro de los macrófagos de hospederos inmunocomprometidos, progresando hacia una tuberculosis primaria activa. En algunos casos ocurre diseminación hematológica del patógeno, permitiendo su establecimiento con

diversos destinos por todo el organismo, de preferencia en un sistema retículo-endotelial abundante y con alta tensión de oxígeno, y eventualmente con la ocurrencia de TB extrapulmonar (Van Cravel y col., 2002; Knechel, 2009).

En el 95% de los casos, los hospederos inmuno-competentes controlan la infección primaria, ya que forman un granuloma, el cual encierra al bacilo y controla su proliferación (Van Cravel y col., 2002; Knechel, 2009); sin embargo, el patógeno nunca es erradicado del organismo (infección persistente), razón por la cual el *M. tuberculosis* se considera como el patógeno bacteriano más hábil en el establecimiento y mantenimiento de un estado de latencia con una opción de reactivación en el futuro (Van Cravel y col., 2002). Se estima que individuos con infección latente y sin factores de riesgo asociados tienen 2 a 23% de riesgo de desarrollar en toda su vida una reactivación a largo plazo de la TB. Por el contrario, individuos co-infectados con VIH o inmuno-comprometidos, por otra causa, tienen un riesgo de 5 a 10% anual de reactivación (Maulen, 2011).

Los factores que influyen sobre la habilidad inicial del *M. tuberculosis* de replicar o alternativamente establecer una infección persistente, con una oportunidad de reactivación en el futuro, son aún desconocidos; dicho conocimiento es clave para comprender la patogénesis de *M. tuberculosis* a nivel molecular (Maulen, 2011).

4.2.- La inmunopatología de la Tuberculosis.

La TB es considerada como una infección bacteriana crónica, caracterizada por la formación de granulomas en los tejidos comprometidos y relacionada con hipersensibilidad mediada por células. Aunque los pulmones son los órganos afectados por excelencia, se considera que es una entidad sistémica, cuya evolución natural conduce a un síndrome

crónico de deterioro, que en caso de no ser tratada adecuadamente o de abandonar el tratamiento, la patología es más severa y puede conllevar a la muerte.

El *M. tuberculosis* es un bacilo delgado, ácido resistente, de forma ligeramente curvada, con una longitud que oscila entre 1 y 4 micras. Al microscopio, los conglomerados bacilares adquieren una forma característica, descrita como “en cuentas de rosario” y las propiedades estructurales de la pared bacteriana hacen que sea poco vulnerable a la acción de los agentes antimicrobianos de uso corriente y a los mecanismos de defensa naturales del hospedero (Rivas y col., 2005).

La respuesta inmunitaria controla, pero no elimina al patógeno. La falta de una respuesta inmunitaria apropiada, da como resultado una TB aguda activa. En la mayoría de los casos de infección por *M. tuberculosis*, el individuo permanece asintomático y no infeccioso. Esta latencia clínica a menudo se extiende durante toda la vida del individuo. Sin embargo, la reactivación de la infección latente puede ocurrir en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmunitaria, produciendo enfermedad activa (Rivas y col., 2005).

En animales de experimentación se han identificado genes específicos que determinan una mayor susceptibilidad a la infección; por ejemplo, los ratones con una deficiencia congénita del receptor para INF- γ , son muy susceptibles a la infección tuberculosa, los animales homocigotos para dicho defecto genético experimentan una forma mucho más agresiva de la enfermedad. La importancia del INF- γ también ha sido puesta de manifiesto en pacientes con alteraciones genéticas del receptor de INF- γ (INF- γ R), al mostrar que estas personas tienen una gran susceptibilidad a infecciones

diseminadas y que los monocitos y/o macrófagos (MN/ MΦ) no pueden ser activados adecuadamente (Jouanguy y col., 1999).

4.3.- La Vacuna BCG.

La vacuna del BCG está compuesta por una cepa atenuada del *Mycobacterium bovis* utilizada como vacuna contra la tuberculosis desde 1921 (Van Cravel y col., 2002). La BCG protege a los niños con más de 80% de eficacia contra formas severas de la TB. Sin embargo, la protección contra la TB pulmonar en adolescentes y adultos oscila entre 0 y 80 %. Los respondedores altos no presentan signos clínicos de la enfermedad y comprenden al 95% de la población que controla la infección sin necesidad de vacuna. El 5% restante son los respondedores bajos, que desarrollan tuberculosis activa e incluso mueren de ella. Una nueva vacuna podría bajar a 1% este grupo. El motivo de esta heterogeneidad no se conoce bien pero se atribuye a las diferencias entre las cepas utilizadas tradicionalmente como vacuna, así como a las diferencias nutricionales y genéticas de los individuos, siendo ninguna mutuamente excluyente (Van Cravel y col., 2002; Dannenberg, 2010).

La BCG comprende a varias subespecies que exhiben diferencias en su fenotipo, propiedades bioquímicas y virulencia residual (Liu y col., 2009). Todas las cepas vacunales actuales derivan del aislado original de *M. bovis* que Calmette y Guérin sometieron a numerosos ciclos de atenuación durante el periodo de 13 años de 1909 a 1921. En países por medio de cultivo posteriores, en diferentes condiciones de laboratorio, se obtuvieron diversas cepas nuevas del BCG con diferencias fenotípicas y genotípicas (Who, 2007). En Venezuela se administra actualmente la cepa Danesa 1331 (Panvini y col., 2012).

La administración intradérmica de forma correcta de las vacunas BCG ocasiona casi siempre reacciones locales menores (eritema, esclerosis, dolor con la palpación) seguidas frecuentemente por la formación de una pequeña úlcera en el lugar de inyección. La edad y estado inmunitario del vacunado, la habilidad del administrador de la vacuna, y la cepa y dosis de la vacuna BCG administrada pueden influir en la intensidad de estas reacciones. Al cabo de pocos meses, la reacción local genera una pequeña cicatriz. La presencia de una cicatriz típica se utiliza como indicador de vacunación antituberculosa anterior, pero no es un indicador de inmunidad contra la tuberculosis. En los países con carga de morbilidad alta, se aconseja la vacunación contra la tuberculosis de los niños que no tengan la cicatriz característica (Who, 2007).

4.4.- La co-infección Tuberculosis/VIH.

La infección por VIH ha contribuido significativamente al incremento de la TB en el mundo a fines del siglo XX y en el nuevo milenio. Las personas VIH positivas tienen 50 veces más probabilidad de desarrollar TB activa que los VIH negativos, en razón al compromiso inmunológico resultante de la afinidad del virus por la molécula CD4 de los linfocitos T cooperadores (Peñuela y col., 2006). Se calcula que en 2011, de los 8,7 millones de personas que contrajeron la tuberculosis en todo el mundo, 1,1 millones (13%) vivían con el VIH. De entre todas las personas con tuberculosis que recibieron el resultado de las pruebas del VIH en ese año, un 23% obtuvo un diagnóstico positivo (Onusida, 2012).

La muerte por TB puede ocurrir ya sea por reactivación de infección latente o por una nueva infección. Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra latentemente infectada con *M. tuberculosis*. En una población VIH negativa, el 5% de

personas infectadas con *M. tuberculosis* desarrollarán TB primaria dentro de los dos primeros años luego de la exposición y, otro 5% desarrollará TB post-primaria en cualquier momento de la vida. En contraste, los sujetos co-infectados por VIH y *M. tuberculosis* poseen un riesgo anual de reactivación de infección latente por *M. tuberculosis*, del 5-10%. Los sujetos infectados por VIH también se encuentran en riesgo más alto de desarrollar una nueva infección por *M. tuberculosis*, en comparación a la población VIH-negativa. Así mismo, los sujetos VIH⁺ expuestos a *M. tuberculosis* tienen mayor probabilidad de desarrollar enfermedad y menor probabilidad de desarrollar infección latente. Además de ello, los sujetos VIH⁺ tienen mayor probabilidad de desarrollar infección por *M. tuberculosis* en sitios extrapulmonares (Fanlo y col., 2007).

En áreas de alta prevalencia, *M. tuberculosis* es una importante causa de infección respiratoria crónica en niños con VIH. La coinfección de *M. tuberculosis* y VIH resulta en un rápido deterioro de disfunción inmune, replicación viral y progresión de la enfermedad por VIH y, muy frecuentemente, en otras infecciones severas (Gutierrez y col., 2006). La enfermedad cavitaria pulmonar, diseminación extrapulmonar o patrón miliar ocurren más frecuentemente en niños infectados con VIH. La respuesta al tratamiento antituberculoso estándar es muy pobre en niños infectados con VIH en comparación con los no infectados y con picos muy altos de mortalidad (Gutierrez y col., 2006).

En resumen, el panorama que se ha expuesto sobre la co-infección TB/VIH, refleja una enorme complejidad para su estudio, del cual hay numerosos tópicos que son pocos conocidos y requieren de mayor investigación para su mejor comprensión. Ejemplo de esto último, son los pocos trabajos que se han realizado para estudiar si niños VIH⁺ cuando son

tratados con el TAAE, son capaces de desarrollar una respuesta de inmunización al ser vacunados con la BCG. Tema de sumo interés clínico ya que permite al médico tratante saber si estos niños están siendo protegidos contra la TB al ser vacunados y con la TAAE están recuperando su sistema inmunológico del daño causado por el VIH. Es por ello que este trabajo de investigación se encuentra focalizado en este último punto, que ha sido de sumo interés para los médicos del Hospital de niños JM de los Ríos.

III. - OBJETIVOS.

Objetivo General.

Evaluar la respuesta inmunológica de los linfocitos TCD8 de pacientes pediátricos VIH⁺ bajo 22 meses de Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia frente a la vacuna BCG.

Objetivos específicos.

- Evaluar la relación CD4⁺/CD8⁺ en sangre periférica de pacientes pediátricos VIH⁺ bajo TAAE
- Evaluar la expresión *ex vivo* de moléculas FAS, PD-1, CD127 en linfocitos TCD8 de pacientes pediátricos VIH⁺ a lo largo de 22 meses bajo TAAE y cuantificar la apoptosis *ex vivo* de estos linfocitos
- Purificar los linfocitos Treg de CMSP de los pacientes y controles
- Evaluar la proliferación linfocitaria y la producción de perforina intracelular *in vitro* de linfocitos TCD8 en presencia/ausencia de linfocitos Treg bajo estimulación de BCG y la partícula viral GAG.
- Evaluar en plasma e *in vitro* la producción de citocinas Th1/Th2 de PMBC de pacientes pediátricos VIH⁺ en presencia/ausencia de linfocitos Treg bajo estimulación de BCG y la partícula viral GAG.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS:

Para el desarrollo de este trabajo especial de grado desarrollamos un protocolo de investigación el cual se resume en la figura 7.

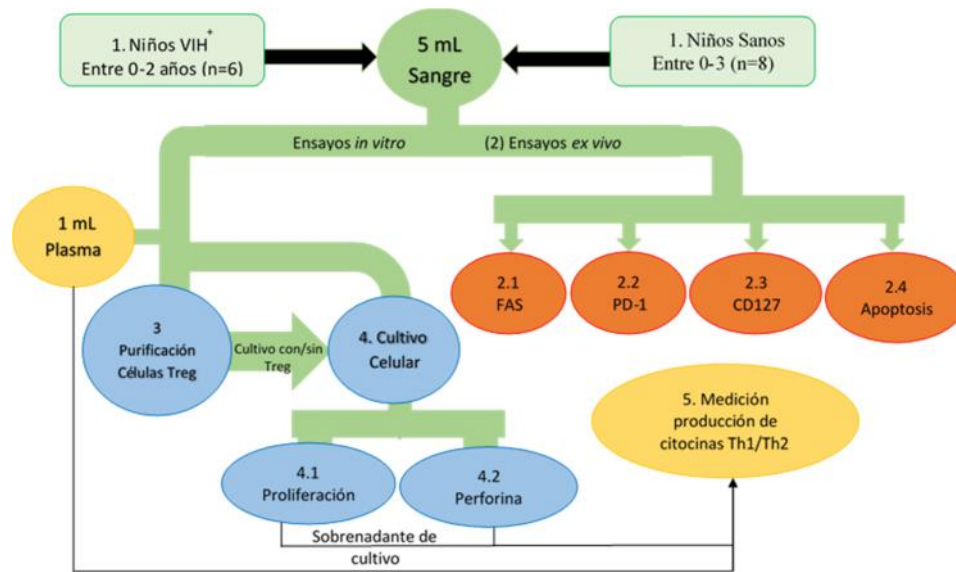


Fig. 7. Esquema de desarrollo del protocolo de ensayos ex vivo e in vitro

4.1.- Grupo de estudio

Utilizamos muestras de sangre periférica (5 mL) proveniente de niños sanos e infectados con el VIH, referidos por el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital “J.M. de los Ríos” (Caracas), aprobado por el comité de Bioética del Hospital, y cuyos padres aceptaron voluntariamente participar en el estudio y firmaron el documento de consentimiento (anexo). El grupo de estudio estuvo comprendido por niños infectados con VIH por transmisión vertical. Contamos con la participación de 6 niños infectados. Estos niños eran vírgenes al TAAE, es decir que no habían recibido tratamiento antirretroviral, ni presentaban sintomatología de TB activa.

Las edades de los niños sanos que conformaban el grupo control (n=8) osciló entre 0 y 3 años de edad y para los niños infectados con VIH el rango de edad establecido fue de 0 a 2 años.

Las muestras de sangre de los pacientes para la realización de los ensayos *ex vivo* e *in vitro* fueron tomadas inicialmente antes de comenzar el tratamiento, en lo que designamos día 0 (D0), seguido por una segunda toma al segundo mes del tratamiento (M2) y posteriormente las tomas de muestras sanguíneas se realizaron cada 4 meses hasta cumplir los 22 meses del estudio. Las muestras correspondientes al mes 18 no se lograron recolectar debido a la inasistencia de los niños al control médico.

Los ensayos *ex vivo* e *in vitro* fueron realizados el mismo día de extracción de la muestra.

4.2.- Ensayos *ex vivo*.

La carga viral de los niños infectados nos fue informada por el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital J.M. de los Ríos.

La identificación de las subpoblaciones linfocitarias se realizó mediante citometría de flujo, con el uso de una batería de anticuerpos monoclonales asociados a fluorocromos (Becton Dickinson, BD, USA) (ratón anti-CD3- humano PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC ó ratón anti-CD8 humano-APC, ratón anti-CD45RA humano-FITC, ratón anti-CD45RO humano-PE, 1 µL de cada uno) y 50µL de sangre total de niños infectados y de niños sanos. Las muestras conjugadas con los anticuerpos fueron incubadas durante 30 min en oscuridad y luego se agregaron 450 µL de solución de lisis ("FACS Lysing Solution", BD) y se incubaron durante 15 minutos para eliminar los glóbulos rojos. Este procedimiento se realizó por

duplicado. Después del proceso de lisis, procedimos a lavar la muestra (1000g por 5min) y resuspendimos en 300 μ L de solución tampón PBS. Por ultimo realizamos el análisis y cuantificación de las subpoblaciones celulares mediante citometría de flujo (BD FACSCalibur con software CellQuest), con una adquisición aproximada de 20.000 eventos por muestra.

4.2.1.-Medición *ex vivo* del receptor Fas en linfocitos TCD8

La molécula de superficie Fas (CD95), interviene en el proceso de apoptosis de los linfocitos cuando han sido activados y han proliferado en respuesta a una inducción antigénica. Fas es una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado (Ibelgaufits, 2012). Se ha reportado que en el contexto de la infección por VIH, la expresión de Fas se ve aumentada (Algeciras y col., 1998; Fluor y col., 2007).

Para medir la expresión de esta molécula en la subpoblación de linfocitos TCD8 totales, vírgenes y memoria de los niños infectados y el grupo control, procedimos a agregar 1 μ L de los siguientes anticuerpos monoclonales acoplados a fluorocromos (Becton Dickinson, BD, USA): CD3-PerCP, CD8-APC, CD45RO-PE, Fas-FITC a 50 μ L de sangre periférica y dejamos incubando por 30 min en oscuridad. Luego lisamos los glóbulos rojos con 450 μ L de solución de lisis ("FACS Lysing Solution" de BD) por 15 minutos y posteriormente procedimos a lavar las células a 1000g durante 5 min (el proceso de lisis y lavado se realizó por duplicado), finalmente resuspendimos las células en 300 μ L de PBS, para realizar el análisis por citometría de flujo.

4.2.2. - Medición *ex vivo* del receptor PD-1 en linfocitos TCD8

La PD-1 es una molécula de superficie también conocida como CD279, es un co-estimulador que da una señal inhibitoria, es un importante regulador negativo de la actividad y tolerancia periférica de los linfocitos T (Vargas-Rojas y col., 2008).

Para medir la expresión PD-1 en la subpoblación de linfocitos TCD8 totales, vírgenes y memoria de los niños infectados y el grupo control, procedimos a agregar 1 µL de los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos (Becton Dickinson, BD, USA): CD3-PerCP, CD8-APC, CD45RO-PE, PD-1-FITC a 50 µL de sangre periférica y dejamos incubando por 30 min en oscuridad y posteriormente procedemos a realizar el protocolo como esta descrito en el apartado 4.2.1.

4.2.3. Medición *ex vivo* de la molécula de superficie CD127 en linfocitos TCD8

La proteína CD127 (IL-7 α) se encuentra en la superficie celular y es la subunidad alfa del receptor de la molécula IL-7. Es de suma importancia en el desarrollo y supervivencia de las células linfocitarias. En el contexto de la infección por VIH su expresión se ve alterada (Tan y col., 2001; Wang y col., 2005).

Para medir la expresión de la proteína de superficie CD127 en la subpoblación de linfocitos TCD8 totales, vírgenes y memoria de los niños infectados y el grupo control, procedimos a agregar 1 µL de los siguientes anticuerpos monoclonales con fluorocromos (Becton Dickinson, BD, USA): CD3-PerCP, CD8-APC, CD45RO-PE, CD127- FITC a 50 µL de sangre periférica y dejamos incubando por 30 min en oscuridad y continuamos el protocolo como esta descrito en el apartado 4.2.1.

4.2.4. - Medición *ex vivo* de la apoptosis en linfocitos TCD8

La apoptosis es una forma de muerte celular caracterizada por retracción citoplasmática con fragmentación nuclear (cariorrhexis) desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o de la interacción con otras células (Corbeil y col., 1995; Chavan y col., 1999).

La annexina-V es una proteína que se une específicamente al fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesto en la cara externa de dicha membrana cuando comienza el proceso de apoptosis. El marcaje con annexina V (acoplada a un fluorocromo, en nuestro caso -FITC) conjuntamente con el ioduro de propidio (usado como colorante supravital) que es capaz, por sí mismo de emitir fluorescencia detectable por el citómetro de flujo y a su vez permite la diferenciación de las células viables de las células apoptóticas tempranas y de las necróticas.

Para la detección del porcentaje de apoptosis en los linfocitos T CD8, se realizó un protocolo similar al utilizado para la determinación de las moléculas Fas, PD-1 y CD127. En este caso la combinación de anticuerpos monoclonales y reactivos que se utilizó fue: CD3-PerCP, CD8-APC, Annexina-V-FITC, Ioduro de propidio- PE, con la adición de una solución amortiguadora (Buffer de unión, BD) que permite que las células presentaran una concentración de calcio óptima para facilitar la interacción entre residuos de fosfatidilserina con la molécula Annexina-V.

4.3. - Ensayos *in vitro*

4.3.1. - Purificación de linfocitos T reguladores de sangre periférica.

A partir de muestras de sangre periférica de niños sanos e infectados con el VIH se procedió a purificar las CMSP. Para llevarlo a cabo, se empleó la solución Histopaque 1077

(Sigma) para generar un gradiente de densidad mediante centrifugación lo que permitió el aislamiento de las CMSP. El método consistió en la separación de las partículas en función de su densidad de flotación a través de la centrifugación por un tiempo de 30 min y a una velocidad de 500g. Las CMSP permanecieron entre el plasma y la solución HISTOPAQUE, mientras que los eritrocitos y los granulocitos gravitaron hacia el fondo. Una vez fuera de la centrifuga y estando bien definidas las distintas capas de densidad, se procedió a extraer el anillo o capa correspondiente a las células mononucleares, las cuales se lavaron dos veces con PBS y se contaron en el último lavado en una cámara de Neubauer en presencia de azul de tripano ("Trypan Blue") (Sigma). Dado que las células son muy selectivos en los compuestos que pasan a través de la membrana, en una célula viable el azul de tripano no atraviesa la membrana pero si puede hacerlo en una célula muerta. Por lo tanto, las células muertas se muestran como un distintivo color azul bajo microscopio.

Previamente una alícuota de 1 mL de plasma sanguíneo fue almacenada a -80°C para la posterior determinación de citocinas Th1/Th2.

Una vez purificada las CMSP, se procedió a purificadas los linfocitos T reguladores mediante el uso de columnas y microperlas magnéticas. Este método consiste en el empleo de anticuerpos monoclonales (AcMcs), unidos a perlas magnéticas, para reconocer componentes específicos de un tipo celular de interés y así separarlo de una muestra compleja.

Se purificaron los linfocitos Treg naturales utilizando el fenotipo $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low}}$, con el uso de anticuerpos asociados a microperlas magnéticas y columnas magnéticas, y solución amortiguadora (PBS+5%SBF+EDTA) (MACS Miltenyi

Biotec). La tecnología MACS para la separación a través de columnas, está basada en el uso de microperlas MACS, columnas MACS y separadores MACS. Como las microperlas son extremadamente pequeñas, un gran campo magnético es requerido para retener las células marcadas. Las columnas MACS contienen una matriz óptima para generar este campo magnético cuando se coloca en un imán permanente como el separador MidiMACS.

La purificación de linfocitos Treg se realizó en dos etapas. La primera, consistió en la selección negativa de células TCD4⁺CD127^{low} y una segunda etapa por selección positiva de una fracción de células TCD4⁺CD25^{high}CD127^{low}. Para ello, a partir de las CMSP previamente purificadas, se lavaron y resuspendieron en 40µL de solución amortiguadora, para luego incubar con 10 µL de anticuerpos biotinados (anti-CD8, CD19, CD123 y CD127), durante 30 min a 4°C. Seguido se lavaron las células y se incubaron con anticuerpos anti-biotina con microperlas magnéticas (10µL). Por último se realizó un lavado y se resuspendió la mezcla celular en 500µL de solución amortiguadora para la separación por la primera columna. En esta columna se van obtener dos fracciones: por selección positiva CMSP con alta expresión de CD127 (F2), y por selección negativa los linfocitos TCD4⁺CD127^{low} (F1).

La fracción F1 fue lavada e incubada con microperlas magnéticas conjugadas con anticuerpos anti-CD25 (10µL) durante 30 min a 4°C. Seguidamente se centrifugaron las células (a 1000g por 5 minutos) y se resuspendieron en 500µL de solución amortiguadora para la separación por la segunda columna. En este procedimiento se obtendrá por selección positiva la fracción de linfocitos Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) (Treg⁺ naturales) y por selección negativa a los linfocitos Treg⁻. Para comprobar el proceso de purificación de los linfocitos Treg, se realizó la determinación del fenotipo de cada una de las fracciones

obtenidas, las cuales fueron: CMSP, F1, F2, Treg⁺ y Treg⁻ (ver tabla 2). Para ello, 50µL de cada fracción se incubaron con una batería de anticuerpos (anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD25-FITC y anti-CD127-PE), las cuales fueron analizadas por citometría de flujo.

Tabla 2. Fracciones celulares obtenidas en cada etapa de purificación

Fracción Celular	Constitución
Células	Células Mononucleares
F1	T CD4+CD127 ^{low}
F2	CD4; CD8; CD19; CD123; CD127
Treg⁺	CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}
Treg⁻	CD4 ⁺ CD25 ^{low} CD127 ^{low}

4.4.-Cultivo de las CMSP y linfocitos T reguladores

Evaluamos algunos parámetros funcionales de linfocitos TCD8 frente a varios estímulos dados por la presencia de antígenos y mitógenos. El cultivo celular fue realizado durante 72 horas en condiciones estándar y a una concentración de 100.000 células/pozo de la fracción F2 obtenida de la columna 1 anteriormente descrita, en aquellos cultivos sin células Treg, y 100.000 células/por pozo de esta fracción F2 más 5.000 células Treg autólogas purificadas (ver Tabla 3). Se realizaron por triplicado por cada condición estudiada. El medio de cultivo que se utilizó es RPMI-1640 (Gibco), el mismo fue suplementado con: suero fetal bovino (10%) (Gibco), 1% amortiguador Hepes 1 M (Gibco), 1% de piruvato de sodio (Sigma), 2% aminoácidos esenciales (Gibco), 1% Glutamina 200 mM (Gibco), 1% Penicilina 1x10⁴ U/mL (Gibco).

Tabla 3. Condiciones de Cultivo Celular.

Población cultivada	Células solas	PHA (5 µg/ml)	BCG (10 µg/L)	Gag (1 µg/L)
F2	10 ⁵ cel/pozo	10 ⁵ cel/pozo	10 ⁵ cel/pozo	10 ⁵ cel/pozo
F2	10 ⁵ cel/pozo	10 ⁵ cel/pozo	10 ⁵ cel/pozo	10 ⁵ cel/pozo
+Treg⁺	+5*10 ³ cel/pozo	+5*10 ³ cel/pozo	+5*10 ³ cel/pozo	+5*10 ³ cel/pozo

Las condiciones de estimulación son las siguientes: PHA (Fitohematoglutina, SIGMA) (5 µg/ml, concentración final), el cual es un mitógeno de linfocitos T y se utilizó como control positivo, la vacuna BCG (10 µg/L, Instituto Pasteur) y la proteína viral Gag (1µg/L, BD). El control negativo fue en ausencia de estímulo. Después de las 72 horas, extrajimos la alícuota de sobrenadante de los cultivos destinados para la determinación de citocinas Th1/Th2 y fueron almacenadas a -80°C hasta el momento de su análisis.

4.4.1.- Determinación de la proliferación celular de linfocitos TCD8

Para determinar la tasa de proliferación de los linfocitos TCD8, luego de las 72 horas de cultivo se agregó a los pozos bromodeoxiuridina (BrdU) a una concentración final de 10µM y se dejó incubando entre 4 y 6 horas. Durante este tiempo las células que se encontraban en la fase S del ciclo celular tuvieron la posibilidad de incorporar BrdU al interior y utilizarlo en lugar de timidina como deoxinucleotido en la síntesis de ADN. Posteriormente se agregó paraformaldehído al 4% en PBS por 15 min para fijar la muestra, para luego por otros 15 min y permeabilizar a las células con saponina al 5% en PBS con suero fetal bovino. Con ello se busca el ingreso hacia el interior celular del anticuerpo monoclonal anti-BrdU-FITC (conjugado con una DNasa), además, se agregaron los anticuerpos anti-CD3-PerCP y anti-CD8-APC. La incubación de los anticuerpos se realizó por 30 minutos en oscuridad. Por último, la cuantificación del porcentaje de células T en el

cultivo que proliferaron en respuesta a estimulación PHA, BCG y Gag, se realizó por citometría de flujo.

4.4.2. - Medición *in vitro* de Perforina intracelular de células TCD8

Para determinar la producción intracelular de perforina en los linfocitos T CD8, luego de las 72 horas de cultivo se agregó a los pozos Brefeldina A (inhibidor de la exocitosis celular) por un periodo entre 4 y 6 horas. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas por 15 minutos en paraformaldehído al 4% en PBS, para luego por otros 15 min permeabilizar a las células con saponina al 5% en PBS con suero fetal bovino. Después se incubaron las células con una serie de anticuerpos (CD3-PerCP, CD8-APC, Perforina-PE). Transcurrido los 30 minutos de incubación en oscuridad, procedimos a lavar las células con PBS y resuspender en 300 μ L de PBS para su posterior análisis en el citómetro de flujo.

4.5.-Determinación *in vitro* de citocinas Th1 y Th2 de plasma y sobrenadantes de CMSP en cultivo

A partir del plasma y sobrenadantes de cultivo de CMSP (en presencia o ausencia de linfocitos Treg autólogos) por 72 horas, se realizó la cuantificación simultánea de varias citocinas Th1 y Th2 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, TNF- α e INF- γ) por la técnica de citometría de flujo, según las instrucciones de un kit comercial (“CBA Cytometric Bead Array” de Becton Dickinson, San Diego, C.A.). El protocolo incluye la utilización de 6 poblaciones de perlas diferentes, las cuales están unidas cada tipo con anticuerpos específicos para cada citocina antes mencionada. Cada población de perlas además contiene un fluorocromo que emite fluorescencia con variable intensidad, según la citocina Th1/Th2 de reconocimiento para la cual fue diseñada. La incubación con un segundo anticuerpo, cuya fluorescencia se

detectará en el citómetro, nos reportó una medida de la concentración de cada citocina de la muestra. Para ello el “Kit” o estuche incluye reactivos estándares para la elaboración de las curvas de calibración que permitió la realización de los cálculos. Previamente se realizó una curva de calibración, mediante la cual se pueden calcular las concentraciones reales de citocinas presentes en la muestra posteriormente.

4.6. -Análisis Estadístico

La comparación de los promedios encontrados entre los grupos de estudio (niños sanos y niños VIH⁺) se realizó por medio de la prueba *ANOVA de una vía*, para aquellos datos que se distribuyeron en forma normal. Para aquellos casos que no superaron la prueba de normalidad *Shapiro-Wilk*, la comparación entre grupos se llevó a cabo aplicando la prueba de *Kruskal-Wallis*. Las correlaciones entre diferentes parámetros obtenidos mediante los ensayos *in vitro* se analizaron por la prueba de comparación múltiple *Holm-Sidak*. Las pruebas se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de *p* fueron menores a 0,05. Todos los análisis estadísticos de los datos fueron realizados a través del uso del programa *SigmaPlot 12* para Windows.

VI. - RESULTADOS

De los 6 niños infectados, solo 4 terminaron el estudio, de los 2 restantes no se obtuvieron más muestras para su seguimiento (dejaron de asistir a partir del mes 2 de tratamiento). Los resultados del mes 18 no se muestran debido a la muestra muy pequeña (*n*=1). La tabla 4 muestra el código que fue asignado a cada niño de estudio.

Tabla 4. Clasificación de los niños según edad, sexo y grupo. A cada niño se le asignó un código, para asegurar la confidencialidad de su identidad.

PACIENTES (CÓDIGO)	GRUPO	SEXO	EDAD
C1-AIEE	CONTROL	F	3 AÑOS
C1-MVMN1	CONTROL	F	2 AÑOS
C1-MVMN2	CONTROL	F	2 AÑOS
C1-SARM	CONTROL	F	1 AÑO
C1-DV	CONTROL	M	1 AÑO
C1-MH	CONTROL	M	1 AÑO
C1-GC	CONTROL	M	8 MESES
C1-MA	CONTROL	M	2 MESES
YOPL	VIH+	M	1 AÑO Y 6 M
DSSQ	VIH+	F	1 AÑO Y 3 M
AVMA	VIH+	F	8 MESES
ER	VIH+	F	6 MESES
DT	VIH+	M	6 MESES
SG	VIH+	M	5 MESES

Carga Viral en los niños infectados.

La prueba de carga viral mide la cantidad de ARN viral que hay en la sangre. Esta prueba ha sido una de las herramientas más importantes para saber cuándo se inicia el tratamiento antirretroviral, de igual forma, se usa comúnmente cuando la persona está bajo tratamiento, para asegurarse de que los medicamentos están funcionando correctamente.

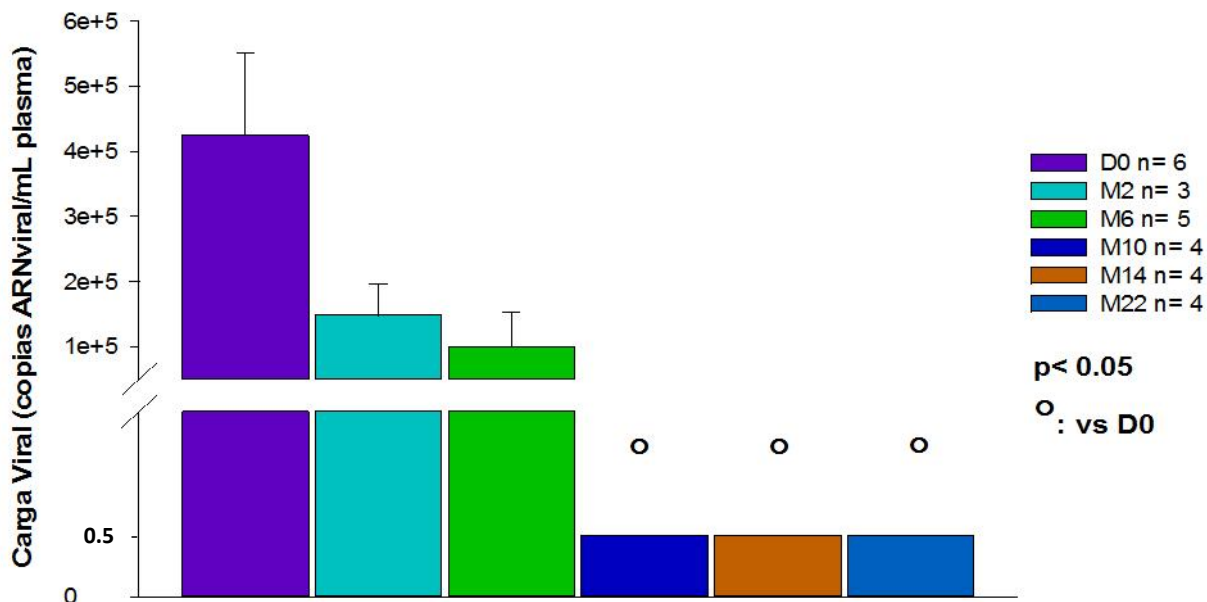


Fig. 8. Carga Viral de los Niños Infeccionados vs Tiempo de tratamiento. Los datos fueron suministrados por el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital J. M. de Los Ríos. Las barras muestran el valor promedio \pm la desviación estándar.

En la **figura nº 8** se muestra la carga viral de los niños infectados expresada en N° de copias de ARN viral por ml de plasma. Como se puede observar, la carga viral es elevada en estos niños antes de recibir el TAAE (D0) con valores por encima de la sensibilidad de prueba (>500.000 ARNv/mL de plasma), pero a medida que pasa el tiempo del tratamiento, el valor de la carga viral baja hasta llegar a valores por debajo de lo detectable (<0,5 ARNv/mL de plasma), del cual a partir del mes 10 de tratamiento los valores fueron más bajos que los del día 0.

Ensayos *ex vivo*.

Los ensayos realizados para el desarrollo de este trabajo se realizaron en dos etapas, en la primera etapa se realizaron ensayos *ex vivo* en CMSP para medir las subpoblaciones celulares y la expresión de las moléculas de superficie FAS, PD-1, e IL-7, así como el porcentaje

de apoptosis y la cantidad de linfocitos Treg en sangre. En la segunda etapa se realizaron ensayos *in vitro* mediante cultivos celulares en distintas condiciones: PHA (5 µg/ml), BCG (10µg/L) y la proteína viral Gag (1µg/L), y con ello medir proliferación y producción de perforina intracelular en linfocitos T CD8, aunado a todo ello se tomó 1 ml de plasma y de cada uno de los cultivos para realizar los ensayos de medición de citocinas Th1/Th2.

MEDICION DE SUBPOBLACIONES TCD4 Y TCD8.

Se midió la cantidad de Linfocitos TCD4 y TCD8 en sangre periférica (**fig. 9**) tanto en los niños sanos, como en los infectados. Cuando comparamos los promedios observamos que el VIH induce profundos cambios en las cantidades de estas subpoblaciones comparadas con el grupo control. Se observó la disminución significativa ($p < 0,05$) en la cantidad de células de la población TCD4 en los niños infectados antes de iniciar el TAAE (282 ± 125), con valores muy por debajo de los encontrados en los niños sanos (2060 ± 1174). Posteriormente, ya bajo el efecto del TAAE, los pacientes logran alcanzar valores comparables con los normales (22^{do} mes = 2223 ± 355), indicando la recuperación cuantitativa de esta células en estos pacientes ($p < 0,005$).

Para la subpoblación de Linfocitos TCD8 se observó un comportamiento distinto: en los niños infectados se encontró que esta población celular presentaba valores ligeramente aumentados con respecto al grupo control sin tratamiento (984 ± 486 vs 617 ± 233 , respectivamente). Sin embargo, con el TAAE se observó un incremento gradual en estas células TCD8 hasta alcanzar valores significativamente altos con respecto a los valores del grupo control para el mes 22 de tratamiento (2157 ± 150).

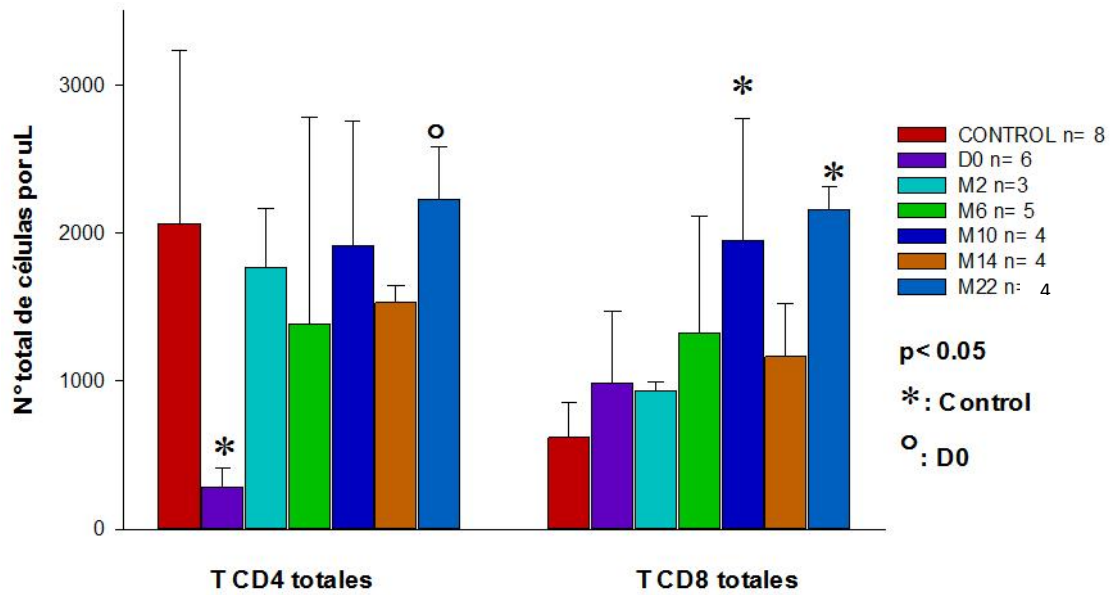


Fig. 9. N° total de células de las subpoblaciones linfocitarias TCD4 y TCD8 en sangre periférica vs tiempo de tratamiento. El N° total de células TCD4 y TCD8 se obtuvo a partir de análisis por citometría de flujo. Las barras muestran el valor promedio \pm la desviación estándar.

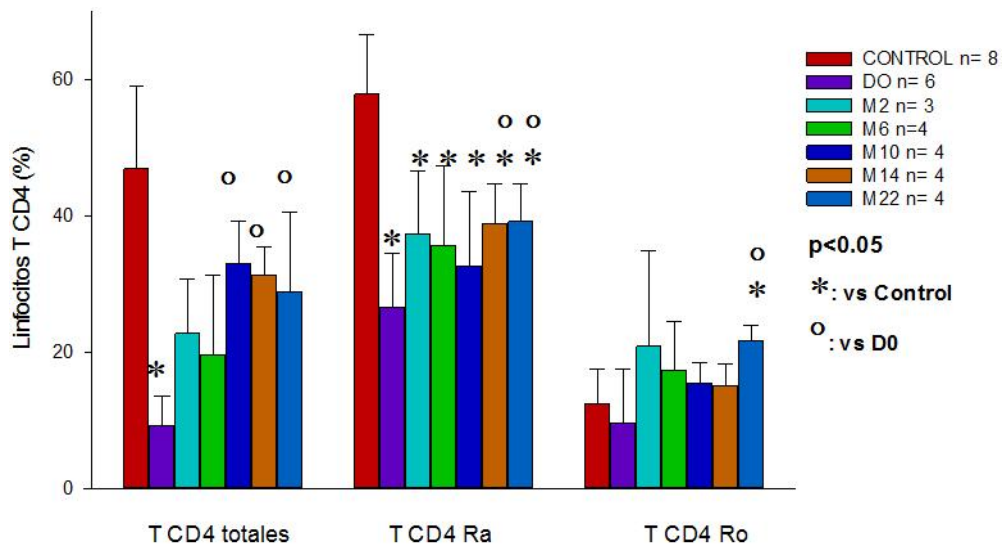


Fig. 10. Porcentaje de Linfocitos TCD4 totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) en sangre periférica vs tiempo de tratamiento. El análisis de las subpoblaciones de linfocitos TCD4 totales, vírgenes y memoria se obtuvo mediante la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD45Ra-PEy anti-CD45RO-FITC para su análisis por citometría de flujo. Las barras muestran el valor promedio \pm la desviación estándar.

En la **figura 10** se muestran los valores promedios (%) de las cantidades de linfocitos TCD4 provenientes de los niños sanos y niños infectados durante los 22 meses de

tratamiento, donde se puede observar como los niños infectados presentan una tasa de síntesis de células TCD4 totales y vírgenes significativamente baja ($p < 0,05$) antes del TAAE (Control totales= $46,83 \pm 12,21$, Control vírgenes= $57,73 \pm 8,73$, D0 totales= $9,20 \pm 4,32$; y D0 vírgenes = $26,62 \pm 7,78$). Sin embargo, estos valores aumentan a medida que avanza el tiempo, observándose diferencias estadísticamente significativas para los meses 14 y 22. No obstante, estos valores no alcanzan niveles similares a los niños sanos. En cuanto a los linfocitos TCD4 memoria (CD4CD45RO), observamos una cantidad similar entre el grupo control y los niños infectados (Control memoria= $12,4 \pm 5$, D0 memoria= $9,5 \pm 7,8$) y presenta un incremento en sus valores a medida que avanza el TAAE, alcanzándose una diferencia significativa en el mes 22 con respecto el día 0 y al grupo control ($21,57 \pm 2,29$).

Cuando analizamos los valores (%) de las células TCD8 memoria antes del tratamiento, encontramos que fueron mayores en relación a los controles (45 ± 17 vs 17 ± 7 , respectivamente) ($p < 0,05$) (**fig. 11**). Sin embargo, no se observó el mismo comportamiento en la subpoblación de TCD8 vírgenes (TCD8 Ra), las cuales presentaron menores valores significativamente con respecto a los valores de las células de los niños sanos (54 ± 18 vs 83 ± 7 , respectivamente) ($p < 0,05$).

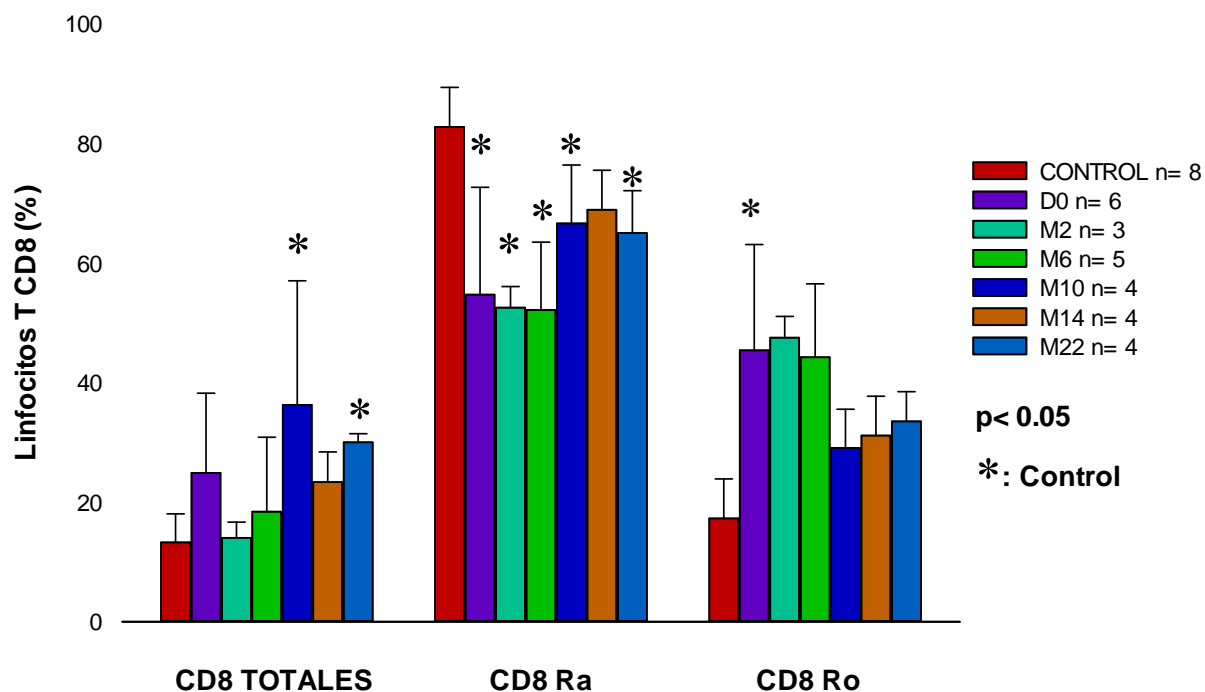


Fig. 11. Porcentaje de Linfocitos TCD8 totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) en sangre periférica vs tiempo de tratamiento. El análisis de las subpoblaciones de linfocitos TCD8 totales, vírgenes y memoria se obtuvo mediante la utilización de anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APCy anti-CD45RO-FITC para su análisis por citometría de flujo. Las barras muestran el valor promedio \pm la desviación estándar.

Con el TAAE por 22 meses se pudo determinar que no ejerció ningún efecto sobre los valores de estas subpoblaciones celulares en los niños infectados. En ninguno de los casos se observó cambios significativos entre el día 0 (D0) y los posteriores meses en los que se tomaron las muestras. A pesar que se pudo observar que para la subpoblación memoria hubo una tendencia a disminuir sus valores con respecto al D0, así como las células TCD8 vírgenes presentan un aumento en sus valores como las células totales, no llegan en ninguno de los casos ser diferentes estadísticamente significativos a los valores del día 0 respectivamente, tal como se puede ver en la figura nº 11.

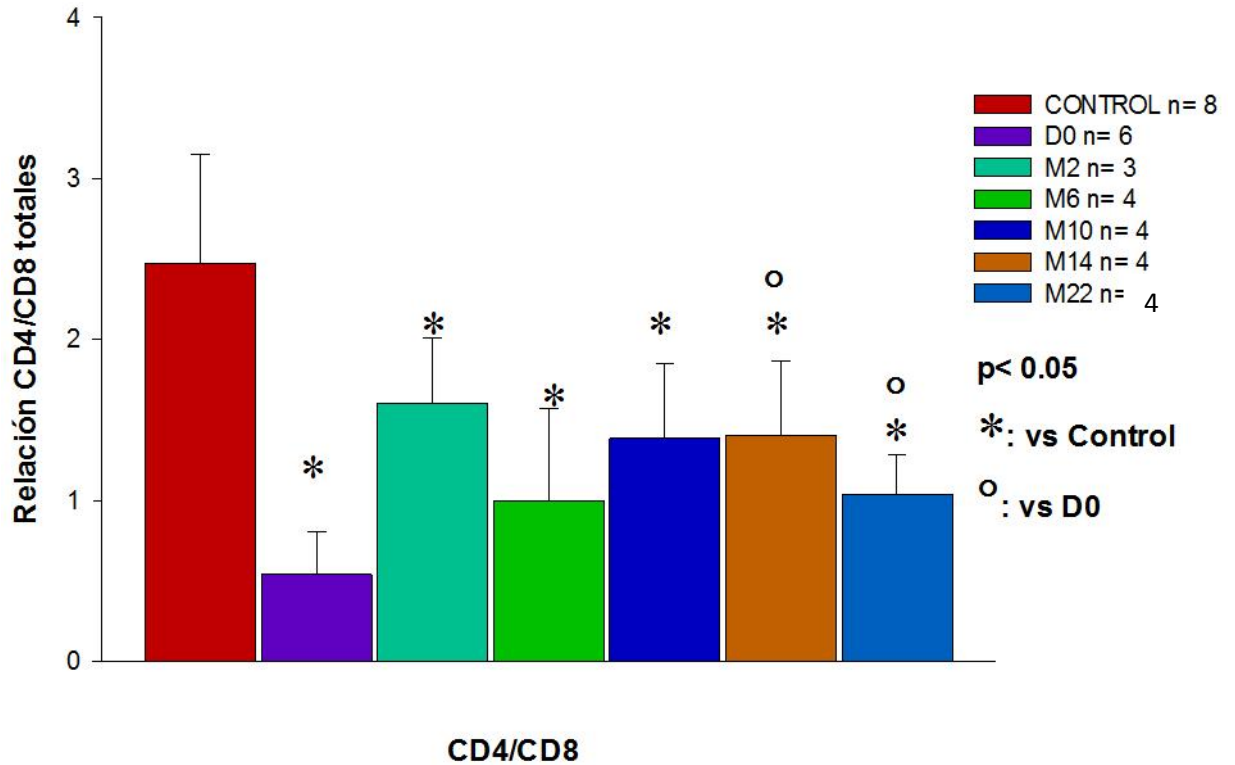


Fig. 12. Relación entre Linfocitos TCD4 y TCD8 vs el tiempo. La relación CD4/CD8 se obtuvo a partir de los valores de linfocitos TCD4 y TCD8 totales en los niños infectados y el grupo control. Las barras muestran el valor promedio \pm la desviación estándar.

La relación en sangre entre las cantidades de linfocitos TCD4 y TCD8 es utilizada como marcador diagnóstico en el avance de la infección por VIH. Los resultados obtenidos para la relación de las subpoblaciones TCD4 y TCD8, representadas en la **fig. 12** arrojan una marcada diferencia entre los niños sanos ($2,475 \pm 0,677$) y al inicio del tratamiento de los niños infectados ($0,539 \pm 0,265$) a pesar que se observa un aumento en los valores de esta relación en los niños tratados, incluso llegan a ser mayores significativamente al mes 14 y 22 comparados al día cero (D0), nunca alcanzan los valores controles durante los 22 meses de tratamiento.

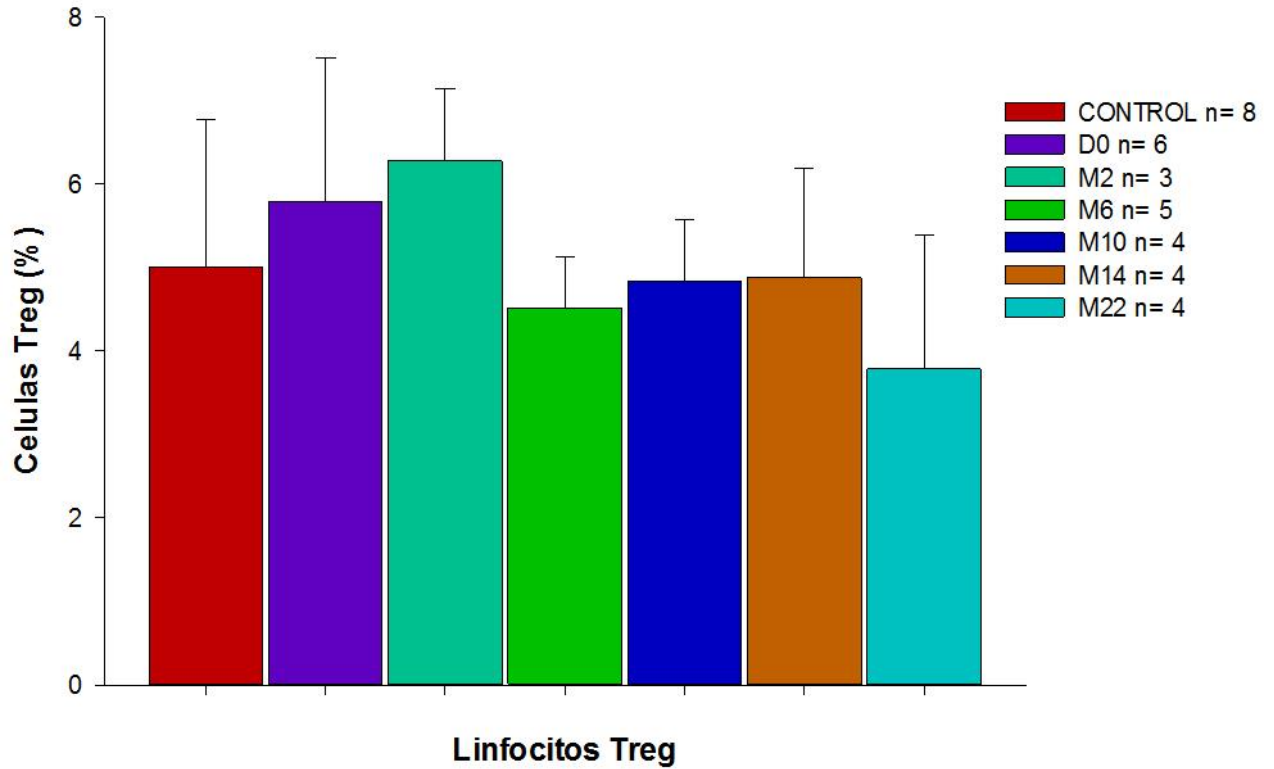


Fig. 13. Células Treg vs tiempo de tratamiento. El fenotipo de discriminación de esta población fue TCD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}. Las barras muestran el valor promedio \pm la desviación estándar.

La **fig. 13** muestra el porcentaje de linfocitos Treg en sangre tanto en niños sanos como en niños infectados a lo largo del tratamiento. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje entre los valores de los niños infectados con los de los sanos. Sin embargo, se observó una tendencia a presentar mayores valores al inicio y al mes 2 del tratamiento y posteriormente disminuye con respecto al grupo control a lo largo del TAAE.

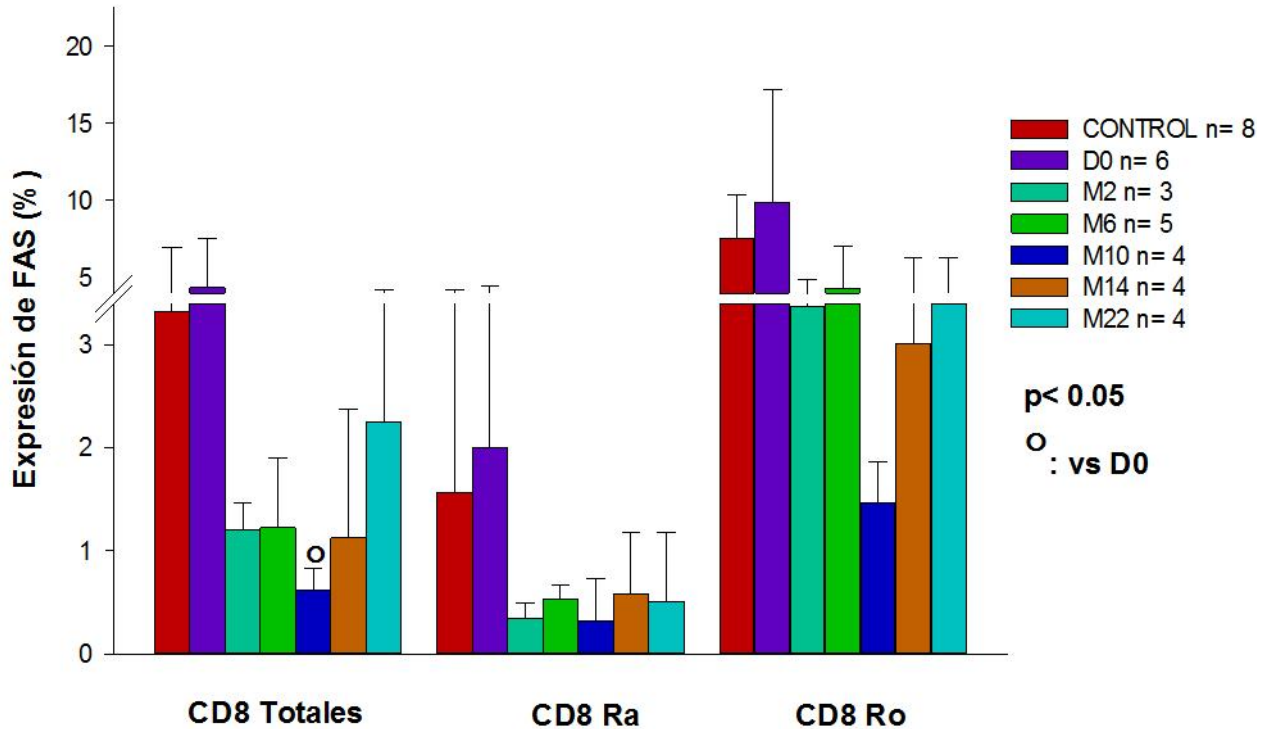


Fig. 14. Expresión de la Molécula Fas en Linfocitos TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento. Las células TCD8⁺ totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APC, anti-CD45RO-PE y anti-Fas-FITC. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

La **fig. 14** muestra los resultados obtenidos de la medición de la expresión de la molécula FAS (molécula de superficie asociada con procesos apoptóticos) en los linfocitos TCD8 de sangre periférica. Se pudo constatar que los niños infectados presentaron, en todas sus subpoblaciones de linfocitos TCD8 al inicio de su tratamiento, valores similares a los de los niños sanos y a pesar de presentar una tendencia a ser mayores, no llegaron a ser significativamente diferentes. A medida que transcurrió el tiempo de tratamiento, se pudo percibir que dichos valores bajan drásticamente en relación a los del grupo control y día 0 pero nunca llegan a ser significativa la diferencia.

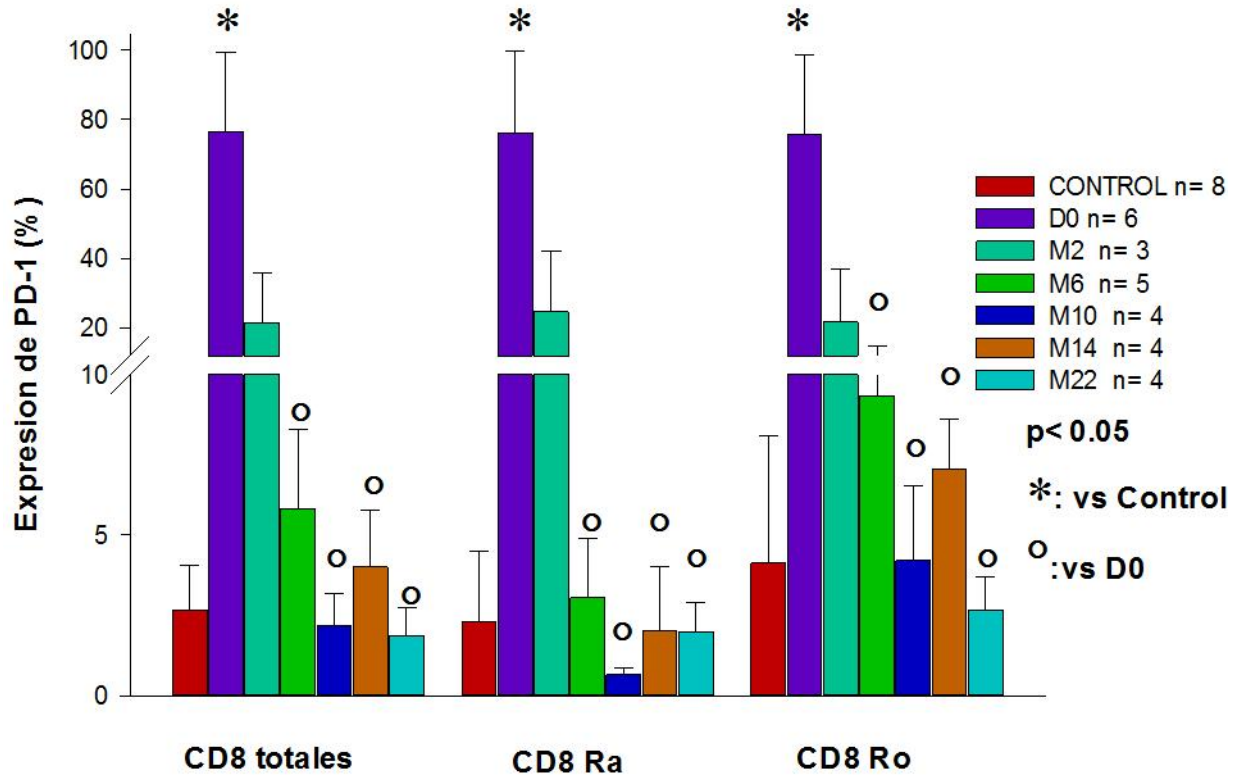


Fig. 15. Expresión de la Molécula PD-1 en células TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento. Las células TCD8⁺ totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APC, anti-CD45RA-FITC y anti-PD-1-PE. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

Tal como se observa en la **figura 15**, la molécula PD-1 (asociada a muerte celular) se expresó con valores significativamente mayores en las subpoblaciones de los linfocitos TCD8 de los niños infectados ($p < 0,05$) con respecto al grupo control antes del tratamiento. Bajo tratamiento, a partir del M2 se evidenció la disminución de estos valores con respecto a los del día 0, siendo significativa la diferencia a partir del M6, e incluso, llegan a valores similares a los del grupo control y se mantienen así hasta el mes 22 de TAAE.

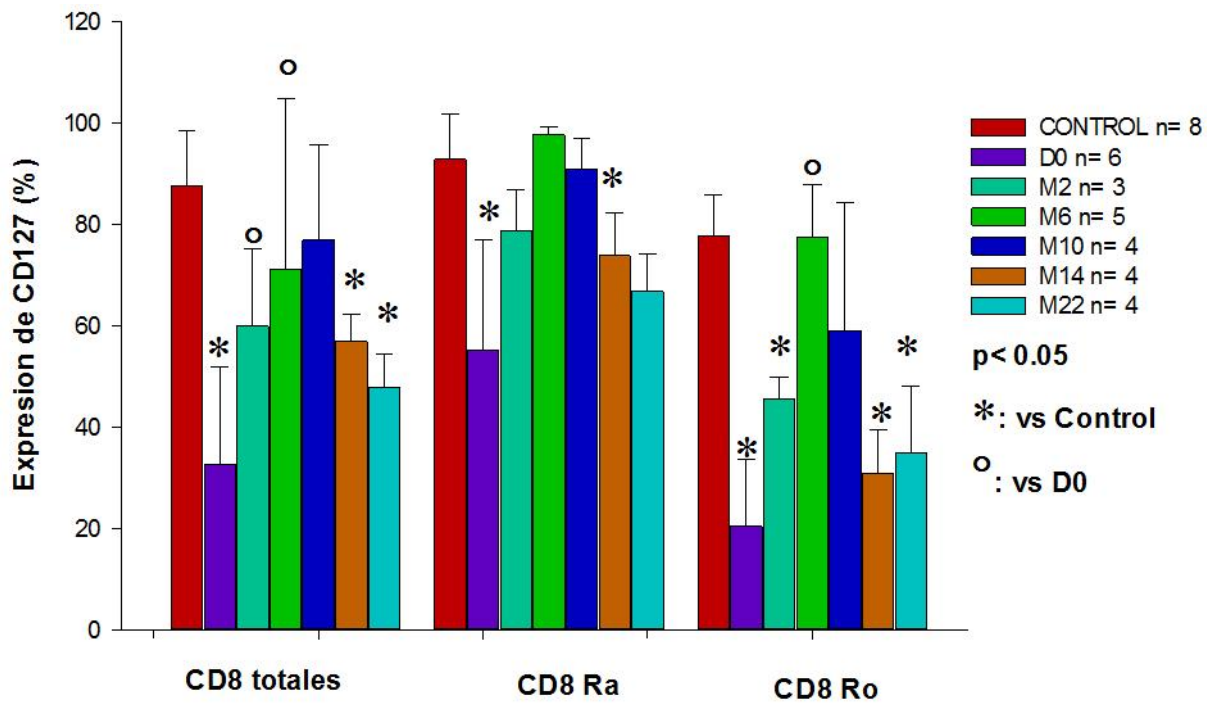


Fig. 16. Expresión de la Molécula CD127 en células TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento. Las células TCD8⁺ totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APC, anti-CD45RO-FITC y anti-IL-7-PE. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

Al analizar la expresión de la molécula CD127 (molécula de superficie relacionada con la supervivencia celular de los linfocitos T) en las subpoblaciones de células TCD8 de sangre periférica (ver **figura 16**) se pudo constatar que los valores son significativamente más bajos al inicio del tratamiento que los del grupo de niños sanos. Sin embargo, se pudo observar que con el tratamiento antirretroviral incrementó significativamente la expresión de esta molécula en todas las subpoblaciones de los linfocitos TCD8 hasta el M10, e incluso llegan a ser similares a los valores del grupo de niños sanos, pero a partir de ese mes de tratamiento, comienza de nuevo a bajar la expresión de esta molécula, de tal manera que evidencia una diferencia significativa con los valores obtenidos en las células de los niños sanos

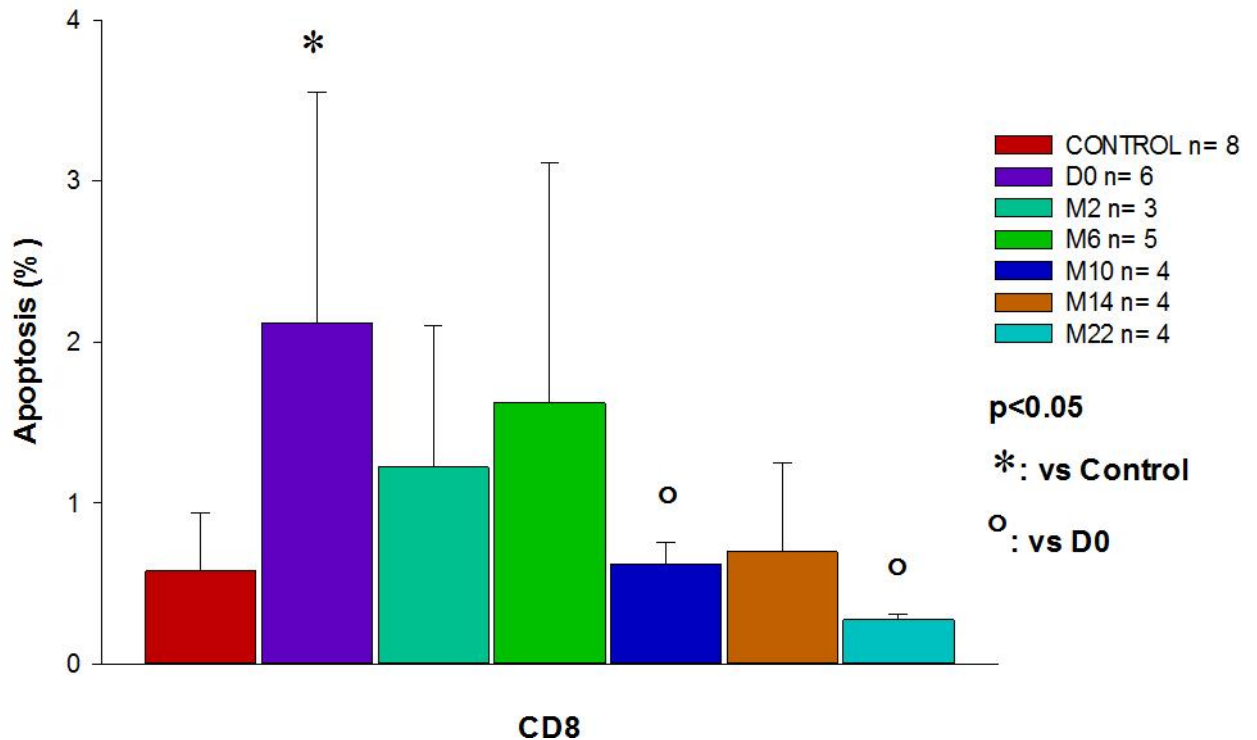


Fig. 17. Frecuencia de Apoptosis en células TCD8 de Sangre Periférica vs tiempo de tratamiento. Las células TCD8⁺ totales, vírgenes (Ra) y memoria (Ro) fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC y los reactivos Annexina-V-FITC e Ioduro de propidio. Las barras representan el promedio ± la desviación estándar para cada grupo de muestras.

La frecuencia de apoptosis en los linfocitos TCD8 totales fue medida en los ensayos *ex vivo*, cuyos resultados son mostrados en la **fig. 17**. Se obtuvo un porcentaje significativamente mayor ($p < 0,05$) en el D0 ($2,117 \pm 1,431$) con respecto a los niños sanos ($0,577 \pm 0,360$), pero al transcurrir el tiempo de tratamiento se pudo observar una marcada disminución del porcentaje de apoptosis en estas células de los niños infectados, obteniéndose diferencias significativas para los meses M10 ($0,620 \pm 0,135$) y M22 ($0,278 \pm 0,033$) con respecto al D0 ($p < 0,05$), e incluso, llegan a presentar valores similares a los de los niños sanos.

Para la realización de los ensayos *in vitro*, se procedió inicialmente purificar los linfocitos Treg para ser usados en estos ensayos. Para ello, se utilizaron columnas y microperlas magnetizadas, de las cuales los ensayos fueron realizados en dos etapas. La primera, consistió

en la selección negativa de células $CD4^+CD127^{low}$ y una segunda etapa por selección positiva de una fracción de células $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$. Se analizaron los resultados obtenidos de la purificación de los linfocitos Treg a partir de las CMSP, graficados en la figura **18**, en la cual se muestran los citogramas correspondientes a un ensayo de purificación de linfocitos Treg provenientes de las CMSP. Los análisis se realizaron en las fracciones de **CMSP**, en la fracción **F1** ($CD4^+CD127^{low}$) y la fracción **Treg⁺** ($CD4^+CD25^+CD127^{low}$) (siguiendo el orden de la tabla 2). El fenotipaje de cada una de las fracciones resultantes en el proceso de purificación se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD25-FITC y anti-CD127-PE. La **figura 18A** muestra la identificación de los linfocitos totales mediante los parámetros de dispersión frontal (FSC-Height) y lateral (SSC-Height), seguida de la identificación de linfocitos T (**Figura 18B**). Los citogramas correspondientes a la fracción de **CMSP** corresponden a las **figuras 18C, 18D, 18E y 18F**; la fracción **F1** se encuentra representada en las **figuras 18G, 18H, 18I, y 18J**; y finalmente las que corresponden a la fracción Treg⁺ son las **figuras 18K, 18L, 18M y 18N**. Logramos observar que el protocolo utilizado para la purificación de la subpoblación Treg a través de estas 3 fracciones resultó finalmente en un buen grado de enriquecimiento de las subpoblaciones $CD4^+$, $CD4^+CD127^{low}$, $CD4^+CD25^{high}$ y Tregs ($CD4^+CD127^{low}CD25^{high}$).

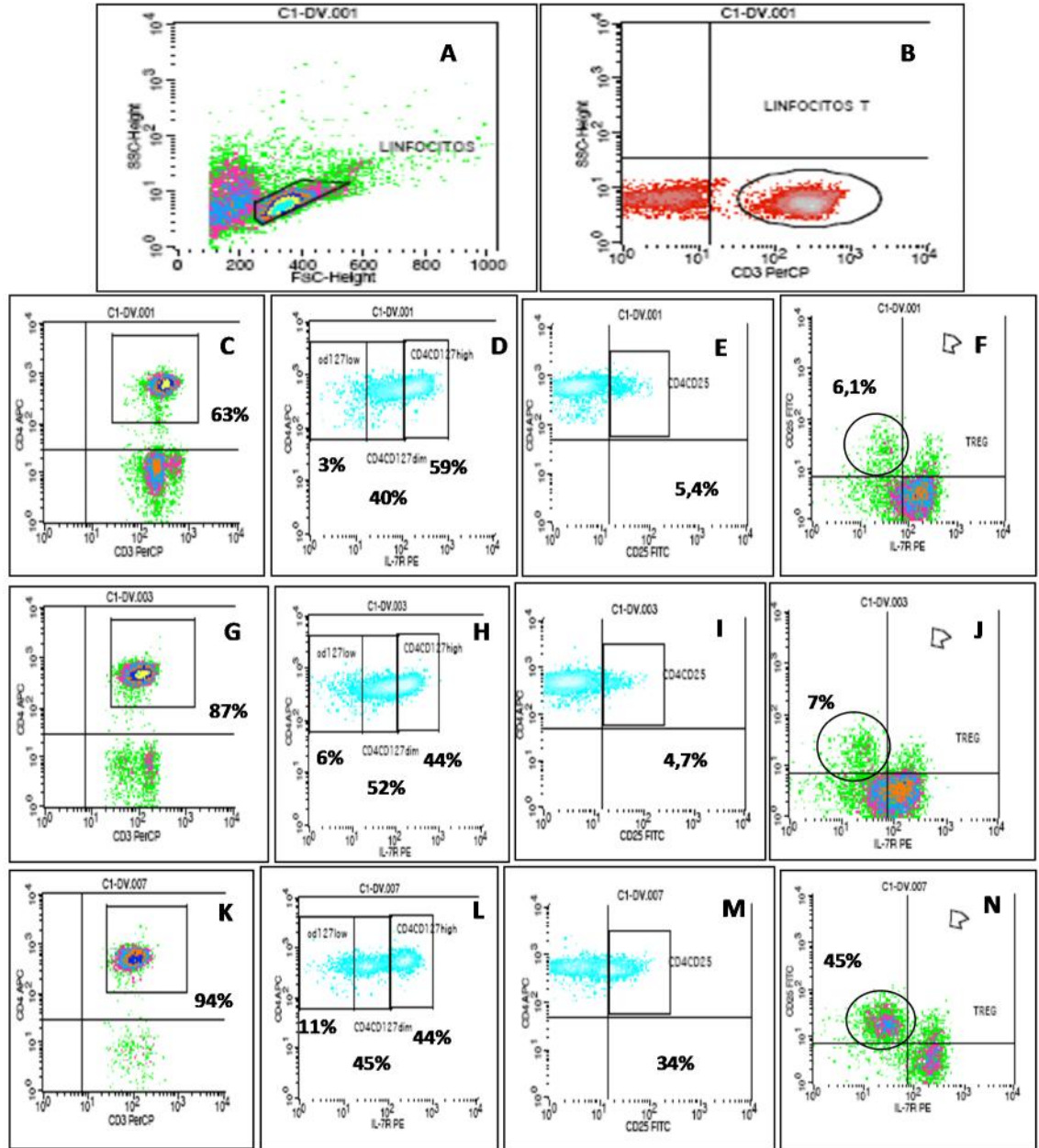


Fig. 18. Purificación de linfocitos T reguladores de niños infectados y grupo control. (A) Población de linfocitos totales. (B) Linfocitos T. (C) Linfocitos TCD4+ en la fracción de CMSP. (D) Linfocitos TCD4+CD127low en la fracción de CMSP. (E) Linfocitos TCD4+CD25high en la fracción de CMSP. (F) Linfocitos TCD4+CD127lowCD25high en la fracción de CMSP. (G) Linfocitos TCD4+ en la fracción F1. (H) Linfocitos TCD4+CD127low en la fracción de F1. (I) Linfocitos TCD4+CD25high en la fracción de F1. (J) Linfocitos TCD4+CD127lowCD25high en la fracción de F1. (K) Linfocitos TCD4+ en la fracción T reguladora. (L) Linfocitos TCD4+CD127low en la fracción de T reguladora. (M) Linfocitos TCD4+CD25high en la fracción de T reguladora. (N) Linfocitos TCD4+CD127lowCD25high en la fracción de T reguladora.

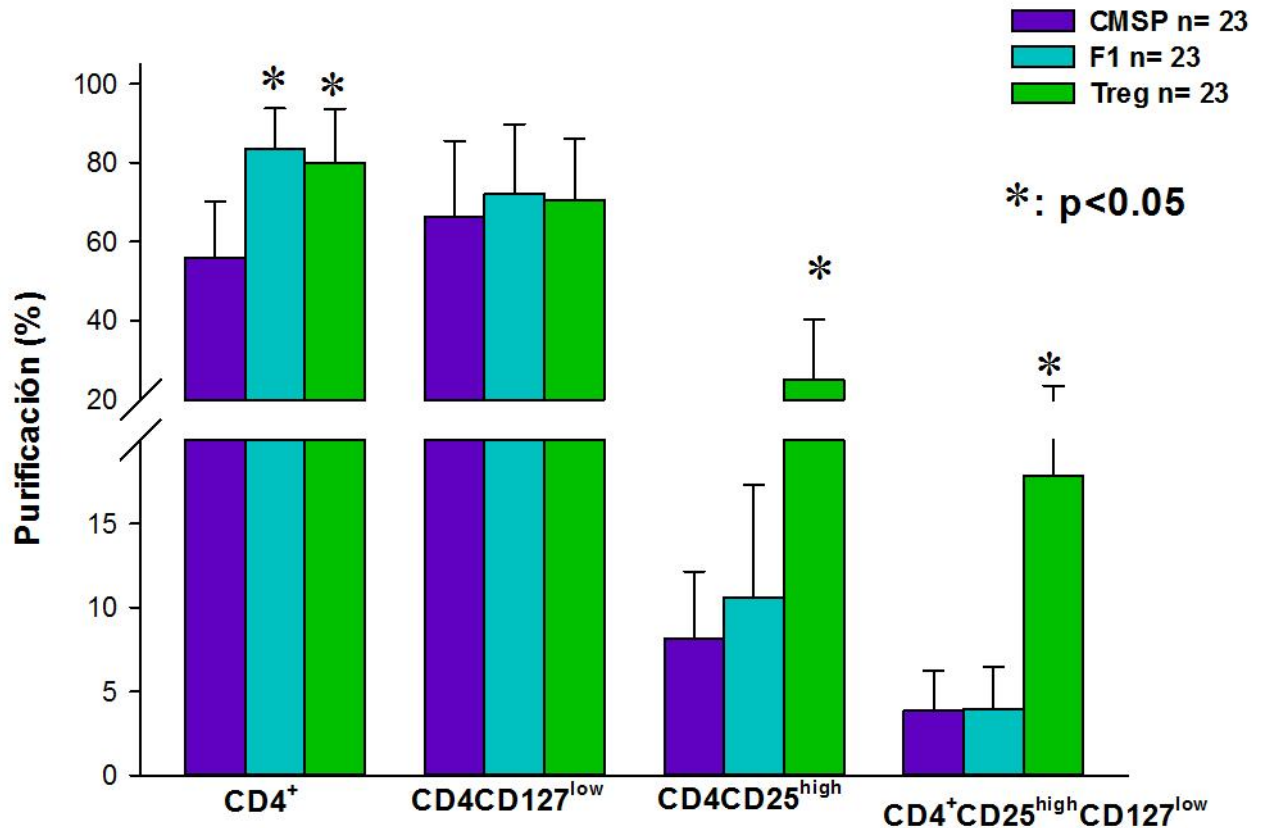


Fig. 19. Purificación de linfocitos T reguladores. Los datos utilizados para la cuantificación del porcentaje de purificación de los linfocitos Treg fueron tomados tanto de las muestras de niños sanos, como de los niños infectados. Las barras muestran el valor promedio \pm la desviación estándar.

Podemos observar en la **figura 19** que el grado de enriquecimiento de las subpoblaciones TCD4⁺, TCD4⁺TCD127^{low}, TCD4⁺CD25^{high} y Tregs (TCD4⁺CD127^{low}CD25^{high}) a partir de las CMSP fue bastante alto, hasta llegar a la última etapa del protocolo planteado. Logramos obtener un enriquecimiento significativamente mayor en la fracción Treg⁺ de casi todas las subpoblaciones analizadas, lo que respalda la efectividad del método utilizado y nos permitió realizar los cultivos celulares para estudiar la funcionalidad de esta subpoblación (Treg) *in vitro*.

Ensayos in vitro.

Para evaluar la funcionalidad de los linfocitos TCD8, nos propusimos realizar una serie de ensayos *in vitro* para medir la proliferación y la producción específica de Perforina, esta última medida intracelularmente. Asimismo, quisimos evaluar los posibles efectos de los linfocitos Treg sobre estas respuestas efectoras de estas células. Al evaluar la respuesta de proliferación de las células TCD8, obtuvimos resultados que son mostrados en la **fig. 20**, en la cual, se puede observar la ausencia de respuesta proliferativa específica para los antígenos de BCG y Gag de las células de los niños infectados, cuyos valores fueron similares a los obtenidos en los cultivos controles, es decir, en ausencia de estímulo antigénico, a pesar que su capacidad de proliferación en presencia de PHA no se ha perdido. Efectivamente, podemos ver que los valores aumentaron en presencia de este mitógeno para las células de ambos grupos de individuos con respecto a los valores obtenidos en medio de cultivo, pero no se pudo observar una diferencia significativa entre los valores de las células de los niños sanos y la de los infectados.

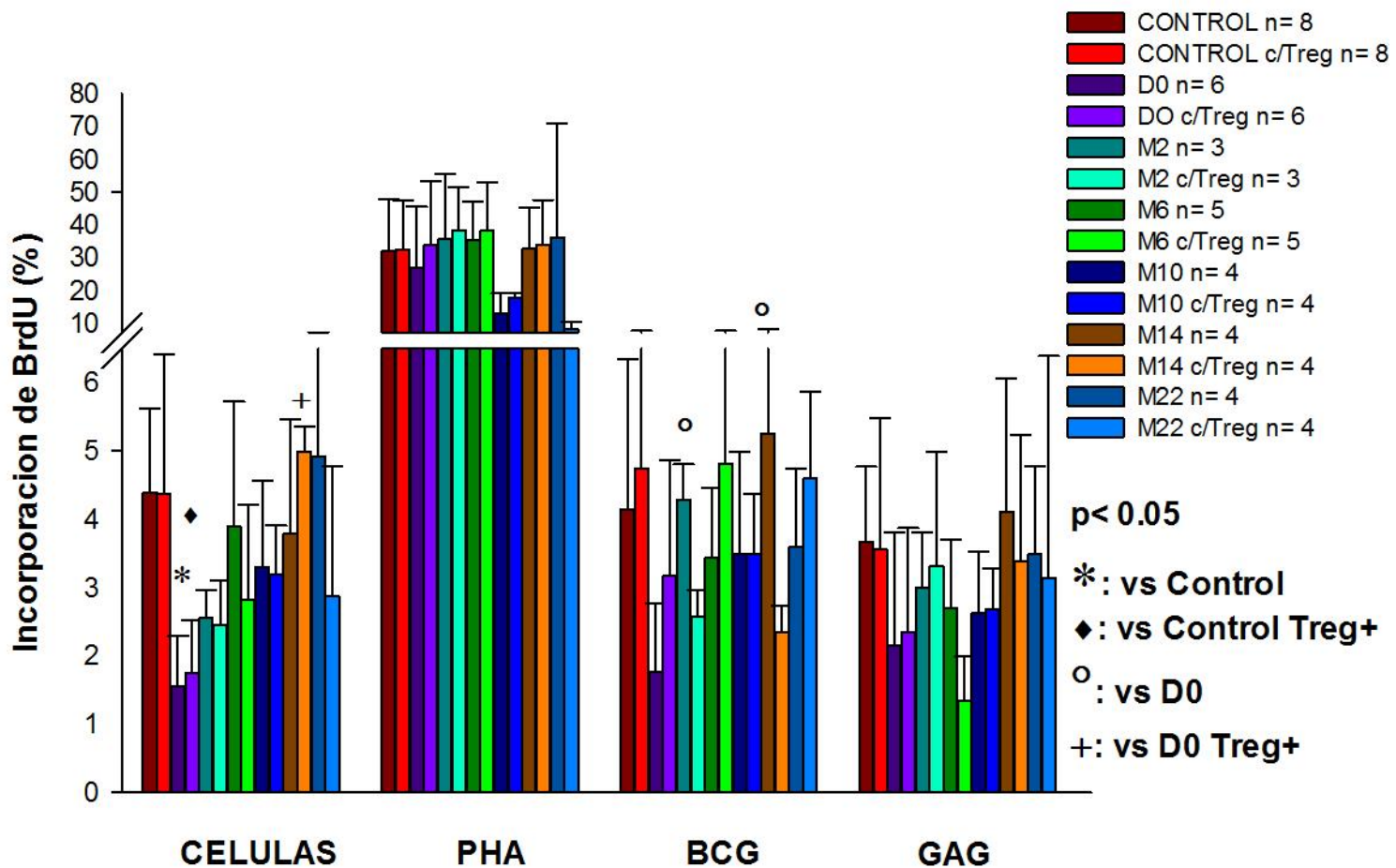


Fig. 20. Proliferación de linfocitos TCD8 *in vitro* mediante la medición de incorporación de BrdU intracelular vs tiempo de tratamiento. Las células provenientes de los cultivos celulares fueron marcadas con anticuerpo anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APC y anti-BrdU-FITC. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

A pesar que se pudo evidenciar que posteriormente al inicio de TAAE, los índices de proliferación aumentaron con respecto al D0 para las 3 condiciones, los cuales alcanzaron los siguientes valores al mes 22 (sin estímulo = 4.917 ± 2.228 ; BCG = 3.593 ± 1.150 ; y Gag = 3.483 ± 1.297), llegando a ser similares a los de los controles. Sin embargo, la similitud del comportamiento proliferativo que presentaron estas células tanto con el cultivo sin estímulo como con la presencia de ambos antígenos, no podemos indicar que la respuesta fue positiva ni específica. Finalmente, tampoco se encontró diferencia significativa en presencia o ausencia de las células Treg en todas las condiciones de cultivo.

La producción específica de perforina fue otra de las respuestas efectoras de los linfocitos TCD8 que quisimos evaluar en este estudio. Para ello, medimos tal síntesis intracelularmente usando la Brefeldina A, la cual inhibe el transporte proteico desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi, evitando así la exocitosis de la proteína. La **fig. 21** muestra los resultados obtenidos y encontramos que los valores del grupo de pacientes infectados antes de recibir el TAAE (2.86 ± 2.13), fue menor a los observados en el grupo control (4.19 ± 2.21). De igual forma, en presencia de BCG, se pudo observar que los valores fueron más bajos en las células de los pacientes sin tratamiento en comparación a los de los niños sanos (1.085 ± 0.05 vs 5.02 ± 1.20 , respectivamente) y en presencia de Gag (1.01 ± 0.36 vs 5.07 ± 1.66 , respectivamente) ($p > 0.05$). No obstante, se pudo verificar que tal respuesta efectora de estas células T CD8 incrementó en los niños infectados cuando se le administró el tratamiento,

alcanzando valores similares a los del grupo control al mes 22 de tratamiento en presencia de BCG.

Bajo el tratamiento antirretroviral encontramos que las células TCD8 de los niños infectados presentaban una recuperación de la producción de perforina, destacando un incremento, especialmente en presencia de Gag (5.77 ± 3.054), con una diferencia significativa con respecto al D0 ($p < 0.05$) a partir del M6 de tratamiento. Sin embargo, como no hubo diferencia significativa entre los valores obtenidos en presencia de este antígeno con los del control, es decir, en ausencia de estímulo antigénico, no podemos decir que la respuesta de producción de perforina era específica. Pero en presencia de PHA, nuevamente, se pudo evidenciar la capacidad productora de estas células para la perforina, encontrando que los valores obtenidos de los pacientes y de los niños sanos fueron similares pero mucho más altos en comparación al control negativo (medio solo).

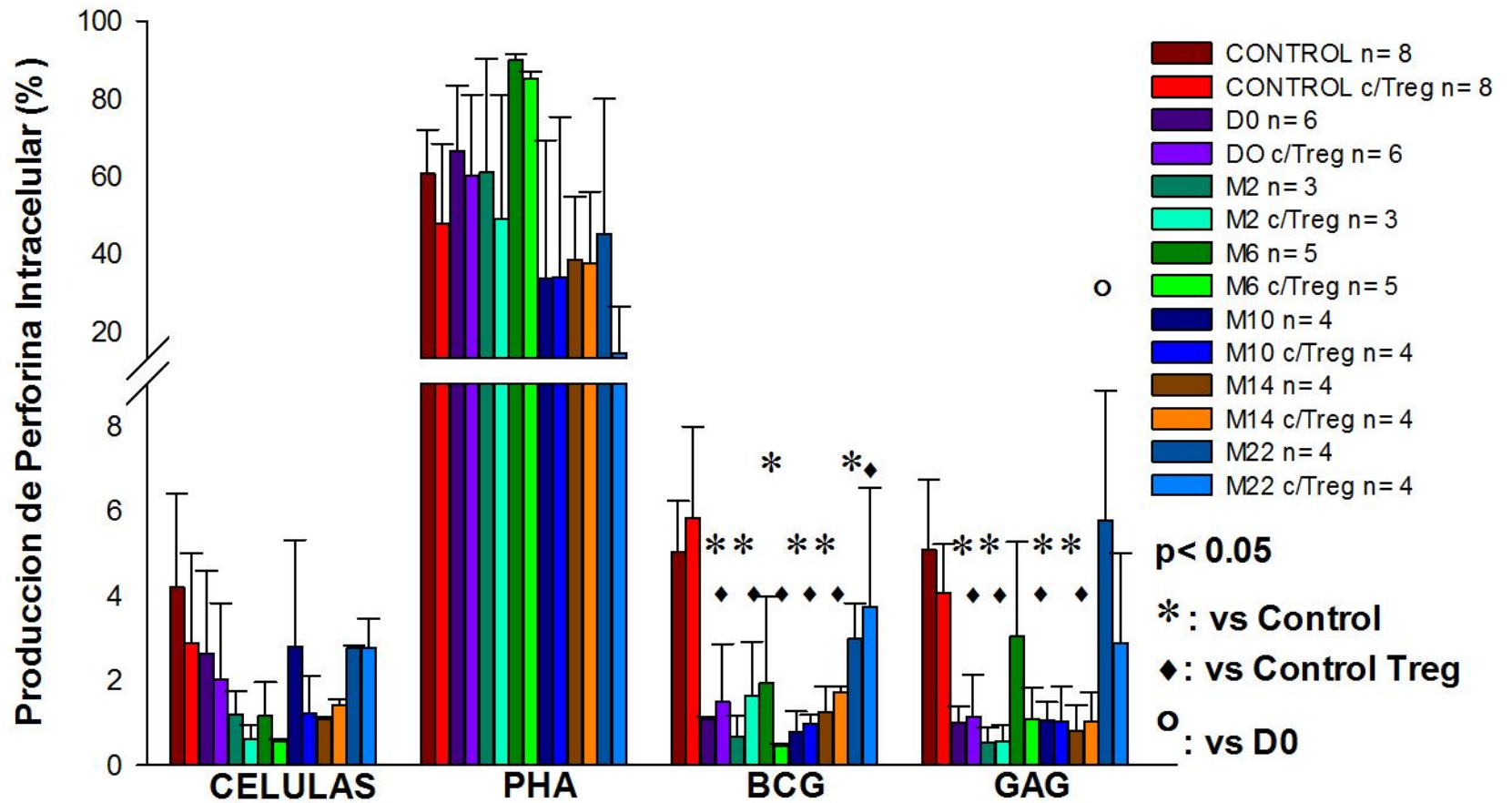


Fig. 21. Frecuencia de la producción intracelular de perforina en linfocitos TCD8 vs el tiempo. Las células provenientes de los cultivos celulares fueron marcadas con anticuerpo anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APC y anti- Perforina-PE. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

PRODUCCION DE CITOCINAS Th1/Th2.

Para evaluar la producción de citocinas se tomó 1 ml de plasma de sangre periférica y 0.3 ml de sobrenadante de los cultivos realizados y una vez culminadas todas las tomas de muestras de los niños infectados se procedió a realizar el análisis por citometría de flujo de las citocinas estudiadas.

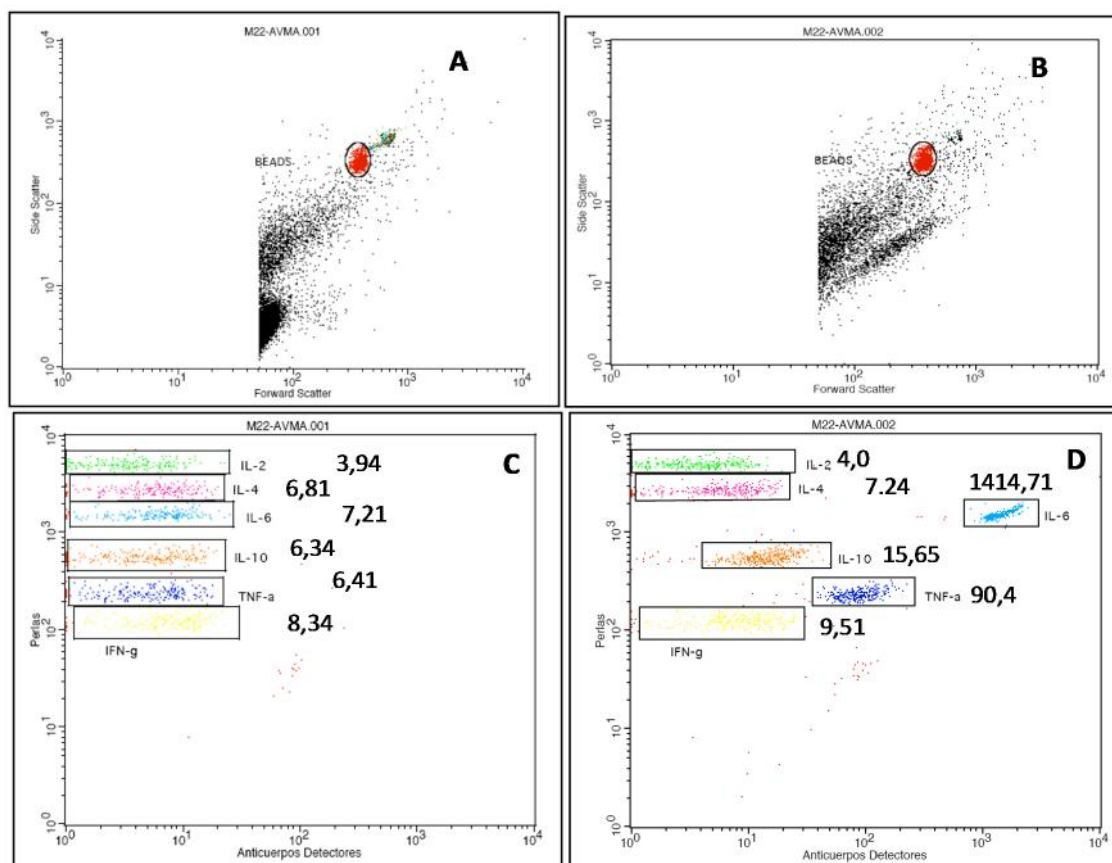
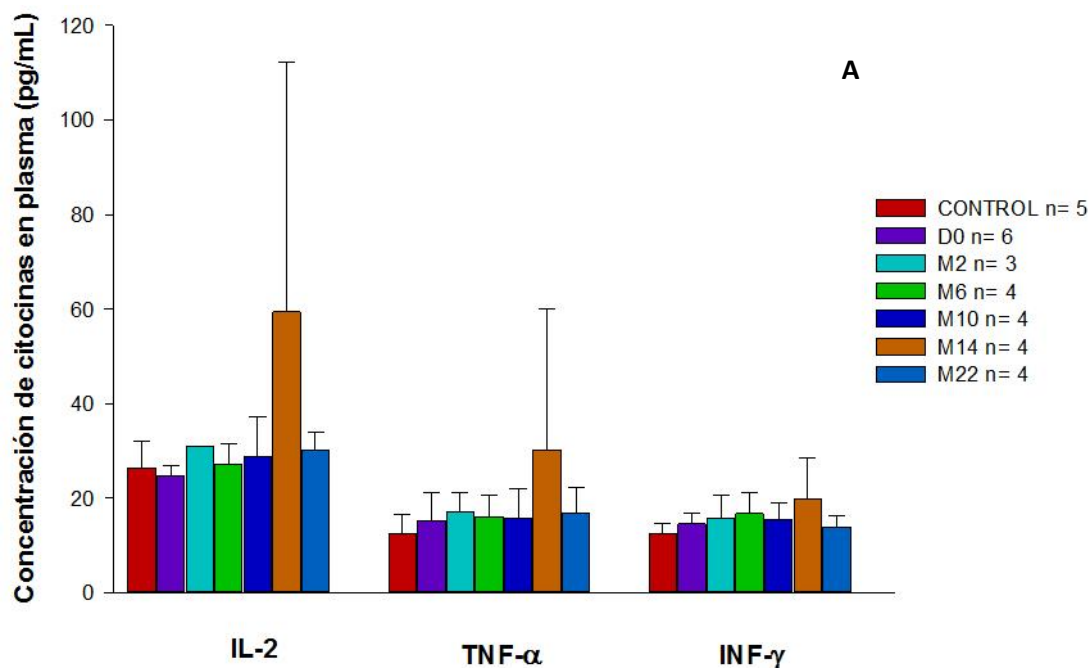


Fig. 22. Determinación de la producción de citocinas en CMSP y sobrenadante de cultivo celular. La determinación de la producción ex vivo e in vitro de citocinas Th1/Th2 se realizó mediante la asociación a microperlas marcadas para cada una de las especies de citocinas estudiadas. Los valores que se muestran son los promedios de intensidad de fluorescencia (MFI) (A) Población de perlas en plasma. (B) Población de perlas en sobrenadante. (C) Subpoblaciones de perlas en plasma. (D) Subpoblaciones de perlas en sobrenadante.

La identificación de la población de perlas en el plasma de sangre periférica y en el sobrenadante de los cultivos celulares se realizó mediante citometría de flujo utilizando los parámetros de dispersión frontal (FSC-Height) y lateral (SSC-Height) (figura 22A y 22B).

Observamos igualmente en la **figura 22C** la presencia de las poblaciones de microperlas asociadas las citocinas estudiadas en plasma. Pudimos calcular la concentración de las citocinas (pg/mL) mediante la construcción de curvas de calibración y los valores promedio de la Intensidad de Fluorescencia (MFI por sus siglas en inglés), valores en los que el citómetro reporta el análisis de las muestras. Se pudo verificar que la concentración plasmática es baja en comparación a las encontradas en los sobrenadantes de cultivo (**figura 22D**) para las citocinas IL-6, IL-10 y TNF- α .

En la **figura 23 (A y B)** se muestra los resultados obtenidos del plasma, reflejando que no hubo cambios significativos de la producción de las citocinas estudiadas entre el plasma de los pacientes y el de los niños sanos, excepto por la IL-10 (fig 23 B), la cual sus valores incrementaron gradualmente con el tratamiento, pero nunca llegaron a ser significativamente diferentes a los del grupo control.



B

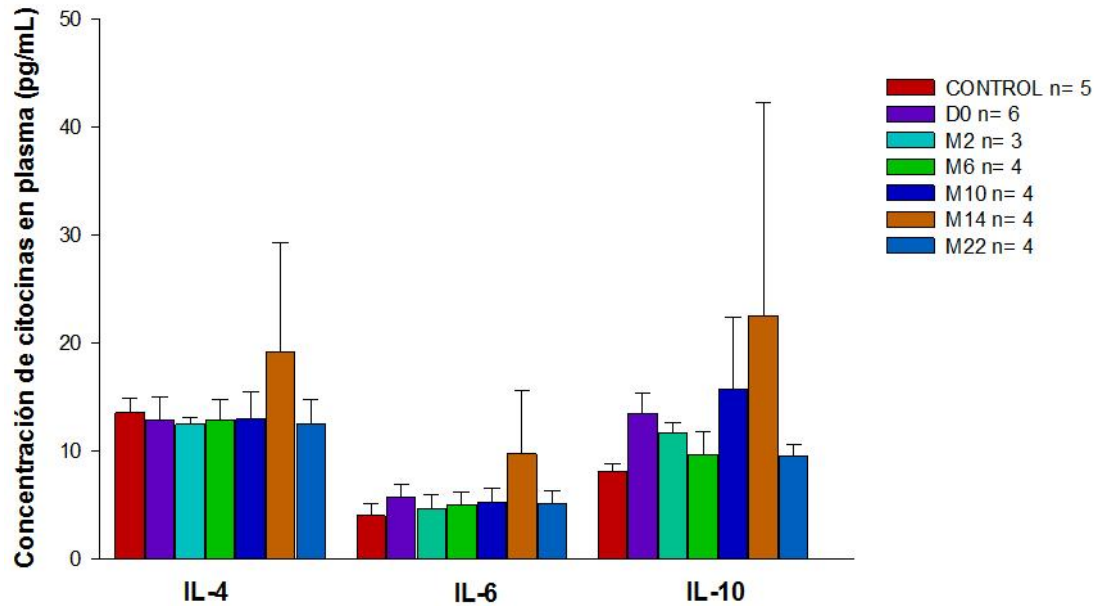


Fig. 23. Producción de citocinas Th1 (A) y Th2 (B) en plasma de sangre periférica vs tiempo de tratamiento. La determinación de la producción ex vivo e in vitro de citocinas Th1/Th2 se realizó mediante la asociación a microperlas marcadas para cada una de las especies de citocinas estudiadas. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

En los ensayos para medir las citocinas Th1 en los sobrenadantes de cultivo, encontramos que producción fue similar de la citocina IL-2 entre el grupo de los niños infectados antes y durante el TAAE (**figura 24**). Así mismo, encontramos que las concentraciones de esta citocina se encuentran disminuidas en comparación con el resto de las citocinas (con excepción de la citocina IL-4, la cual fue aún menor) en presencia de todas las condiciones de cultivo.

Por otra parte, cuando analizamos los resultados de la producción de INF- γ (**figura 26**), pudimos constatar que no presentaron cambios en sus valores de los niños infectados antes y después del tratamiento. Aunado a ello, tampoco se encontraron diferencias significativas

entre la producción de esta citocina entre los niños sanos y los infectados. Pero en presencia de PHA se pudo observar el incremento de la concentración de INF- γ en todas las muestras recolectadas, hecho que no encontramos en el análisis de las otras citocinas.

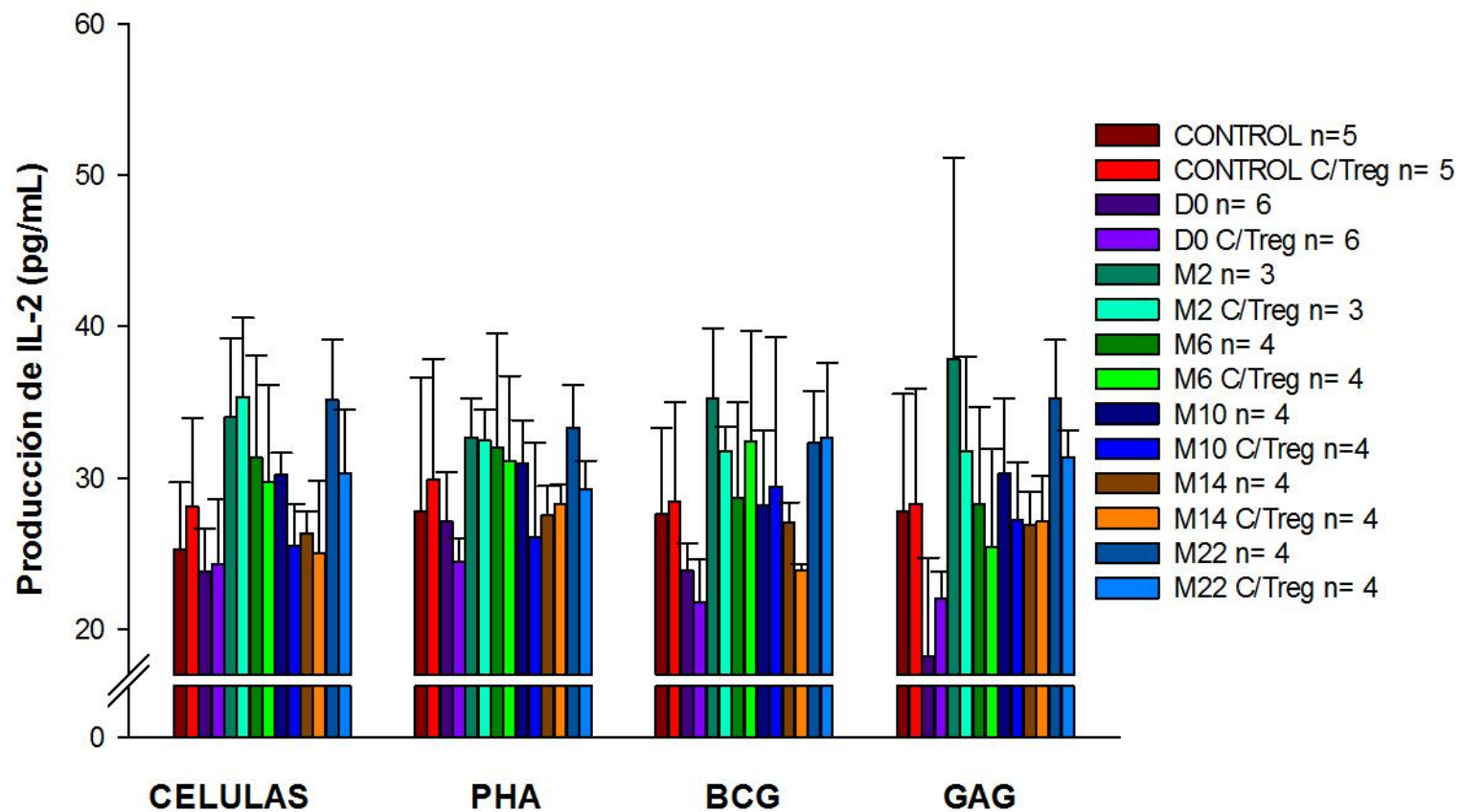


Fig. 24. Producción de *IL-2* en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8vs tiempo de tratamiento. La determinación de la producción *in vitro* de citocinas *IL-2* se realizó mediante la asociación a microperlas. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

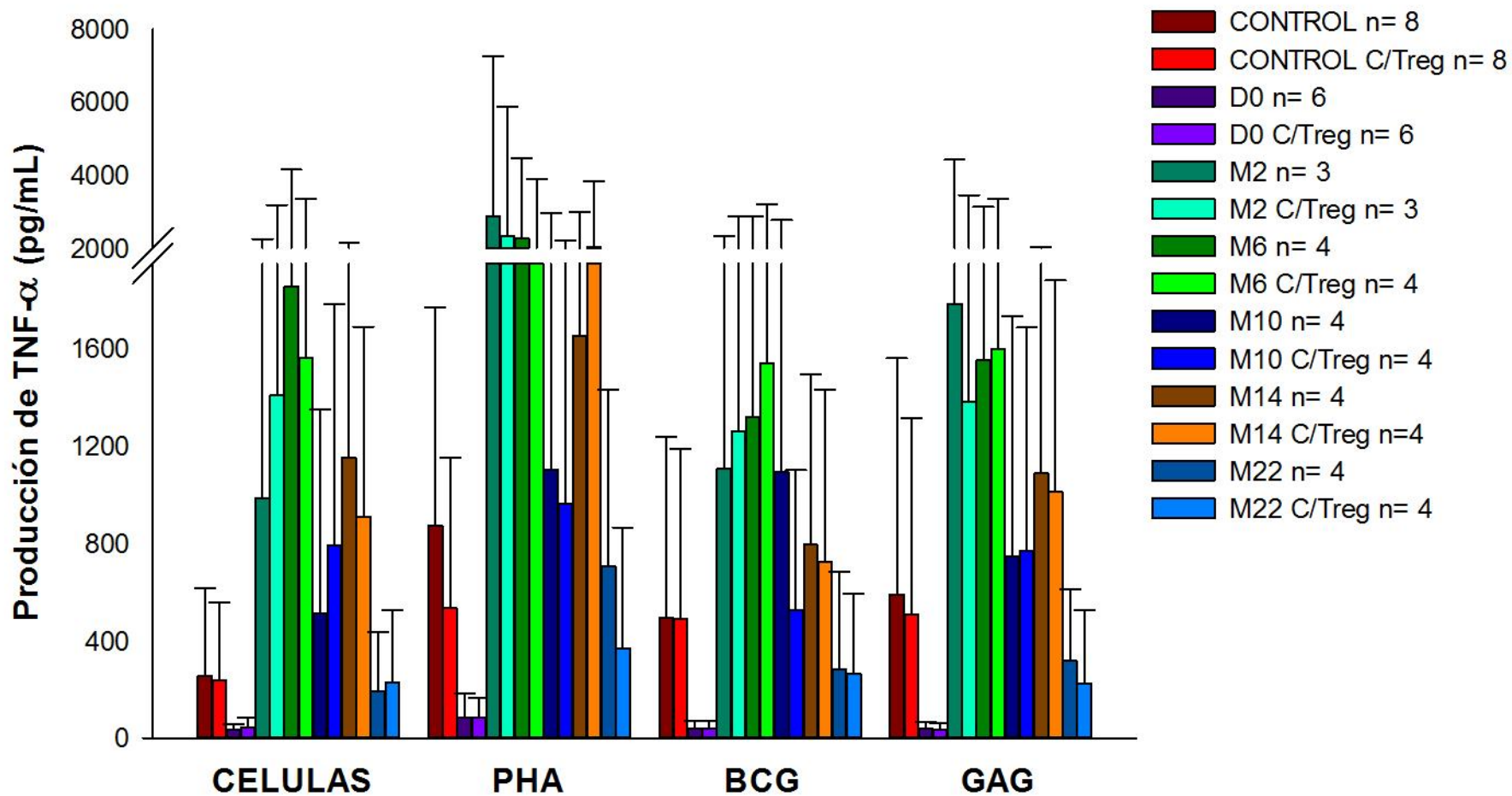


Fig. 25. Producción de *TNF-α* en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento. La determinación de la producción *in vitro* de la citocina *TNF-α* se realizó mediante la asociación a microperlas. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

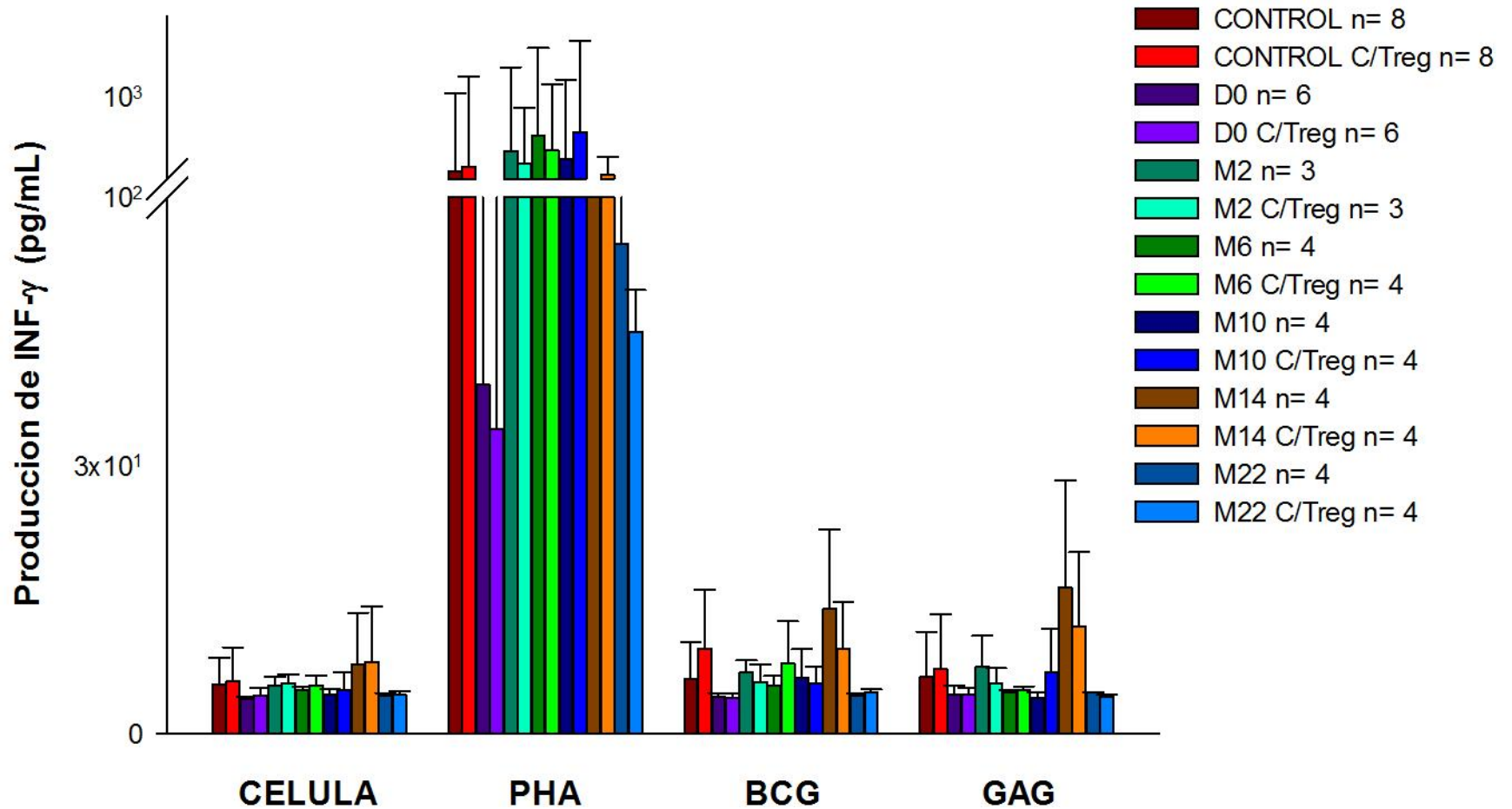


Fig. 26. Producción de $INF-\gamma$ en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T Cd8 vs tiempo de tratamiento. La determinación de la producción *in vitro* de la citocina $INF-\gamma$ se realizó mediante la asociación a microperlas. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

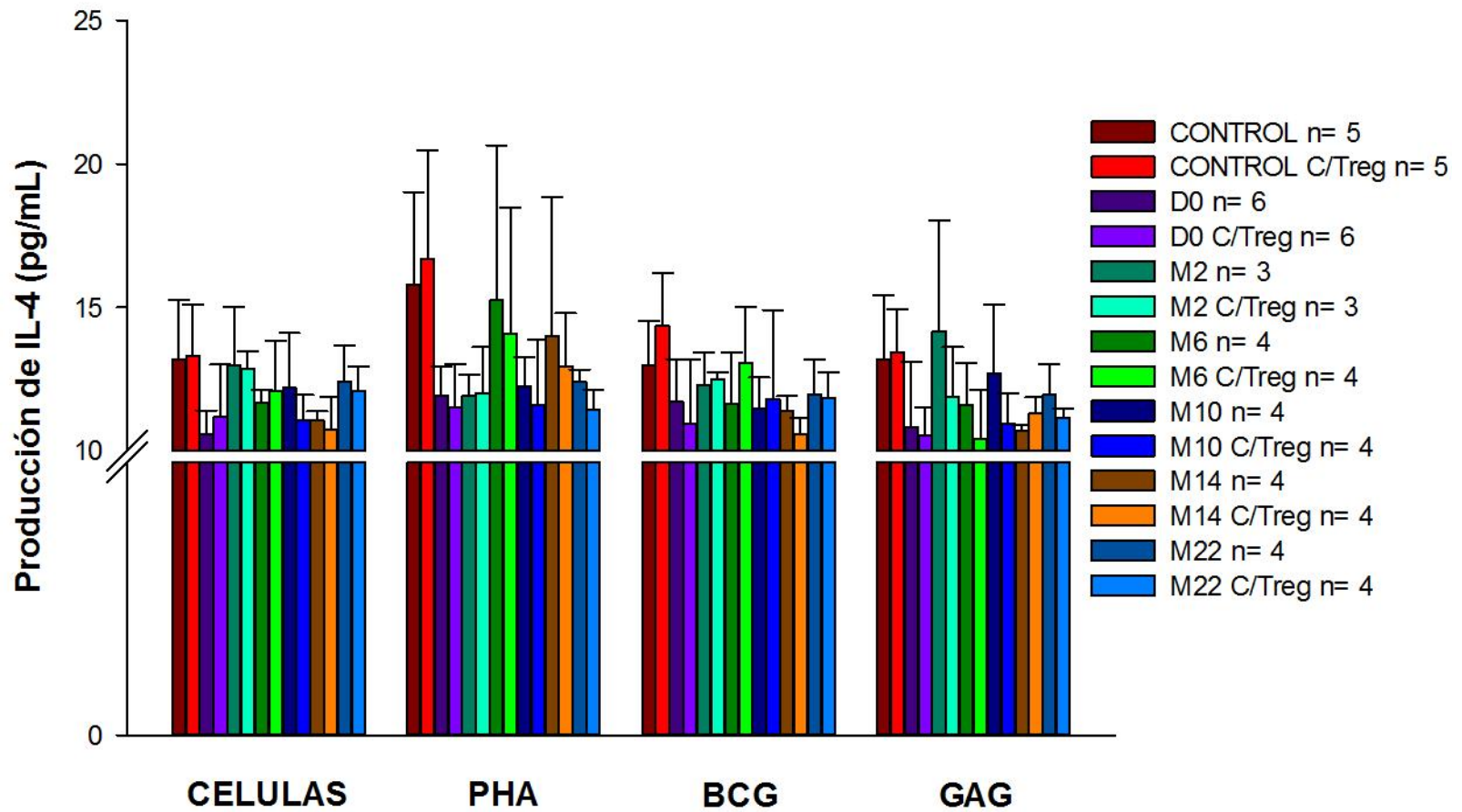


Fig. 27. Producción de *IL-4* en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos TCD8 vs el tiempo de tratamiento. La determinación de la producción *in vitro* de la citocina *IL-4* se realizó mediante la asociación a microperlas. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

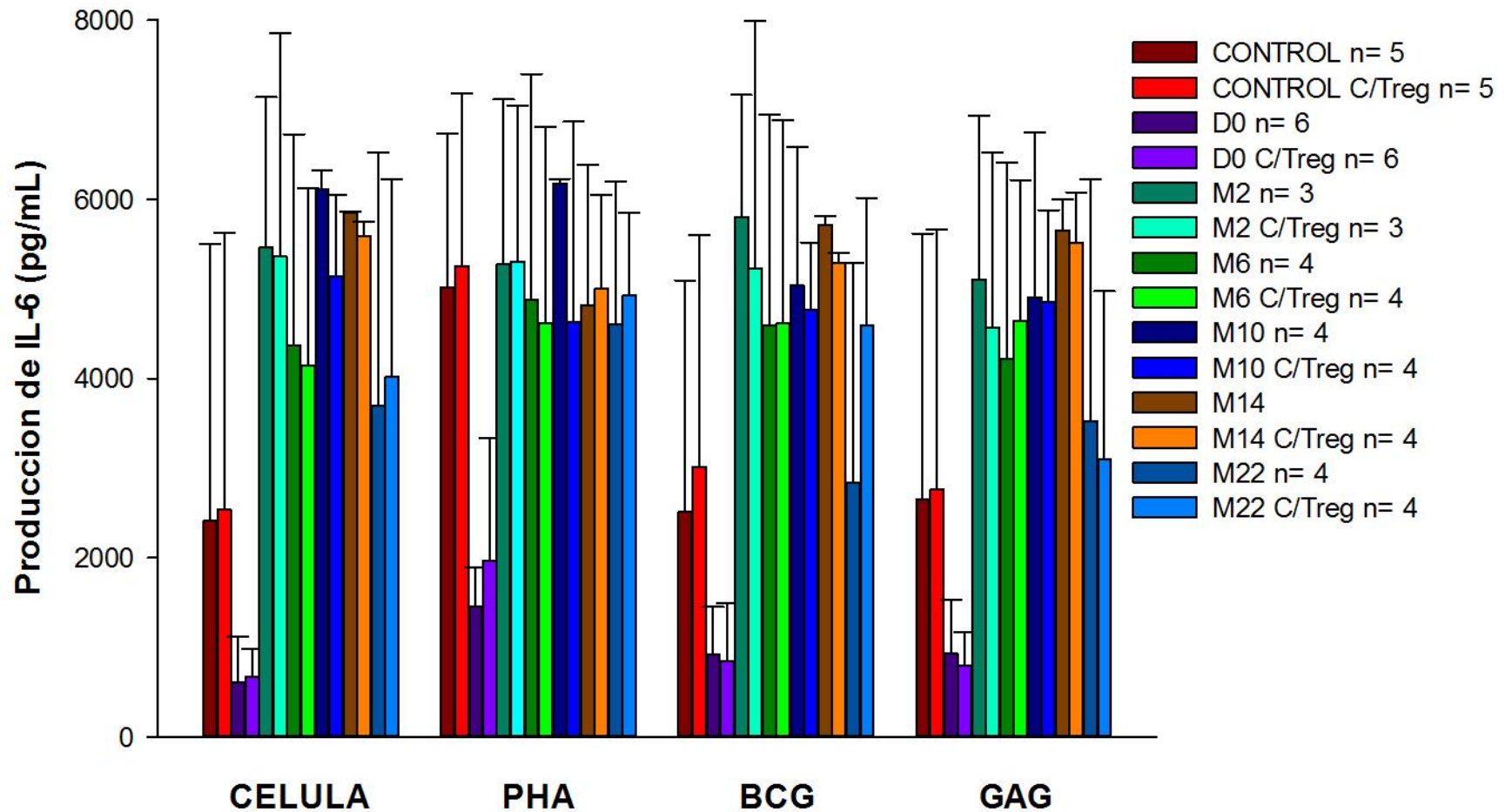


Fig. 28. Producción de *IL-6* en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos TCD8 vs el tiempo de tratamiento. La determinación de la producción *in vitro* de la citocina *IL-6* se realizó mediante la asociación a microperlas. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

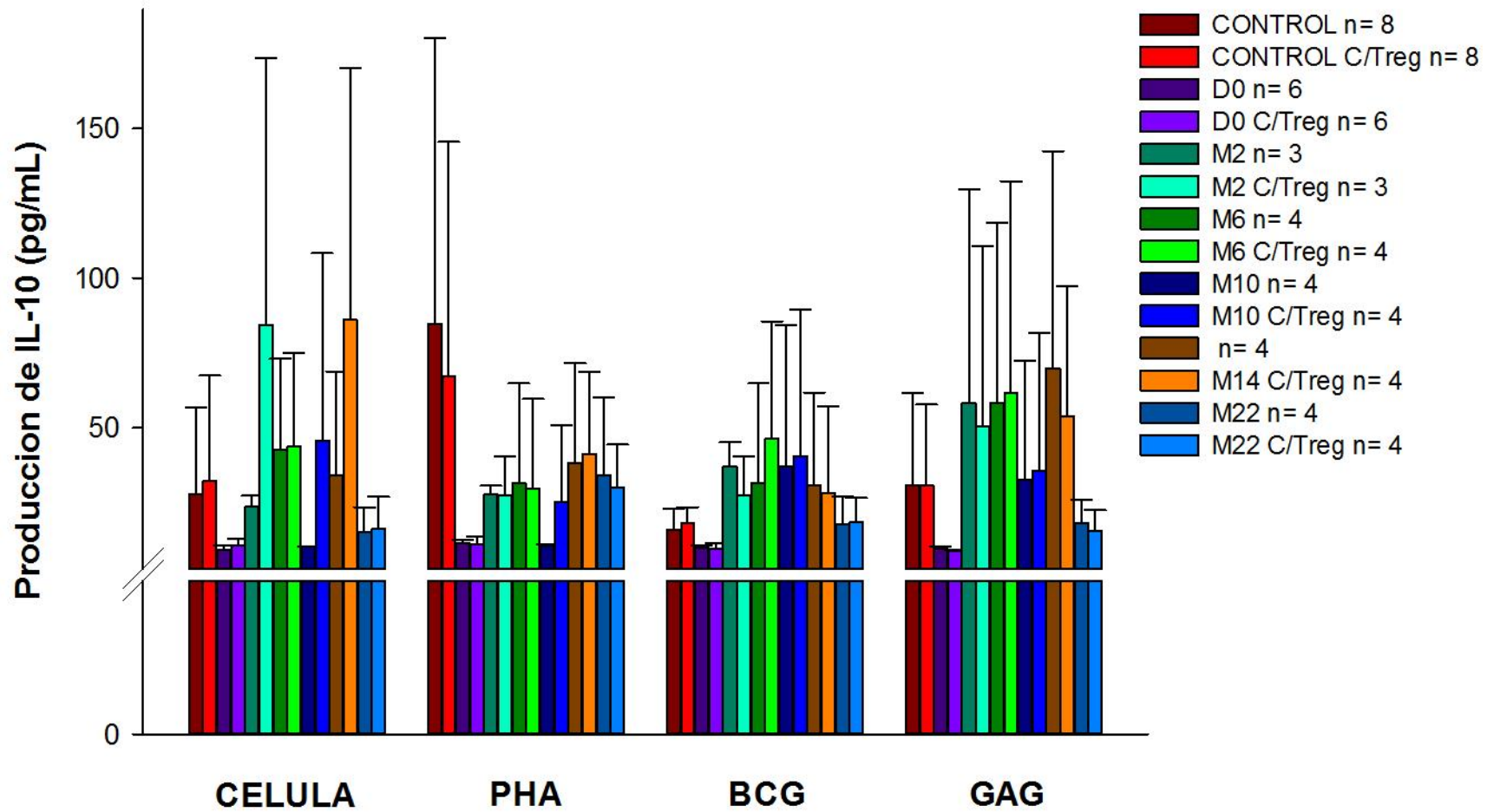


Fig. 29. Producción de *IL-10* en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos TCD8 vs el tiempo de tratamiento. La determinación de la producción *in vitro* de la citocina *IL-10* se realizó mediante la asociación a microperlas. Los resultados se muestran en pares por tiempo de muestra (sin/con Treg) y agrupados por estímulo recibido. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar para cada grupo de muestras.

La producción de TNF- α basal, es decir, en ausencia de estímulos, está incrementada en las células de los niños infectados sin tratamiento con respecto a la de los niños sanos (**fig. 25**). Pero en presencia de BCG y Gag, se pudo evidenciar similares resultados a los obtenidos en condiciones de ausencia de estímulos, indicando que no fue una respuesta específica. No así cuando estaba presente la PHA en los cultivos. Esta produjo un incremento de la producción de esta citocina en las células de los niños sanos pero los bajos valores que presentaron los niños infectados no tratados indican que este mitógeno no mejoró esta respuesta efectora. Sin embargo, al mes 2 de tratamiento se comenzó a ver un incremento de tal respuesta en las células de estos niños que se mantuvo por encima de los controles hasta el mes 10, donde nuevamente comienzan a bajar los valores, llegando a ser similares a los de los niños sanos. En cuanto a la IL-4 (**fig. 27**), las muestras presentaron muy bajas concentraciones frente a todos los estímulos y no se observa diferencia en la producción de esta citocina entre el grupo control y los niños infectados. La producción de IL-6 (**fig. 28**), se muestra disminuida en los niños infectados antes de comenzar el TAAE (Células = 606.242 ± 510.118 ; BGC = 925.022 ± 525.352 ; GAG = 927.042 ± 603.728) con respecto al grupo control (Células = 2409.505 ± 3088.674 ; BCG = 2513.767 ± 2578.141 ; GAG = 2645.431 ± 2970.826), sin embargo, presenta una tendencia a aumentar los valores, presentando para el mes 22 en los niños infectados los siguientes valores: Células = 3691.698 ± 2831.383 ; BCG = 2839.626 ± 2447.234 ; GAG = 3518.692 ± 2708.835 . Es importante destacar que este comportamiento en los valores es similar a los del cultivo control, no presentando diferencias significativas, sugiriendo que los cambios en la producción de esta citocina no se deben a una respuesta específica de estas células.

Finalmente, cuando analizamos los resultados de la producción de IL-10 encontramos que es menor en los niños infectados sin tratamiento (Células = 9.303 ± 1.494 ; BGC = 9.840 ± 0.773 ; GAG 9.459 ± 0.963) en relación a los valores encontrados en el grupo control (Células= 27.717 ± 28.958 ; BCG= 15.828 ± 7.337 ; GAG= 30.955 ± 30.789) pero sin diferencias estadísticamente significativas. Bajo tratamiento, se pudo observar que los valores de producción de esta citocina aumentaron gradualmente en presencia de cada uno de los estímulos (**fig. 29**). No obstante, debido a que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estos valores y los obtenidos a partir de los ensayos controles, es decir, sin estímulos, estos resultados sugieren que tal aumento no representa una respuesta efectora específica.

VII. -DISCUSIÓN

La infección por VIH-1 induce profundos cambios cualitativos en las células TCD4, así como en la mayoría de los otros componentes que constituyen el sistema inmunológico, tales como las células TCD8 incluyendo su dinámica celular, cuya regulación de los mecanismos que permiten el desarrollo, mantenimiento y efectividad de la inmunidad celular específica contra el virus está afectada; y los mecanismos de mantenimiento de las poblaciones de las células vírgenes (R_a) y memoria (R_o) (Douek y col., 2003). La TB permanece entre las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial asociadas a la infección por VIH, donde la BCG es la única vacuna disponible actualmente contra la infección bacteriana, observándose una relativa eficacia en el desarrollo de memoria inmunitaria efectiva (Andersen y col., 2005b). En pacientes VIH+, sin embargo, la viabilidad y efectividad de la vacuna está en entredicho, e incluso, se han observado complicaciones asociadas a la vacuna, produciendo una alta tasa de morbilidad en estos pacientes (Hesseling y col., 2007).

En la población infantil infectada con VIH son pocos los estudios realizados hasta el momento y aún menos, sobre la eficacia de las vacunaciones en este cuadro inmunológico afectado por la infección viral, es por ello que nos propusimos desarrollar una serie de ensayos experimentales que nos permitieran estudiar algunos parámetros inmunológicos de los linfocitos TCD8 de pacientes infectados, para evaluar si la respuesta inmune contra la vacuna BCG de esta población inmunocomprometida se desarrollada durante 22 meses de TAAE.

Cuando analizamos las subpoblaciones celulares de linfocitos T en sangre de estos niños infectados se pudo observar que presentaron antes del tratamiento antirretroviral muy bajos valores de células TCD4 con respecto a los de los niños sanos, indicando el grado de

inmunodeficiencia presente en los primeros. Esto es debido a la combinación de 3 posibles factores, en primer lugar al efecto directo de la infección, que afecta principalmente a esta subpoblación linfocitaria por la alta afinidad de la glicoproteína gp120 y gp41 con la glicoproteína linfocitaria CD4 (Sattentau y col., 1988; Kwong y col., 1998); en segundo lugar, el inadecuado reemplazo de las células T destruidas, ya sea por la ineficaz producción de nuevas células en el timo y los órganos linfoides o por la proliferación no funcional de las células periféricas (Moroni y col., 2003; Nebuloni y col., 2013); y finalmente, por los efectos indirectos del virus sobre la viabilidad y funcionalidad de los linfocitos TCD4 (Catalfamo y col., 2011).

Cuando se administró el TAAE en esta cohorte de pacientes infectados, se pudieron observar resultados muy satisfactorios sobre este parámetro, confirmando resultados previos que demuestran la recuperación cuantitativa de esta subpoblación celular en los pacientes (Gulick y col., 2000; Moronta y col., 2005). En nuestro estudio se pudo observar el incremento del número de células TCD4 en sangre en estos niños infectados a lo largo del tiempo de administración de las drogas antirretrovirales. Se conoce que el TAAE, que es una combinación de inhibidores nucleósido de la transcriptasa reversa o NRTI; inhibidores no nucleósido de la transcriptasa reversa o NNRTI; e inhibidores de proteasa o PI (Araujo, 2001), bloquea la replicación del virus dentro del organismo y permite la recuperación cuantitativa y parcialmente cualitativa de los linfocitos TCD4. Además, varios investigadores han demostrado que luego de un rápido aumento en el conteo de las TCD4 dentro de los 3 a 6 primeros meses de tratamiento, aparece una segunda fase de incremento lento de esta población celular en la mayoría de pacientes, que se relaciona con la recuperación a largo plazo de la población linfocitaria (Le Moing y col., 2007). En nuestro caso, se pudo verificar este fenómeno,

observándose un incremento significativo a los 2 meses de tratamiento igualando los valores a los de los niños sanos, posteriormente se percibe una 2da fase del mencionado incremento pero más lentamente, posiblemente por la renovación de células vírgenes provenientes del timo y/o por la recirculación de linfocitos memoria acumulados en los ganglios linfáticos que se liberan al ejercer efecto las drogas antirretrovirales sobre el virus.

Cuando analizamos la población de linfocitos TCD8 totales de sangre periférica de estos pacientes infectados, se pudo evidenciar que al inicio del tratamiento antirretroviral, estos niños presentaron valores más altos que los presentados por los niños sanos. Posiblemente esto se deba a la gran activación y proliferación que sufren estas células durante la infección, las cuales van a desempeñar un papel importante en el control de la replicación viral, mediante su actividad citotóxica a través de la producción de perforina y granzimas (Migueles y col., 2008). No obstante, una estimulación excesiva de las respuestas de linfocitos TCD8 y un recuento elevado de estas células están relacionados con una aceleración de la progresión de la infección por VIH (Krantz y col., 2011). Cuando se administró el TAAE en estos niños se observó un mayor aumento en la cantidad total de linfocitos TCD8. Moronta y colaboradores (2005), en poblaciones menores a los 6 años de edad, propusieron que este hecho ocurre posiblemente porque los niños a tan temprana edad, al no poseer un sistema inmunológico completamente desarrollado, sean más susceptibles a la infección debido a la sobrecarga antigénica que supone la replicación crónica y masiva del VIH, por ello los clones de linfocitos TCD8 se encuentran en un proceso de activación y proliferación continua y por ende el proceso homeostático del sistema se presente de forma más lenta (Moronta y col., 2005). Sin embargo, en los pacientes adultos se ha observado que la disminución significativa de CTLs específicos

contra VIH ocurre después de 20 meses de TAAE, sugiriendo ,que es posible que en niños, el tiempo de normalización de este parámetro sea más dilatado en el tiempo, dado lo inmunocomprometido de su estado (Weekes y col., 2006), mientras que Resino y colaboradores (2000) por su parte, plantean que altos niveles de TCD8 son un factor protector en la progresión de la enfermedad (Resino y col., 2000).

La relación CD4/CD8 resulta de suma importancia en la evaluación del estado inmune de los pacientes infectados con VIH, ya que en pacientes inmunocomprometidos esta relación se inclina hacia la mayor presencia de células TCD8 (Klinger y col., 2001; Catalfamo y col., 2011). En nuestro estudio observamos que tal relación estaba significativamente disminuida en comparación a los valores de los niños sanos, pero al administrar el TAAE se pudo evidenciar el aumento significativo de tal relación promoviendo a valores más cercanos a los obtenidos en los niños control pero nunca igualados, indicando así que los niños tratados respondieron positivamente al tratamiento. La subpoblación de los linfocitos TCD4 vírgenes de esta cohorte es la que se recupera cuantitativamente mejor. Este hecho se debe probablemente a que los niños al tener un timo más activo por su desarrollo fisiológico, poseen el potencial para la reconstitución inmune cuando se controla la replicación de VIH-1 (Franco y col., 2000; Klinger y col., 2001; Catalfamo y col., 2011).

Las células T memoria difieren de las efectoras por su continuada supervivencia después de una respuesta inmune aguda, por tener una baja frecuencia de apoptosis y presentar un menor estado de activación (Alfonzo y col., 2012). Por otra parte, se ha demostrado *in vitro* que las células de memoria son más propensas de ser infectadas por el VIH en relación a las células vírgenes y que son más susceptibles de sufrir los efectos citotóxicos

inducidos por el virus, sin embargo, en los individuos infectados con VIH-1, esta subpoblación celular es la menos eliminada durante la infección (Alfonzo, 2005). Nosotros encontramos que en los niños infectados luego de 22 meses de tratamiento, el número de células TCD8 memoria tiende a disminuir y estabilizarse, aunque con valores significativamente más altos que los presentes en el grupo control, pero menores al número de células TCD8 vírgenes, las cuales se observó una tendencia discreta a aumentar su número con respecto a los valores iniciales, apoyando el supuesto de la recuperación de algunas funciones del sistema inmunológico, ya que, las células TCD4 y T CD8 vírgenes inmunocompetentes que acaban de madurar abandonan el timo y entran en circulación en un estado de reposo (G0 del ciclo celular) (Iañez, 1999). Navarrete (2006) en su trabajo confirma nuestros resultados. Ellos demuestran que frente a TAAE los pacientes tienden a disminuir la cantidad relativa de TCD8 memoria con respecto a los valores presentes antes de la terapia y explica que la efectividad de TAAE se correlaciona con una menor tasa de activación de TCD8. Igualmente afirma que el aumento de estos linfocitos TCD8 vírgenes observado en los pacientes tratados indica probablemente la presencia de nuevos linfocitos TCD8 (Navarrete, 2006).

Al estudiar la presencia de las moléculas de superficie CD127, CD95/Fas y PD-1 sobre los linfocitos T CD8, observamos que la expresión de estas células se encontraba profundamente alterada en los niños infectados. En la actualidad se conoce que los productos derivados de la infección por VIH inducen la expresión de moléculas pro-apoptóticas (Westendorp y col., 1995), así como disminución de la expresión de CD127, asociada a la sobrevivencia celular y la funcionalidad de las células T (Zhang y col., 2009), tal como se pudo confirmar en nuestro trabajo.

Se ha demostrado que la presencia de la infección por VIH ocasiona un aumento de la expresión *ex vivo* de Fas en linfocitos TCD8, independiente de los niveles sanguíneos de linfocitos TCD4. Esta molécula de superficie al unirse a su ligando, FasL, recluta la molécula intracelular FADD (proteína relacionada con Fas con dominio de muerte) y continua con la incorporación de la pro-caspasa 8, una forma inactiva de caspasa 8. La vinculación de FADD y la pro-caspasa 8 ocasiona la escisión proteolítica de esta última hasta su forma activa; luego la caspasa 8 inicia una cascada proteolítica que lleva a la muerte de la célula (Kindt y col., 2007). En la inmunopatología del VIH es de gran importancia y se relaciona estrechamente con la apoptosis, que en linfocitos TCD8 se encuentra aumentada en los niños infectados (Alfonzo y col., 2008).

En nuestros ensayos *ex vivo* observamos que la molécula Fas se encuentra altamente expresada en todas las subpoblaciones de las células TCD8: totales, vírgenes y memoria. Esto puede ser a causa de que los productos virales como Tat, gp120 y/o Nef, pueden activar a los linfocitos y exacerbar la expresión de inductores de muerte celular, tales como Fas/FasL, tanto en células infectadas como en las que se mantienen sanas (Westendorp y col., 1995; Xu y col., 1997; Zhang y col., 2001; Campbell y col., 2004). Otra causa probable de este aumento en la expresión de Fas en estas células puede ser debido al estado de hiperactividad en el que se encuentra el sistema inmunológico en presencia del virus, que por procesos regulatorios homeostáticos sobre-exprese este mecanismo de muerte celular (Baumler y col., 1996). La administración de TAAE condujo a la disminución de la expresión de esta molécula, incluso por debajo de los valores de los niños sanos debido posiblemente al hecho de que la viremia es controlada efectivamente por TAAE, lo que trae como consecuencia que estos productos y

mecanismos inducidos por el VIH no puedan estimular la sobre-expresión de esta molécula (Badley y col., 1998; Chavan y col., 1999; Vivas, 2013). Confirmando esta hipótesis, se pudo observar que en esta cohorte de pacientes, su carga viral es alta al inicio del tratamiento pero cae desde el mes 2 del tratamiento antirretroviral y es significativa la diferencia a partir del mes 10 con respecto al día 0.

En el mismo orden de ideas, al estudiar la expresión de PD-1 en los linfocitos TCD8 de los niños infectados sin tratamiento encontramos una alta expresión de esta molécula de superficie en estas células comparado con la del grupo control, seguido de una profunda disminución de la expresión hasta alcanzar valores similares a los encontrados en los niños sanos. La PD-1 es una molécula de superficie también conocida como CD279, que cuando, interacciona con sus ligandos proporciona una señal inhibidora a las células T, las cuales son afectadas en su proliferación celular y sobre la producción de citoquinas, en particular la producción de IL-10 (Sharp, 2009; Said y col., 2010). Durante la infección crónica por el VIH, se produce un deterioro de la función inmune, que consiste en una pérdida progresiva de las respuestas de células T efectoras, conocidos como "agotamiento de células T". Se han obtenido evidencias que la PD-1 desempeña un papel clave en este agotamiento de las células T como resultado de una infección viral crónica, y bajo algunas condiciones, que con el bloqueo de esta vía, es capaz de restaurar muchas funciones de las células T (Boasso y col., 2008; Eichbaum, 2011).

Sin embargo, pudimos constatar de nuestros ensayos que la administración del TAAEE conllevó a la disminución significativa de la expresión de esta molécula en todas las subpoblaciones de linfocitos TCD8 de los pacientes, incluso, llegando los valores a magnitudes

similares a los de los niños sanos a partir del mes 10 de tratamiento. Varios trabajos han demostrado que la expresión de la PD-1 está correlacionada positivamente con la carga viral (Trautmann y col., 2006; Zhang y col., 2007; Rodriguez-Garcia y col., 2011), hecho que entra en correspondencia con nuestros resultados, debido a que una vez iniciado el TAAE, se observó la disminución de los valores de la carga viral, por ende su tasa de replicación, por lo que los valores de expresión de PD-1 en las células de estos niños se ve profundamente disminuida.

Por otra parte, se ha demostrado que la expresión *ex vivo* de la molécula IL-7R α (CD127) está disminuida en los linfocitos TCD8 por la infección por VIH y es independiente del número de linfocitos T CD4 sanguíneos presente en los pacientes (Paiardini y col., 2005), hecho que confirma nuestros resultados. La molécula CD127 es una de las sub-unidades del receptor de membrana de la citocina IL-7, la cual es otra de las citocinas responsables de la supervivencia de los linfocitos T, vírgenes y de memoria, es esencial en la linfopoyesis. La IL-7 tiene efectos pleiotrópicos sobre la homeostasis de las células T, tales como la mejora de la supervivencia de células T maduras, la expansión de ambas subpoblaciones de células T y la movilización de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea a la circulación periférica (Wang y col., 2005; Levy y col., 2012). En nuestro trabajo, se pudo verificar la baja expresión de CD127 en todas las subpoblaciones de los linfocitos TCD8 de los niños infectados sin tratamiento, hecho que ha sido considerado como un signo del avance de la infección por VIH (Paiardini y col., 2005). Se pudo observar que con la administración de TAAE, se produjo la recuperación de la expresión de esta molécula en las subpoblaciones de linfocitos TCD8, posiblemente a causa de la supresión de la replicación del VIH, la cual, se traduce en la disminución de la molécula viral tat, cuyos efectos son conocidos sobre la inhibición de la

expresión de esta molécula (Faller y col., 2009). Sin embargo, se ha descrito que sólo cuando la carga viral es muy baja en los pacientes, tiene lugar un incremento de los linfocitos T con la ayuda de la IL-7. Este hecho podría reflejar el efecto inhibitorio del VIH sobre la función tímica.

Un hecho que debemos destacar sobre este tópico es que se pudo observar que a medida que transcurrió el tiempo de administración de TAAE, nuevamente comenzaron a descender los valores de expresión de este receptor en las células de los niños infectados, hecho que ocurrió a partir del mes 14 conduciendo a valores significativamente menores a los del grupo control. No tenemos una posible explicación de este fenómeno ya que una de las posibles causas es un escape del virus ante el tratamiento, conduciendo a un incremento de la carga viral, y por ende, de las concentraciones de Tat, pero los valores de la carga viral de nuestra cohorte de pacientes no lo confirma, es decir, se mantienen bajos a lo largo del tratamiento. Se requiere de mayores estudios para lograr dilucidar las posibles causas de la mencionada disminución de esta expresión molecular de CD127.

Se conoce que una de las causas de la inmunopatología de la infección por el VIH es la alta tasa de apoptosis en los linfocitos T. Nuestros resultados muestran altos valores de apoptosis en los linfocitos TCD8 de los niños infectados antes de comenzar el tratamiento debido presumiblemente a la interacción Fas/FasL en conjunto con la alta expresión de PD-1 y la disminución de CD127, aunado al hecho de que la gp120, Tat y Nef incrementan la susceptibilidad a la apoptosis (Ju y col., 1995; Lynch y col., 1995; Zuo y col., 2010). A medida que avanza el TAAE, se observó que la frecuencia de apoptosis disminuyó paulatinamente a valores similares al del grupo control, posiblemente debido a la normalización de la expresión de Fas, PD-1 y CD127, como consecuencia de la disminución de la carga viral y por ende, de

los productos virales que afectan la capacidad de supervivencia linfocitaria en los niños infectados (Alfonzo y col., 2008; Zuo y col., 2010; Vivas, 2013).

Como ya se ha descrito previamente, las células Treg son una subpoblación de los linfocitos TCD4 de gran importancia para el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia y la homeostasis del sistema inmune. Muchos estudios han analizado la frecuencia de las Treg en sangre de pacientes infectados por VIH. Sin embargo, los resultados no son concluyentes y existe una gran controversia sobre el papel que juegan las Treg en el curso de la infección (Weiss y col., 2004; Chase y col., 2007). Por una parte, diversos estudios indican que los pacientes infectados por VIH presentan unos valores elevados de la cantidades de las células Treg que estarían inhibiendo las respuestas específicas frente al VIH, limitando el control de la infección por el sistema inmune (Nilsson y col., 2006; Bi y col., 2009; Suchard y col., 2010). Por otra parte, diversos estudios indican que las células Treg se encuentran disminuidas en pacientes infectados (Apoil y col., 2005; Eggena y col., 2005; Brandt y col., 2011), lo cual podría comprometer el papel homeostático que juegan estas células favoreciendo la hiperactivación generalizada del sistema inmunológico y la progresión de la enfermedad asociada al mayor daño tisular y alteraciones inmunes que provoca esta hiperactivación. Nuestros datos confirman que esta cohorte de pacientes pediátricos sin tratamiento antirretroviral presenta una mayor presencia de estas células Treg en sangre comparados con el grupo control pero no presentó diferencia significativa, sin embargo, a medida que transcurrió el tiempo de administración de TAAE, se pudo observar la disminución de esta población, sugiriendo que los valores iniciales reflejan una alteración que pudiese estar inhibiendo la respuesta específica

contra VIH pero a medida que avanzó el TAAE, esta subpoblación recupera la homeostasis en número mejorando así el estatus inmunológico de estos niños.

La purificación de la subpoblación de células Treg a partir del fenotipo CD4+CD25^{high}CD127^{low} en nuestro estudio, se pudo constatar altos grados de enriquecimiento de estas células, indicando que estas moléculas de superficie son un efectivo marcador para la discriminación de esta población celular, tal como ha sido descrito previamente (Banham, 2006; Hartigan-O'Connor y col., 2007; Wang y col., 2007). Para ello medimos la presencia del factor de transcripción FoxP3, el cual se encuentra por definición en las células Treg naturales (resultados no mostrados) (Nomura y col., 2007; Ohkura y col., 2012).

La subpoblación de linfocitos Treg, presenta una importante capacidad para inhibir la activación y proliferación de los linfocitos T efectores. Estas funciones se realizan a través de múltiples mecanismos, entre los que se destacan: la supresión por contacto célula a célula, los cambios de patrones de citoquinas y la redistribución de subpoblaciones linfocitarias (Villegas y col., 2012), por ello nos planteamos medir su efecto *in vitro* en presencia de la vacuna BCG y la partícula viral Gag. En nuestros resultados no pudimos observar ningún efecto asociado directamente a la presencia de los linfocitos Treg ni en la actividad proliferativa de los linfocitos T ni en la síntesis intracelular de perforina en los linfocitos TCD8 particularmente. Por lo tanto no podemos avalar ni desestimar las hipótesis desarrolladas en torno a la actividad de esta subpoblación. Sin embargo, una posible explicación de la ausencia de actividad inhibitoria sea que la actividad de las Tregs depende no solo de señales de activación transducidas a través de TCR, que reconocen y unen con alta afinidad antígenos propios, sino también de la presencia de *IL-2* y de señales de activación transducidas a través de la molécula de membrana

y coestimulación CD28, que debe interactuar con CD80 y/o CD86, expresados en la superficie de CPAs activadas o maduras (Vergara, 2009) y como se puede observar en nuestros resultados la presencia de la citocina *IL-2* se encontraba muy disminuida.

En nuestro trabajo, se estudió la capacidad de proliferación de los linfocitos TCD8, en ausencia o en presencia de estímulos (PHA, BCG y Gag) mediante la medición de la incorporación de BrdU. Ogg y colaboradores (1999) encontraron que inmediatamente administrado el TAAE, la frecuencia de CTLs muestra una rápida fluctuación, resultando en la disminución de la subpoblación en sangre (Ogg y col., 1999). En nuestros ensayos observamos que la proliferación de las células TCD8 se ven significativamente afectadas en los niños infectados sin TAAE, posiblemente por la combinación de factores directos e indirectos asociados con la infección por VIH (Tan y col., 2002; Alfonzo y col., 2008). Por ejemplo, la expresión exacerbada de la molécula PD-1 se ha reportado como una posible causa de la disminución de la capacidad proliferativa en linfocitos T (Zhang y col., 2007), así como también la disminución en la expresión de la molécula CD127 (Paiardini y col., 2005; Faller y col., 2009), ambos parámetros alterados en las células de los niños estudiados en este trabajo. Incluso, hay que tener en cuenta que el sistema inmune del niño está aún en formación, y que cualquier efecto negativo del virus sobre la función tímica puede comprometer de un modo importante la maduración de su sistema inmune. De hecho, diversos estudios han demostrado que la infección por el VIH afecta negativamente al timo, tanto en niños como en adultos (Correa y col., 2002; Ruiz-Mateos y col., 2003).

Sin embargo, observamos que esta capacidad proliferativa de estas células se ve recuperada con el TAAE, llegando a alcanzar valores similares a los obtenidos en el grupo control, sugiriendo que el daño en esta respuesta efectora es reversible.

En presencia de Gag en nuestros cultivos, se pudo observar que la respuesta específica de proliferación, incrementa a medida que transcurre el tiempo de administración de TAAE, indicando que se produjo cierta recuperación, lo que está en consonancia con resultados obtenidos en otros trabajos que demostraron la expansión selectiva de CTLs específicos, y que TAAE no modificó la especificidad de las células T CD8 a los epitopes Gag y Env (Davey y col., 1999; Weekes y col., 2006).

Poco se ha dilucidado con respecto a la efectividad de los mecanismos de respuesta específica frente a la BCG en la co-infección con VIH bajo TAAE, aún menos en niños infectados. En nuestro ensayo logramos observar que la respuesta de las células TCD8 luego de introducir el TAAE resultó en una rápida reconstitución de la actividad proliferativa en respuesta al estímulo. Consideramos que estos resultados son muy interesantes ya que indican que la inmunización de los niños infectados con la vacuna BCG está comprometida por la infección viral pero pueden desarrollar la respuesta inmune contra este antígeno cuando se le administra TAAE. Se estudió igualmente la producción intracelular de perforina en los linfocitos T CD8 en ausencia o en presencia de estímulos (PHA, BCG y Gag) mediante la inhibición de su exocitosis utilizando Brefeldina A. La perforina es una proteína soluble, citolítica, sintetizada en las CTLs y almacenadas, junto con las proteasas serínicas de granzima, en los gránulos secretorios citotóxicos. Cuando las CTLs se unen a sus células blanco, los gránulos citotóxicos entran en contacto con las sinapsis inmunológicas donde se lleva a cabo la desgranulación,

permitiendo que la perforina permeabilice la membrana celular y que la granzima B entre en contacto con la célula blanco. Una vez internalizada, la granzima B inicia las vías apoptóticas dependientes e independientes de caspasas, destruyendo así las células blanco (Tang y col., 2011). Esta se ve afectada por la infección por VIH, se ha reportado que en presencia del virus hay baja expresión de Perforina en los gránulos de las CTLs (Montoya y col., 2006). En nuestro estudio, se pudo verificar que los niños infectados presentan en sus linfocitos TCD8 una profunda alteración de la producción de esta molécula cuando no están tratados para su enfermedad viral. Nuestros resultados obtenidos en la presencia de TAAE, indican claramente que la recuperación de esta respuesta efectora específica para BCG y Gag de los linfocitos T CD8 es muy lenta. No fue sino hasta el mes 22 de tratamiento que se pudo verificar valores similares de la producción de perforina en presencia de estos 2 antígenos en comparación a los valores de los niños sanos. Sin embargo, también podemos decir que esto es una fuerte evidencia de que la síntesis de perforina en los linfocitos T CD8 no se ve afectada por la ausencia de recuperación de la tasa de proliferación de estas células, tal como ha sido demostrado en trabajo previo (Hersperger y col., 2010). Similarmente, estos resultados sugieren que el TAAE posiblemente no logra recuperar directamente la producción de perforina en las CTLs, y que su recuperación observada a largo plazo, se deba más bien a la estabilización de otros parámetros inmunológicos como la síntesis de las citocinas IL-10, IL-2 y TNF- α (Zhang y col., 2003; Hersperger y col., 2010) o la recuperación de valores controles de la expresión de las moléculas pro-apoptóticas o de supervivencia, tal como fueron observados en este estudio.

Por último, quisimos estudiar la producción de las citocinas Th1/Th2 en el contexto de la infección por VIH. Este análisis lo realizamos tanto en plasma de sangre periférica como en sobrenadantes de cultivo de los niños estudiados. Como se sabe, las citocinas, son proteínas o glicoproteínas secretadas por las células inmunocompetentes, de bajo peso molecular (menos de 30 Kd) que a través de su interacción con receptores de superficie celular, regulan el desarrollo o la función de otra célula. Son agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y diferenciación celular, quimiotaxis, crecimiento y modulación de la secreción de inmunoglobulinas (Elizondo y col., 2011). El VIH tiene múltiples efectos en la producción de citocinas *ex vivo e in vitro* entre los que se incluyen efectos directos debidos a la infección de las células o a la unión del virus a la membrana celular y efectos indirectos mediados por la respuesta a la infección viral. Las proteínas virales solubles también pueden inducir directamente cierta producción de citocinas.

Se ha descrito que los pacientes VIH+, durante su progreso hacia el SIDA, presentan un perfil dominante Th2. Este perfil puede facilitar la replicación viral y suprimir la respuesta celular del sistema inmune (Ayash-Rashkovsky y col., 2002; Buonaguro y col., 2009). El papel del VIH en la desregulación de las vías de producción de citocinas en la patogénesis de la enfermedad es probablemente multifactorial. Muchas de las alteraciones, como el aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias, favorece la replicación del VIH y otras, como la disminución de la producción de IL-2, tienen efectos que son menos claros (Stylianou y col., 1999; Alpagote y col., 2003; Cohen, 2005). Cuando analizamos los valores obtenidos del plasma, no se logró observar ningún cambio apreciable en las concentraciones de las citocinas

estudiadas, debido probablemente a que en sangre las citocinas se encuentran muy diluidas. Sin embargo, con los estudios *in vitro* que desarrollamos en este estudio, los resultados obtenidos, a pesar de complejidad multifactorial, se puede comprender mejor la patogénesis provocada por el VIH bajo el contexto de la producción de ciertas citocinas.

Se conoce que la citocina IL-2, es esencial para promover la proliferación de células T y la diferenciación hacia células efectoras, es necesario para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular, así como para el reconocimiento de auto-antígenos y antígenos foráneos. Tiene una importante función en la regulación de las respuestas de los linfocitos T mediante su acción sobre los linfocitos T reguladores (Orsilles y col., 2006; Abbas y col., 2012). En nuestros ensayos, se pudo observar que los efectos antigénicos y mitogénicos fueron nulos, ya que los valores obtenidos en presencia de BCG, Gag y PHA fueron similares a los obtenidos del cultivo control, indicando con esto que esta respuesta efectora está profundamente afectada, la cual confirma resultados previos, los cuales demuestran claramente que la infección por VIH provoca que disminuya la capacidad de producción de IL-2 pero en linfocitos TCD4 aislados de los individuos infectados producen valores anormalmente bajos de IL-2 en respuesta a mitógenos o estimulación antigénica (Kapogiannis y col., 2006; Orsilles y col., 2006). Por otra parte, estos resultados podría deberse, en parte, a cuestiones técnicas, debido a que los resultados observados en todas las condiciones *in vitro* son similares. Diversos trabajos realizados para la determinación de esta citocina se ha realizado en cultivos de 48h e incluso en menor tiempo (Lee y col., 1996; Clerici y col., 2000). Posiblemente en nuestro protocolo, donde se mide a las 72 horas de cultivo esta citocina haya sido degradada, encontrando estos bajos valores. Sin embargo, numerosos trabajos han demostrado que hay

una menor producción de esta citocina en pacientes pediátricos VIH+ sin tratamiento (Lee y col., 1996; Resino y col., 2001b), disminución que está relacionada con un incremento en la producción de IL-4 e IL-10 (Kawamura y col., 2003).

EL TNF- α es una de las moléculas mas estudiadas en la infección por el VIH. Esta citocina con actividad proinflamatoria se ha encontrado en niveles muy altos, en cultivos *in vitro* de las CMSP y células TCD4+, y este aumento se ha relacionado con altas tasas en la replicación viral (Kedzierska y Crowe, 2001), por su capacidad de inducir la activación celular y la replicación viral mediante una vía autocrina (Muñoz-Fernandez y col., 1997). Al cuantificar la concentración de la citocina TNF- α en los sobrenadantes de cultivo celular encontramos que la estimulación por BCG y Gag no produjo cambios en su producción, ni aún cuando se administró el TAAE por 22 meses, ya que los valores del cultivo control fueron similares. Sin embargo, en presencia de PHA y en ausencia de TAAE, los valores son más bajos que los del grupo control pero bajo la administración de TAAE incrementan la producción de esta citocina que a partir del mes 10 comienzan a bajar nuevamente hasta llegar a valores similares a los del grupo control. Esto indica claramente que la infección VIH altera drásticamente esta respuesta efectora y que con la administración de TAAE se logra a largo plazo regular su producción. Pero también podemos decir que el incremento en la producción de esta citocina durante los primeros meses del TAAE, posiblemente se debe a una mejor activación de los mecanismos citotóxicos de linfocitos T. Sin embargo, la disminución de la carga viral, producto del TAAE, disminuye la activación de estas células y por lo tanto, promueve el decremento en la producción de esta citocina proinflamatoria.

Por su parte, el INF- γ coordina una amplia gama de funciones celulares a través de la regulación transcripcional de varios genes inmunológicamente importantes (Schroder y col., 2004), esta citoquina se produce predominantemente por células asesinas naturales (NK) y células T asesinas naturales (NKT) como parte de la respuesta inmune innata, y por las CTLs y las células T CD4 efectoras una vez que desarrolla la respuesta inmunitaria específica de tipo Th1 (Schoenborn y col., 2007), la cual es crítica para la inmunidad innata y adaptativa frente a las infecciones bacterianas y virales intracelulares (Dalton y col., 1993). En presencia del VIH han reportado resultados diversos. Algunos investigadores aseveran que la infección por VIH inhibe la producción de INF- γ , encontrándose una baja concentración de esta citocina en pacientes (Nicastri y col., 1999; Imami y col., 2004; Skolimowska y col., 2012), en tanto que otros aseveran que en condiciones de prolongado contacto con el virus, determina el enriquecimiento de la cubierta del VIH en moléculas de adhesión, lo que conduce a ampliar el espectro de hospederos del VIH, a la infección de células carentes del receptor CD4 y a una facilitación de la transmisión mediada por células. Estos datos argumentan a favor de un posible papel patogénico del INF- γ en la infección por VIH (Dianzani y col., 1997; Iwashiro y col., 2001). En nuestros resultados sin embargo, no encontramos cambios significativos en la concentración de INF- γ en los pacientes, estos valores se encontraban cercanos a los valores presentes en el grupo control, indicando que el VIH en estos pacientes no genera cambios aparentes en la síntesis de esta citocina.

La respuesta de protección inmunitaria específica contra la *M. tuberculosis* se inicia tras la activación de los linfocitos T CD4 capaces de secretar INF- γ . Sin embargo, existen otras subpoblaciones celulares involucradas durante la infección por tuberculosis como la de los

linfocitos T CD8 y linfocitos T gamma (Jiménez y col., 2001). Una vez activadas las células T, se inicia la secreción de un patrón específico de citocina, en el que la subpoblación de Th1 produce grandes cantidades de IL-2 e INF- γ , lo cual promueve la respuesta inmune celular y la activación de los macrófagos (Wesch y col., 1997). En respuesta a la vacuna BCG, observamos concentraciones de INF- γ similares a las del grupo control frente al mismo estímulo, lo que podría interpretarse que BCG no logra desarrollar la respuesta esperada tanto en niños sanos, como en niños infectados, ya que las concentraciones de INF- γ son similares a las encontradas en los cultivos sin presencia de ningún estímulo. Esta última hipótesis parece ser la más idónea, ya que varios autores, en base a sus resultados afirman la baja efectividad que presenta la vacuna BCG para producir memoria inmunitaria (Arbelaez y col., 2000; Britton, 2003; Andersen y col., 2005a, c; Barreto y col., 2006). Otra posible explicación de la ausencia de respuesta en presencia de BCG, es que es bien conocido que esta vacuna posee una eficacia relativa de 0-80%, debido principalmente a las diferentes variantes de la cepa (Andersen y Doherty, 2005; Trunz y col., 2006), por lo que nuestro resultado podría indicar que estos niños no establecen una respuesta inmune efectiva contra esta cepa de la vacuna. Pero también la edad influye en la respuesta celular del sistema inmune, el cual está inmaduro a corta edad y se desarrolla durante el crecimiento del individuo. Un trabajo que refuerza estas últimas afirmaciones fue realizado por el grupo de Weir y colaboradores (2008), quienes demostraron que la respuesta inmune contra la vacuna BCG aumenta con la edad, por lo que hace necesario extender este trabajo y estudiar la producción de esta citocina en niños con mayor edad.

La citocina IL-4, por su parte, es una citocina sintetizada por células T de tipo Th2, contrarresta la actividad mediada por la INF- γ (De Francesco y col., 2002), induce la activación

y diferenciación de los linfocitos B (Izuhara y col., 2002). En presencia de VIH se ha reportado que aumenta la síntesis de IL-4, y esta mejora la replicación viral en macrófagos (Buch y col., 2001). En nuestros ensayos no observamos resultados significativos. En presencia o ausencia de los estímulos (incluso frente a PHA), permaneció la concentración de la citocina en valores basales tanto en las CMSP de los niños infectados como de los niños sanos. Estos resultados son producto posiblemente del tiempo de recolección de los sobrenadantes de cultivo, ya que se ha reportado que para detectar la óptima concentración de esta citocina, la recolección del sobrenadante se debe realizar como muy temprano luego de 2 horas de incubación, y hasta 24 horas después, otros autores reportan haber logrado medir concentraciones óptimas luego de 6 días de cultivo (Ordway y col., 2004; Ibelgaufts, 2012; Vivas, 2013), lo que sugiere que nuestro protocolo para medir esta citocina no es el apropiado y es necesario modificarlo y realizar nuevos ensayos para estudiar el comportamiento de esta citocina. Sin embargo, investigaciones anteriores han reportado que frente a TAAE, la síntesis de IL-4 disminuye a valores cercanos a los presentes en individuos sanos (Kedzierska y col., 2001; Vecchiet y col., 2003), en tanto que en presencia de BCG aumenta como respuesta a la infección bacteriana (Martino y col., 2004; Li y col., 2012).

La citocina IL-6, por su parte es una molécula pleiotrópica con acciones pro-inflamatorias y antiinflamatorias. Diversas fuentes de evidencia la vinculan de modo importante y directo con la fisiopatología de diferentes enfermedades autoinmunes. Los efectos de la IL-6 en la inmunidad dependen del contexto y de su concentración local, así como de la presencia o ausencia de otras proteínas reguladoras que actúan en la vía de transducción de señales, o de la concentración de su receptor soluble (Choy, 2004; Abbas y col., 2012). La

infección por VIH induce en el organismo la producción de esta citocina, la cual induce a su vez la replicación del virus en las células T (Kedzierska y col., 2001), de igual forma, investigaciones anteriores han constatado que la estimulación con las glicoproteínas virales gp120 y gp40 incrementa la producción *in vitro* de la IL-6 (Capobianchi, 1996; Esser y col., 1998).

En nuestros ensayos observamos que la producción basal de IL-6 antes de comenzar el TAAE se encontraba disminuida en comparación con el grupo control e incrementa gradualmente con el uso del TAAE en los niños infectados, tendiendo a presentar mayores valores que en los niños sanos, hechos que son observados igualmente en las condiciones con todos los estímulos. Este resultado contradice lo descrito por otros investigadores, sin embargo, concuerda con los resultados que obtuvimos en la producción de TNF- α , relacionando de esta forma la funcionalidad de estas 2 citocinas. Varios trabajos describen una relación estrecha entre estas 2 citocinas, en la que TNF- α induce la síntesis de IL-6 y esta inhibe la producción de la primera (Poli y col., 1994; Anaya, 2003; López, 2012).

Con respecto a la citocina IL-10 se puede decir que es una importante citocina inmunoreguladora que actúa en las células presentadoras de antígenos mediante la inhibición tanto de la síntesis de citocinas como de moléculas co-estimuladoras y moléculas del complejo HLA clase II (Fonseca y col., 2011), inhibe la proliferación de células T principalmente por la supresión de citocinas de tipo Th1 (Moore y col., 2001). En ensayos *in vitro* se ha demostrado que tanto VIH como proteínas derivadas de él inducen una alta producción de esta citocina en CMSP (Taoufik y col., 1997; Barcova y col., 1999). Sin embargo hay evidencia que la infección por VIH de cepa M-tropico no induce elevación en la síntesis de IL-10 (Dereuddre-Bosquet y col., 1997). En nuestros ensayos no encontramos que se indujera altas tasas de síntesis de IL-

10, ni basales ni en presencia de todos los estímulos usados cuando los pacientes infectados estaban sin tratamiento por el contrario, nuestros resultados muestran una aparente inhibición de la síntesis de esta citocina, ya que los valores fueron menores a los del grupo de niños sanos. Naicker y colaboradores (2009) sugieren que la funcionalidad de IL-10 depende con el grado y fase de infección del individuo, describen que varios pacientes presentaron menores niveles de la citocina en presencia de altas cargas virales cuando el individuo estaba en fase crónica (Naicker y col., 2009), por lo que puede ser una causa más de la expansión viral, debido a que se ha demostrado en varios trabajos, que la IL-10 puede inhibir la replicación de VIH (Pantaleo y col., 1996; Wang y col., 1998; Naicker y col., 2009). Cuando se inició el TAAE en estos niños, se pudo evidenciar que la producción de esta citocina en presencia de PHA comienza a incrementar alcanzados valores cercanos a los del grupo control. Frente a BCG encontramos una producción mayor de la citocina, igualándose en el mes 22 a los niveles presentes en el grupo control, indicando posiblemente que se está recuperando la actividad inmunitaria frente a la vacuna y en consecuencia mejorando el cuadro inmunológico de estos niños.

Finalmente, al analizar los resultados en conjunto, observamos que la infección por VIH dirige al niño infectado a un estado severo de inmunosupresión y de desregulación de los mecanismos de acción efectivos del sistema inmunitario. Asimismo observamos, que si bien el VIH afecta principalmente a los linfocitos T CD4, el efecto de la infección en la subpoblación de linfocitos TCD8 es severo, afectando su funcionalidad, ya sea por mecanismos directos, como el efecto de la proteína gp120 que genera la producción de proteínas pro apoptóticas en las células CD8, como por mecanismos indirectos a través de la inducción o inhibición de la síntesis

de las citocinas necesarias para el efectivo accionar de esta subpoblación. Por otro lado, se pudo comprobar el efecto benéfico que provee el TAAE en estos niños, con la recuperación de la funcionalidad, cambios de la expresión de moléculas de superficie y de varios parámetros inmunológicos lo que permitirá entre otros beneficios, establecer una respuesta efectiva en contra de infecciones oportunistas como la TB. De igual manera pudimos comprobar que la combinación de la vacuna BCG con el TAAE, reporta beneficios a estos pacientes, en tanto que permitió establecer respuestas similares a los niños sanos al contacto con BCG en nuestros ensayos *in vitro*.

VIII. - CONCLUSIONES

- La disminución de la carga viral producto del TAAE en los niños VIH+ promueve la recuperación de algunos parámetros cualitativos y cuantitativos en la subpoblación de linfocitos TCD8 en tanto que en los linfocitos TCD4, observamos recuperación cuantitativa en corto tiempo.

- El protocolo utilizado no logro demostrar ninguna actividad efectora de los linfocitos T reguladores

- VIH ejerce profundos trastornos en algunas funciones efectoras de las células TCD8. La administración de TAAE logró recuperar algunos parámetros cualitativos de la subpoblación de linfocitos TCD8

- Observamos estrecha relación entre la carga viral en los niños infectados con la expresión de PD-1 en las células TCD8.

- VIH induce disminución en la producción de las citocinas Th1 y Th2 estudiadas, en los sobrenadantes de los cultivos realizados, lo que podría explicar parcialmente la alteración de la actividad efectora de los linfocitos T en estos niños.

- TAAE normalizó progresivamente la producción de IL-6, IL-10 y TNF- α , relacionándose con la normalización de otros parámetros fenotípicos y efectores de los linfocitos TCD8 estudiados.

- La vacuna BCG por si sola no logra establecer inmunización en los niños VIH+, sin embargo en combinación con TAAE logra establecerse una respuesta relativamente efectiva

- Es necesario el desarrollo de mas trabajos de investigación en niños VIH+ para el mejoramiento en el manejo de la infección en esta población.

IX. -BIBLIOGRAFIA

- AANDAHL, EM, MICHAELSSON J, MORETTO WJ, HECHT FM, NIXON DF. 2004. Human Cd4+ Cd25+ Regulatory T Cells Control T-Cell Responses to Human Immunodeficiency Virus and Cytomegalovirus Antigens. *Journal of virology*.78(5):2454-9.
- ABBAS, AK, LICHTMAN AHH, PILLAI S. 2012. *Inmunología Celular Y Molecular + Student Consult*. 7ma ed. Elsevier Health Sciences Spain.
- AFANÍ, A, AYALA M, MEYER A, CABRERA R, ACEVEDO W. 2005. Resistencia Primaria a Terapia Antirretroviral En Pacientes Con Infección Por Vih/Sida En Chile. *Rev Med Chile*.133:295-301.
- ALCAMÍ, J. 2000. Avances En La Inmunopatología De La Infección Por El Vih. *Enferm Infec Micr Cl*.2(8).
- ALFONZO, M. 2005. Las Células T Memoria: Un Enigma Aún Por Esclarecer. In: *Academia Biomédica digital*. <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=72&n=2814>.
- ALFONZO, M, SUAREZ GONZALEZ J, DÍAZ A, COMEGNA M, VALENZUELA P, SÁNCHEZ M, y col. 2008. Expresión Alterada De Receptores De Supervivencia (Cd127) Y De Muerte (Fas) En Linfocitos T Cd8 Totales, Vírgenes Y De Memoria De Pacientes Infectados Por El Virus De Inmunodeficiencia Humana: Posibles Implicaciones Para La Progresión De La Infección. *Investigacion clinica*.49(2):151-168.
- ALFONZO, MA, DIAZ A, SICILIANO L, LOPEZ MG, HUNG A, GARCIA JF. 2012. Functional State of Cd4+ and Cd8+ T Lymphocytes and Their Role in the Slow Progression of Hiv Infection in Pediatric Patients. *Jornal de pediatria*.88(2):161-8.
- ALGECIRAS, A, DOCKRELL DH, LYNCH DH, PAYA CV. 1998. Cd4 Regulates Susceptibility to Fas Ligand- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Apoptosis. *The Journal of experimental medicine*.187(5):711-20.
- ALPAGOTE, TFK, LEE AF. 2003. Longitudinal Evaluation of Gcf Ifn-Gamma Levels and Periodontal Status in Hiv+ Patients. *J Clin Periodontol*.30(11):944-948.
- ANAYA, JM. 2003. Descripción Molecular Del Tnf-A. *Reumatología*.19(2):112-120.
- ANDERSEN, P, DOHERTY TM. 2005a. Learning from Bcg: Designing a Better Tuberculosis Vaccine. *Discovery medicine*.5(28):383-7.
- ANDERSEN, P, DOHERTY TM. 2005b. The Success and Failure of Bcg- Implications for a Novel Tuberculosis Vaccine. *Nature*.3:656-662.
- ANDERSEN, P, DOHERTY TM. 2005c. The Success and Failure of Bcg - Implications for a Novel Tuberculosis Vaccine. *Nature reviews. Microbiology*.3(8):656-62.

APOIL, PA, PUISSANT B, ROUBINET F, ABBAL M, MASSIP P, BLANCHER A. 2005. Foxp3 Mrna Levels Are Decreased in Peripheral Blood Cd4+ Lymphocytes from Hiv-Positive Patients. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*.39(4):381-5.

ARAUJO, M. 2001. Las Terapias Antiretrovirales En La Infección Por Vih. In: MINISTERIO DE SALUD.

ARBELAEZ, MP, NELSON KE, MUNOZ A. 2000. Bcg Vaccine Effectiveness in Preventing Tuberculosis and Its Interaction with Human Immunodeficiency Virus Infection. *International journal of epidemiology*.29(6):1085-91.

ARRIGO, SJ, CHEN IS. 1991. Rev Is Necessary for Translation but Not Cytoplasmic Accumulation of Hiv-1 Vif, Vpr, and Env/Vpu 2 Rnas. *Genes & development*.5(5):808-19.

ASANTE, E, SKALKA A. 1999. Hiv-1 Integrase: Structural Organization, Conformational Changes, and Catalysis. *Adv Virus Res*.52:351-369.

AYASH-RASHKOVSKY, M, WEISMAN Z, DIVELEY J, MOSS RB, BENTWICH Z, BORKOW G. 2002. Generation of Th1 Immune Responses to Inactivated, Gp120-Depleted Hiv-1 in Mice with a Dominant Th2 Biased Immune Profile Via Immunostimulatory [Correction of Immunostimulatory] Oligonucleotides--Relevance to Aids Vaccines in Developing Countries. *Vaccine*.20(21-22):2684-92.

BADLEY, AD, DOCKRELL DH, ALGECIRAS A, ZIESMER S, LANDAY A, LEDERMAN MM, y col. 1998. In Vivo Analysis of Fas/FasL Interactions in Hiv-Infected Patients. *The Journal of clinical investigation*.102(1):79-87.

BANHAM, AH. 2006. Cell-Surface Il-7 Receptor Expression Facilitates the Purification of Foxp3(+) Regulatory T Cells. *Trends in immunology*.27(12):541-4.

BARBOZA, L. 2011. Métodos Para Evaluar La Respuesta Inmune. In: *Inmunologia Clinica*. <http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/2011/modulo10.pdf>: ULA.

BARCOVA, M, SPETH C, KACANI L, UBERALL F, STOIBER H, DIERICH MP. 1999. Involvement of Adenylate Cyclase and P70(S6)-Kinase Activation in Il-10 up-Regulation in Human Monocytes by Gp41 Envelope Protein of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*.437(4):538-46.

BARRETO, ML, PEREIRA SM, FERREIRA AA. 2006. Bcg Vaccine: Efficacy and Indications for Vaccination and Revaccination. *Jornal de pediatria*.82(3 Suppl):S45-54.

BAUMLER, CB, BOHLER T, HERR I, BENNER A, KRAMMER PH, DEBATIN KM. 1996. Activation of the Cd95 (Apo-1/Fas) System in T Cells from Human Immunodeficiency Virus Type-1-Infected Children. *Blood*.88(5):1741-6.

BERNAL, F. 2008. El Virus De Inmunodeficiencia Humana Vih Y El Sistema Nervioso. Principios Generales. *Acta Neurol Colomb.*24:124-141.

BI, X, SUZUKI Y, GATANAGA H, OKA S. 2009. High Frequency and Proliferation of Cd4+ Foxp3+ Treg in Hiv-1-Infected Patients with Low Cd4 Counts. *European journal of immunology.*39(1):301-9.

BOASSO, A, HARDY AW, LANDAY AL, MARTINSON JL, ANDERSON SA, DOLAN MJ, *y col.* 2008. Pdl-1 Upregulation on Monocytes and T Cells by Hiv Via Type I Interferon: Restricted Expression of Type I Interferon Receptor by Ccr5-Expressing Leukocytes. *Clinical immunology.*129(1):132-44.

BOURGEOIS, C, ROCHA B, TANCHOT C. 2002. A Role for Cd40 Expression on Cd8+ T Cells in the Generation of Cd8+ T Cell Memory. *Science.*297(5589):2060-3.

BRANDT, L, BENFIELD T, MENS H, CLAUSEN LN, KATZENSTEIN TL, FOMSGAARD A, *y col.* 2011. Low Level of Regulatory T Cells and Maintenance of Balance between Regulatory T Cells and Th17 Cells in Hiv-1-Infected Elite Controllers. *Journal of acquired immune deficiency syndromes.*57(2):101-8.

BRITTON, S. 2003. [Tuberculosis Epidemic Has Reached Africa. Hiv Infection Accelerates the Risk of Being Infected, the Bcg Vaccine Is Not Efficient Enough]. *Lakartidningen.*100(45):3576-7.

BUCH, S, PINSON D, KING CL, RAGHAVAN R, HOU Y, LI Z, *y col.* 2001. Inhibitory and Enhancing Effects of Ifn-Gamma and Il-4 on Shiv(Ku) Replication in Rhesus Macaque Macrophages: Correlation between Th2 Cytokines and Productive Infection in Tissue Macrophages During Late-Stage Infection. *Cytokine.*13(5):295-304.

BUONAGURO, L, TORNESELLO ML, GALLO RC, MARINCOLA FM, LEWIS GK, BUONAGURO FM. 2009. Th2 Polarization in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Human Immunodeficiency Virus (Hiv)-Infected Subjects, as Activated by Hiv Virus-Like Particles. *Journal of virology.*83(1):304-13.

CAMPBELL, GR, PASQUIER E, WATKINS J, BOURGAREL-REY V, PEYROT V, ESQUIEU D, *y col.* 2004. The Glutamine-Rich Region of the Hiv-1 Tat Protein Is Involved in T-Cell Apoptosis. *The Journal of biological chemistry.*279(46):48197-204.

CAPOBIANCHI, MR. 1996. Induction of Lymphomonocyte Activation by Hiv-1 Glycoprotein Gp120. Possible Role in Aids Pathogenesis. *Journal of biological regulators and homeostatic agents.*10(4):83-91.

CARPENTER, CC, FISCHL MA, HAMMER SM, HIRSCH MS, JACOBSEN DM, KATZENSTEIN DA, *y col.* 1998. Antiretroviral Therapy for Hiv Infection in 1998: Updated Recommendations of the International Aids Society-USA Panel. *Jama.*280(1):78-86.

CARRIZO, JT. 2008. Manual De Vacunas. 1ra ed. Caracas, Venezuela.

CATALFAMO, M, WILHELM C, TCHEUNG L, PROSCHAN M, FRIESEN T, PARK JH, *y col.* 2011. Cd4 and Cd8 T Cell Immune Activation During Chronic Hiv Infection: Roles of Homeostasis, Hiv, Type I Ifn, and Il-7. *Journal of immunology.*186(4):2106-16.

CERWENKA, A, CARTER L, REOME J, SWAIN SL, DUTTON RW. 1998. In Vivo Persistence of Cd8 Polarized T Cell Subsets Producing Type 1 or Type 2 Cytokines. *Journal of immunology.*161:97-105.

CLARK, DR, DE BOER RJ, WOLTHERS KC, MIEDEMA F. 1999. T Cell Dynamics in Hiv-1 Infection. *Advances in immunology.*73:301-27.

COHEN, J. 2005. Retrovirus Meeting. Gut Assumes Sinister New Role in Hiv Pathogenesis. *Science.*307(5714):1395.

CORBEIL, J, RICHMAN DD. 1995. The Role of Surface Cd4 in Hiv-Induced Apoptosis. *Advances in experimental medicine and biology.*374:91-9.

CORREA, R, MUNOZ-FERNANDEZ A. 2002. Effects of Highly Active Antiretroviral Therapy on Thymical Reconstitution of Cd4 T Lymphocytes in Vertically Hiv-Infected Children. *Aids.*16(8):1181-3.

CRUM, NF, RIFFENBURGH RH, WEGNER S, AGAN BK, TASKER SA, SPOONER KM, *y col.* 2006. Comparisons of Causes of Death and Mortality Rates among Hiv-Infected Persons: Analysis of the Pre-, Early, and Late Haart (Highly Active Antiretroviral Therapy) Eras. *J Acq Immun Def Synd.*41:194-200.

CHASE, AJ, SEDAGHAT AR, GERMAN JR, GAMA L, ZINK MC, CLEMENTS JE, *y col.* 2007. Severe Depletion of Cd4+ Cd25+ Regulatory T Cells from the Intestinal Lamina Propria but Not Peripheral Blood or Lymph Nodes During Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection. *Journal of virology.*81(23):12748-57.

CHASE, AJ, YANG HC, ZHANG H, BLANKSON JN, SILICIANO RF. 2008. Preservation of Foxp3+ Regulatory T Cells in the Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Elite Suppressors Correlates with Low Cd4+ T-Cell Activation. *Journal of virology.*82(17):8307-15.

CHAVAN, SJ, TAMMA SL, KAPLAN M, GERSTEN M, PAHWA SG. 1999. Reduction in T Cell Apoptosis in Patients with Hiv Disease Following Antiretroviral Therapy. *Clinical immunology.*93(1):24-33.

CHÁVEZ, A. 2000. Infección Por Vih En Pediatría. *Rev Chilena ped.*71(2):89-97.

CHOE, H, FARZAN M, SUN Y, SULLIVAN N, ROLLINS B, PONATH PD, *y col.* 1996. The Beta-Chemokine Receptors Ccr3 and Ccr5 Facilitate Infection by Primary Hiv-1 Isolates. *Cell.*85(7):1135-48.

CHOY, E. 2004. Clinical Experience with Inhibition of Interleukin-6. *Rheumatic diseases clinics of North America.*30(2):405-15, viii.

DALTON, DK, PITTS-MEEK S, KESHAV S, FIGARI IS, BRADLEY A, STEWART TA. 1993. Multiple Defects of Immune Cell Function in Mice with Disrupted Interferon-Gamma Genes. *Science*.259(5102):1739-42.

DANNENBERG, AM, JR. 2010. Perspectives on Clinical and Preclinical Testing of New Tuberculosis Vaccines. *Clinical microbiology reviews*.23(4):781-94.

DAVEY, RT, JR., BHAT N, YODER C, CHUN TW, METCALF JA, DEWAR R, *y col*. 1999. Hiv-1 and T Cell Dynamics after Interruption of Highly Active Antiretroviral Therapy (Haart) in Patients with a History of Sustained Viral Suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.96(26):15109-14.

DE FRANCESCO, MA, BARONIO M, FIORENTINI S, SIGNORINI C, BONFANTI C, POIESI C, *y col*. 2002. Hiv-1 Matrix Protein P17 Increases the Production of Proinflammatory Cytokines and Counteracts Il-4 Activity by Binding to a Cellular Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.99(15):9972-7.

DE HAES, W, POLLARD C, VANHAM G, REJMAN J. 2012. "Wrapped up" Vaccines in the Context of Hiv-1 Immunotherapy. In: Metodiev PK, editor. Immunodeficiency. <http://www.intechopen.com/books/immunodeficiency/-wrapped-up-vaccines-in-the-context-of-hiv-1-immunotherapy>.

DEREUDDRE-BOSQUET, N, CLAYETTE P, MARTIN M, BENVENISTE O, FRETIER P, JACCARD P, *y col*. 1997. Lack of Interleukin 10 Expression in Monocyte-Derived Macrophages in Response to in Vitro Infection by Hiv Type 1 Isolates. *AIDS research and human retroviruses*.13(11):961-6.

DIANZANI, F, CAPOBIANCHI MR. 1997. Interferon as a Possible Pathogenetic Factor in Hiv Infection. *Biotecnologia Aplicada*.14(2):81-90.

DOHERTY, PC. 1998. The Numbers Game for Virus-Specific Cd8+ T Cells. *Science*.280(5361):227.

DOUEK, D, PICKER LJ, KOUP RA. 2003. T Cell Dynamics I Hiv-1 Infection. *Annu. Rev. Immunol.*;21:265-304.

ECHEVERRÍA, G, AZUAJE LD, COLMENARES NB, RODRÍGUEZ L, MARÍN ME, COMEGNA M, *y col*. 2006. Vih Y El Sida En Venezuela. Colección Razetti.2.

EGGENA, MP, BARUGAHARE B, JONES N, OKELLO M, MUTALYA S, KITYO C, *y col*. 2005. Depletion of Regulatory T Cells in Hiv Infection Is Associated with Immune Activation. *Journal of immunology*.174(7):4407-14.

EICHBAUM, Q. 2011. Pd-1 Signaling in Hiv and Chronic Viral Infection--Potential for Therapeutic Intervention? *Current medicinal chemistry*.18(26):3971-80.

ELIZONDO, JE, TREVIÑO AC, ROCHA M, ÁLVAREZ M. 2011. Análisis Proteómico De Expresión De Citocinas En Líquido Crevicular Gengival De Portadores De Vih/Sida. Ensayo Analítico. Revista Mexicana de Periodontología.2(3):88-96.

ESSER, R, GLIENKE W, ANDREESEN R, UNGER RE, KREUTZ M, RUBSAMEN-WAIGMANN H, y col. 1998. Individual Cell Analysis of the Cytokine Repertoire in Human Immunodeficiency Virus-1-Infected Monocytes/Macrophages by a Combination of Immunocytochemistry and in Situ Hybridization. Blood.91(12):4752-60.

FAINBOIM, L, GEFFNER J. 2005. Introducción a La Inmunología Humana. Editorial Medica Panamericana Sa de.

FALLER, E, KAKAL J, KUMAR R, MACPHERSON P. 2009. Il-7 and the Hiv Tat Protein Act Synergistically to Down-Regulate Cd127 Expression on Cd8 T Cells. International immunology.21(3):203-16.

FANLO, P, TIBERIO G. 2007. Tuberculosis Extrapulmonar. An Sist Sanit Navar.30(2):143-162.

FLUUR, C, DE MILITO A, FRY TJ, VIVAR N, EIDSMO L, ATLAS A, y col. 2007. Potential Role for Il-7 in Fas-Mediated T Cell Apoptosis During Hiv Infection. Journal of immunology.178(8):5340-50.

FONSECA, GC, FURUZAWA J, MARTÍNEZ B, BARRETO R, YAMAMOTO J. 2011. Expresión De La Interleucina (Il-10) Con Función Inmunorreguladora En Mucosa De Pacientes Con Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática. Rev Gastroenterol Mex.76(2):113-119.

FRANCO, JM, LEON-LEAL JA, LEAL M, CANO-RODRIGUEZ A, PINEDA JA, MACIAS J, y col. 2000. Cd4+ and Cd8+ T Lymphocyte Regeneration after Anti-Retroviral Therapy in Hiv-1-Infected Children and Adult Patients. Clinical and experimental immunology.119(3):493-8.

GARCIA, JR, LEVY G, VALERA J, PONTE H, MÉNDEZ R. 2010. Directrices Para El Despistaje, Diagnóstico Y Tratamiento De La Tuberculosis En Pacientes Con Indicación De Terapias Biológica. In: Salud MdPPpl, editor. <http://www.mpps.gob.ve/images/stories/pdf/directrices%20para%20el%20despistaje%20diagntico%20y%20tratamiento%20de%20la%20tuberculosis%20en%20pacientes%20con%20indicacin%20de%20terapias%20biologicas.pdf>.

GEIJTENBEEK, T, KWON D, TORENSMA R, VAN VILET S, VAN DUIJNHOFEN G, MIDDLE J, y col. 2000. Dc-Sign, a Dendritic Cell-Specific Hiv-1 Binding Protein That Enhance Trans-Infection to T Cells. Cell.100:587-597.

GONZÁLEZ, I, GIL L, MOLINA R, GONZÁLEZ A, TOLEDO ME, DÍAZ-JIDY M, y col. 2005. Características Inmunológicas De Los Niños Infectados Por Vía Vertical Con El Vih: Estudio De Casos Y Controles. Revista de Investigación Clínica.57(4):498-504.

GONZÁLEZ, JRR, LARREA CL. 2011. Inmunología: Biología Y Patología Del Sistema Inmune. 4 ed. Editorial Medica Panamericana Sa de.

GRANT, AD, SIDIBE K, DOMOUA K, BONARD D, SYLLA-KOKO F, DOSSO M, *y col.* 1998. Spectrum of Disease among Hiv-Infected Adults Hospitalised in a Respiratory Medicine Unit in Abidjan, Cote D'ivoire. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease.*2(11):926-34.

GRANT, IH, GOLD JW, ROSENBLUM M, NIEDZWIECKI D, ARMSTRONG D. 1990. Toxoplasma Gondii Serology in Hiv-Infected Patients: The Development of Central Nervous System Toxoplasmosis in Aids. *Aids.*4(6):519-21.

GULICK, RM, MELLORS JW, HAVLIR D, ERON JJ, MEIBOHM A, CONDRA JH, *y col.* 2000. 3-Year Suppression of Hiv Viremia with Indinavir, Zidovudine, and Lamivudine. *Annals of internal medicine.*133(1):35-9.

GUTIERREZ, R, GOTUZZO E. 2006. Co-Infeccion Vih-Tuberculosis.

HARTIGAN-O'CONNOR, DJ, POON C, SINCLAIR E, MCCUNE JM. 2007. Human Cd4+ Regulatory T Cells Express Lower Levels of the Il-7 Receptor Alpha Chain (Cd127), Allowing Consistent Identification and Sorting of Live Cells. *Journal of immunological methods.*319(1-2):41-52.

HARTY, J, TVINNEREIM A, D. W. 2000. Cd8+ T Cell Effectors Mechanisms in Resistance to Infection. *Annual review of immunology.*18:275-308.

HERNANDEZ, J, AUNG S, MARQUARDT K, SHERMAN LA. 2002. Uncoupling of Proliferative Potential and Gain of Effector Function by Cd8(+) T Cells Responding to Self-Antigens. *The Journal of experimental medicine.*196(3):323-33.

HERSPERGER, AR, PEREYRA F, NASON M, DEMERS K, SHETH P, SHIN LY, *y col.* 2010. Perforin Expression Directly Ex Vivo by Hiv-Specific Cd8 T-Cells Is a Correlate of Hiv Elite Control. *PLoS pathogens.*6(5):e1000917.

HESSELING, AC, MARAIS BJ, GIE RP, SCHAAF S, FINE PE, GODFREY-FAUSSETT P, *y col.* 2007. The Risk of Disseminated Bacille Calmette-Guerin (Bcg) Disease in Hiv-Infected Children. *Vaccine.*25:14-18.

IAÑEZ, E. 1999. Curso De Inmunología General: 1. Maduración, Activación Y Diferenciación De Los Linfocitos T. In: http://www.ugr.es/~eianez/inmuno/cap_11.htm.

IBELGAUFTS, H. 2012. Cytokines and Cells Online Pathfinder Encyclopedia. In: www.copewithcytokines.org.

IMAMI, N, ANTONOPOULOS C, HARDY G, GAZZARD B, GOTCH F. 2004. Assessment of Type 1 and Type 2 Cytokines in Hiv Type 1-Infected Individuals: Impact of Highly Active Antiretroviral Therapy. *AIDS research and human retroviruses*.15(17):1499-1508.

IWASHIRO, M, PETERSON K, MESSER RJ, STROMNES IM, HASENKRUG KJ. 2001. Cd4(+) T Cells and Gamma Interferon in the Long-Term Control of Persistent Friend Retrovirus Infection. *Journal of virology*.75(1):52-60.

IZUHARA, K, ARIMA K, YASUNAGA S. 2002. Il-4 and Il-13: Their Pathological Roles in Allergic Diseases and Their Potential in Developing New Therapies. *Current drug targets. Inflammation and allergy*.1(3):263-9.

JAFFAR, S, GRANT AD, WHITWORTH J, SMITH PG, WHITTLE H. 2004. The Natural History of Hiv-1 and Hiv-2 Infections in Adults in Africa: A Literature Review. *Bulletin of the World Health Organization*.82(6):462-9.

Jl, J, CLOYD MW. 2009. Hiv-1 Binding to Cd4 on Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells Enhances Their Suppressive Function and Induces Them to Home to, and Accumulate in, Peripheral and Mucosal Lymphoid Tissues: An Additional Mechanism of Immunosuppression. *International immunology*.21(3):283-94.

JIANG, H, CHESS L. 2004. An Integrated View of Suppressor T Cell Subsets in Immunoregulation. *The Journal of clinical investigation*.114(1198-1208).

JIMÉNEZ, MMC, BÁEZ SR, LINARES CM, CHÁVEZ SR. 2001. Avances En El Estudio De Los Mecanismos Celulares De La Supresión De La Respuesta Inmunitaria En La Tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*.14(1):39-48.

JOUANGUY, E, DOFFINGER R, DUPUIS S, PALLIER A, ALTARE F, CASANOVA JL. 1999. Il-12 and Ifn-Gamma in Host Defense against Mycobacteria and Salmonella in Mice and Men. *Current opinion in immunology*.11(3):346-51.

JU, ST, PANKA DJ, CUI H, ETTINGER R, EL-KHATIB M, SHERR DH, y col. 1995. Fas(Cd95)/FasL Interactions Required for Programmed Cell Death after T-Cell Activation. *Nature*.373(6513):444-8.

KÄGI, D, LEDERMANN B, BÜRKI K, ZINKERNAGEL RM, HENGARTNER H. 1996. Molecular Mechanisms of Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity and Their Role in Immunological Protection and Pathogenesis *in Vivo*. *Annual review of immunology*.14.

KAPOGIANNIS, BG, HENDERSON SL, NIGAM P, SHARMA S, CHENNAREDDI L, HERNDON JG, y col. 2006. Defective Il-2 Production by Hiv-1-Specific Cd4 and Cd8 T Cells in an Adolescent/Young Adult Cohort. *AIDS research and human retroviruses*.22(3):272-82.

KAWAMURA, T, GATANAGA H, BORRIS DL, CONNORS M, MITSUYA H, BLAUVELT A. 2003. Decreased Stimulation of Cd4+ T Cell Proliferation and Il-2 Production by Highly Enriched Populations of Hiv-Infected Dendritic Cells. *Journal of immunology*.170(8):4260-6.

KEDZIERSKA, K, CROWE SM. 2001. Cytokines and Hiv-1: Interactions and Clinical Implications. *Antiviral chemistry & chemotherapy*.12(3):133-50.

KINDT, TJ, GOLDSBY RA, OSBORNE BA, MARTÍNEZ RP. 2007. *Inmunología De Kuby*. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.

KIWANUKA, N, LAEYENDECKER O, ROBB M, KIGOZI G, ARROYO M, MCCUTCHAN F, *y col*. 2008. Effect of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (Hiv-1) Subtype on Disease Progression in Persons from Rakai, Uganda, with Incident Hiv-1 Infection. *The Journal of infectious diseases*.197(5):707-13.

KLINGER, J, DÍAS M, GARCIA LB, TOVAR CI, AVILA GI. 2001. Correlación Inmunológica Cd4 - Cd8 Y Carga Viral En La Infección Por Vih. *Infection*.5(2).

KNECHEL, NA. 2009. Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. *Critical care nurse*.29(2):34-43; quiz 44.

KRANTZ, EM, HULLSIEK KH, OKULICZ JF, WEINTROB AC, AGAN BK, CRUM-CIANFLONE NF, *y col*. 2011. Elevated Cd8 Counts During Haart Are Associated with Hiv Virologic Treatment Failure. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*.57(5):396-403.

KUMAR, V, ABBAS AK, FAUSTO N, MITCHELL RN. 2007. *Robbins Basic Pathology*. 8va ed. Pennsylvania, E.E.U.U.

KWONG, P, WYATT R, ROBINSON J, SWEET RW, SODROSKI J, HENDRICKSON W. 1998. Structure of an Hiv Gp120 Envelope Glycoprotein in Complex with the Cd4 Receptor and a Neutralizing Human Antibody. *Nature*.393:648-659.

LE MOING, V, THIEBAUT R, CHENE G, SOBEL A, MASSIP P, COLLIN F, *y col*. 2007. Long-Term Evolution of Cd4 Count in Patients with a Plasma Hiv Rna Persistently <500 Copies/MI During Treatment with Antiretroviral Drugs. *HIV medicine*.8(3):156-63.

LEHMAN-CHE, J, SAÏB A. 2004. Early Stages of Hiv Replication: How the Hijack Cellular Functions for a Successful Infection. *AIDS reviews*.6:351-369.

LEVY, Y, SERETI I, TAMBUSI G, ROUTY JP, LELIEVRE JD, DELFRAISSY JF, *y col*. 2012. Effects of Recombinant Human Interleukin 7 on T-Cell Recovery and Thymic Output in Hiv-Infected Patients Receiving Antiretroviral Therapy: Results of a Phase I/IIa Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*.55(2):291-300.

LI, Q, LI J, TIAN J, ZHU B, ZHANG Y, YANG K, *y col.* 2012. Il-17 and Ifn-Gamma Production in Peripheral Blood Following Bcg Vaccination and Mycobacterium Tuberculosis Infection in Human. *European review for medical and pharmacological sciences.*16(14):2029-36.

LIANG, C, WAINBERG MA. 2002. The Role of Tat in Hiv-1 Replication: An Activator and/or a Suppressor? *AIDS reviews.*4(1):41-9.

LIBERMANN, C. 1958. [Several Isoniazid-Resistant Strains of Mycobacterium Tuberculosis Highly Pathogenic for Guinea Pigs. I. Description of Strains]. *Annales de l'Institut Pasteur.*94(3):310-31.

LIU, J, TRAN V, LEUNG AS, ALEXANDER DC, ZHU B. 2009. Bcg Vaccines: Their Mechanisms of Attenuation and Impact on Safety and Protective Efficacy. *Human vaccines.*5(2):70-8.

LÓPEZ, E. 2012. Citocinas Inflamatorias En Sistema Nervioso Central. *RESPYN.*13(4).

LYNCH, DH, RAMSDELL F, ALDERSON MR. 1995. Fas and FasL in the Homeostatic Regulation of Immune Responses. *Immunology today.*16(12):569-74.

MALIM, MH, HAUBER J, LE SY, MAIZEL JV, CULLEN BR. 1989. The Hiv-1 Rev Trans-Activator Acts through a Structured Target Sequence to Activate Nuclear Export of Unspliced Viral Mrna. *Nature.*338(6212):254-7.

MARTINO, A, SACCHI A, SANARICO N, SPADARO F, RAMONI C, CIARAMELLA A, *y col.* 2004. Dendritic Cells Derived from Bcg-Infected Precursors Induce Th2-Like Immune Response. *Journal of leukocyte biology.*76(4):827-34.

MAULEN, N. 2011. Factores De Virulencia De *Mycobacterium Tuberculosis*. *Rev Med* 139:1605-1610.

MIGUELES, SA, LABORICO AC, SHUPERT WL, SABBAGHIAN MS, RABIN R, HALLAHAN CW, *y col.* 2002. Hiv-Specific Cd8+ T Cell Proliferation Is Coupled to Perforin Expression and Is Maintained in Nonprogressors. *Nature immunology.*3(11):1061-8.

MIGUELES, SA, OSBORNE CM, ROYCE C, COMPTON AA, JOSHI RP, WEEKS KA, *y col.* 2008. Lytic Granule Loading of Cd8+ T Cells Is Required for Hiv-Infected Cell Elimination Associated with Immune Control. *Immunity.*29(6):1009-21.

MONTOYA, CJ. 2010. Caracterización De Las Celulas T Reguladoras Por Citometria De Flujo: Estado Del Arte Y Controversias. *Biomedica.*30:37-44.

MONTOYA, CJ, MORENO ME, RUGELES MT. 2006. Reacciones Y Alteraciones Del Sistema Inmune Durante La Infección Por El Vih-1. *infectio.*10(4):250-265.

MOORE, KW, DE WAAL MALEFYT R, COFFMAN RL, O'GARRA A. 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual review of immunology.*19:683-765.

- MORONI, M, ANTINORI S. 2003. Hiv and Direct Damage of Organs: Disease Spectrum before and During the Highly Active Antiretroviral Therapy Era. *Aids*.17 Suppl 1:S51-64.
- MORONTA, R, PORTO L, CUADRA C, LLERAS A, VILLALOBOS H, ARAUJO M, y col. 2005. Determinación De Linfocitos T Cd4 Y Cd8 En Niños Vih Positivos Con Terapia Antirretroviral. *VITAE Academia Biomedicina Digital*.26.
- MOYLE, GJ, GAZZARD BG, COOPER DA, GATELL J. 1998. Antiretroviral Therapy for Hiv Infection. A Knowledge-Based Approach to Drug Selection and Use. *Drugs*.55(3):383-404.
- MPPS. 2011. Informe Nacional De Avances En La Implementación De La Declaración De Compromisos Sobre Vih/Sida (2001) Y La Declaración Política Sobre Vih/Sida (2011) In: Exteriores MdPPpR, editor. http://www.unaids.org/en/dataanalysis/knowyourresponse/countryprogressreports/2014countries/VEN_narrative_report_2014.pdf.
- MUÑOZ, E, PEÑA J. 2005. Activación Linfocitos T.
- MURPHY, KM. 2009. Inmunobiología De Janeway. McGraw-Hill Interamericana de España S.L.
- MURRAY, P, ROSENTHAL K, PFAÜER M. 2009. Microbiología Medica. Quinta ed. Madrid, España.
- NAICKER, DD, WERNER L, KORMUTH E, PASSMORE JA, MLISANA K, KARIM SA, y col. 2009. Interleukin-10 Promoter Polymorphisms Influence Hiv-1 Susceptibility and Primary Hiv-1 Pathogenesis. *The Journal of infectious diseases*.200(3):448-52.
- NAVARRETE, P. 2006. Estudio De Los Cambios Viroológicos Y De Inmunidad Celular En Tegido Amigdalario Tras Tratamiento Antiretroviral En Pacientes Infectados Por Vih En Estado Temprano De La Infección [Trabajo Especial de Grado] Programa de Biopatología en Medicina, Universidad de Barcelona.
- NEBULONI, M, ZAWADA L, FERRI A, TOSONI A, ZERBI P, RESNATI M, y col. 2013. Hiv-1 Infected Lymphoid Organs Upregulate Expression and Release of the Cleaved Form of Upar That Modulates Chemotaxis and Virus Expression. *PloS one*.8(7):e70606.
- NICASTRI, E, SARMATI L, ERCOLI L, MANCINO G, D'AMBROSIO E, D'ETTORRE G, y col. 1999. Reduction of Ifn-Gamma and Il-2 Production by Peripheral Lymphocytes of Hiv-Exposed Seronegative Subjects. *Aids*.13(11):1333-6.
- NILSSON, J, BOASSO A, VELILLA PA, ZHANG R, VACCARI M, FRANCHINI G, y col. 2006. Hiv-1-Driven Regulatory T-Cell Accumulation in Lymphoid Tissues Is Associated with Disease Progression in Hiv/Aids. *Blood*.108(12):3808-17.

NOMURA, T, SAKAGUCHI S. 2007. Foxp3 and Aire in Thymus-Generated Treg Cells: A Link in Self-Tolerance. *Nature immunology*.8(4):333-4.

OGG, GS, JIN X, BONHOEFFER S, MOSS P, NOWAK MA, MONARD S, y col. 1999. Decay Kinetics of Human Immunodeficiency Virus-Specific Effector Cytotoxic T Lymphocytes after Combination Antiretroviral Therapy. *Journal of virology*.73(1):797-800.

OHKURA, N, HAMAGUCHI M, MORIKAWA H, SUGIMURA K, TANAKA A, ITO Y, y col. 2012. T Cell Receptor Stimulation-Induced Epigenetic Changes and Foxp3 Expression Are Independent and Complementary Events Required for Treg Cell Development. *Immunity*.37(5):785-99.

ONUSIDA. 2012. Informe De Onusida Sobre La Epidemia Mundial De Sida.

ONUSIDA. 2013. Informe Sobre La Epidemia Mundial Del Sida. In: http://onuidave.files.wordpress.com/2012/11/20130923_factsheet_global_es.pdf.

ORDWAY, DJ, COSTA L, MARTINS M, SILVEIRA H, AMARAL L, ARROZ MJ, y col. 2004. Increased Interleukin-4 Production by Cd8 and Gammadelta T Cells in Health-Care Workers Is Associated with the Subsequent Development of Active Tuberculosis. *The Journal of infectious diseases*.190(4):756-66.

ORSILLES, MA, PIERI E, COOKE P, CAULA C. 2006. Il-2 and Il-10 Serum Levels in Hiv-1-Infected Patients with or without Active Antiretroviral Therapy. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*.114(1):55-60.

PAIARDINI, M, CERVASI B, ALBRECHT H, MUTHUKUMAR A, DUNHAM R, GORDON S, y col. 2005. Loss of Cd127 Expression Defines an Expansion of Effector Cd8+ T Cells in Hiv-Infected Individuals. *Journal of immunology*.174(5):2900-9.

PANTALEO, G, FAUCI AS. 1996. Immunopathogenesis of Hiv Infection. *Annual review of microbiology*.50:825-54.

PANVINI, J, GONZALES G, PÉREZ Y, SANTOS S, SARMIENTO S, DEL NOGAL B. 2012. Las Vacunas En El Niño Sano. *Actualizaciones en Pediatría y Puericultura* [serial online] [cited Date Cited Year Cited];Volume(Issue)]. Available at:

PARANJAPE, RS. 2005. Immunopathogenesis of Hiv Infection. *The Indian journal of medical research*.121(4):240-55.

PARNES, JR, VON HOEGEN P, MICELI MC, ZAMOYSKA R. 1989. Role of Cd4 and Cd8 in Enhancing T-Cell Responses to Antigen. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*.54 Pt 2:649-55.

PELINI, C. 2013. Tuberculosis, Causas Y Prevencion.

PEÑUELA, M, VÁSQUEZ M, K. DLR, HERNANDEZ H, COLLAZOS J, MIRANDA Y. 2006. Factores Asociados a La Coinfección Vih/Sida-Tuberculosis. *Salud Uninorte*.22(1):5-19.

POLI, G, BISWAS P, FAUCI AS. 1994. Interferons in the Pathogenesis and Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection. *Antiviral research*.24(2-3):221-33.

POPOV, S, REXACH M, ZYBARTH G, REILING N, LEE MA, RATNER L, y col. 1998. Viral Protein R Regulates Nuclear Import of the Hiv-1 Pre-Integration Complex. *The EMBO journal*.17(4):909-17.

RAMIREZ DE ARELLANO, E, SORIANO V, ALCAMIL J, HOLGUIN A. 2006. New Findings on Transcription Regulation across Different Hiv-1 Subtypes. *AIDS reviews*.8(1):9-16.

RESINO, S, GURBINDO D, BELLÓN JM, SÁNCHEZ-RAMÓN S, MUÑOZ-FERNANDEZ MA. 2000. Predictive Markers of Clinical Outcome in Vertically Hivp1 Infected Infants. A Prospective Longitudinal Study. *Pediatric research*.47.

RIDGE, JP, DI ROSA F, MATZINGER P. 1998. A Conditioned Dendritic Cell Can Be a Temporal Bridge between a Cd4+ T-Helper and a T-Killer Cell. *Nature*.393(6684):474-8.

RIVAS, B, VIEYRA P, ARAUJO M. 2005. The Cellular Immune Response in Pulmonary Tuberculosis. *Investigacion clinica*.46:391-412.

RODRIGUEZ-GARCIA, M, PORICHIS F, DE JONG OG, LEVI K, DIEFENBACH TJ, LIFSON JD, y col. 2011. Expression of Pd-L1 and Pd-L2 on Human Macrophages Is up-Regulated by Hiv-1 and Differentially Modulated by Il-10. *Journal of leukocyte biology*.89(4):507-15.

ROJO, JM. 2012. Guía De Manejo Antirretroviral De Las Personas Con Vih. In: http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/atencion/GUIA_ARV_2012.pdf.

RUEDA, CM, VELILLA PA, RUGELES MT. 2009. Células T Reguladoras Naturales Durante La Infección Por El Vih: El Tejido Linfoide Como Blanco Primario De La Replicación Viral. *Iatreia*.22:156-168.

RUIZ-MATEOS, E, DE LA ROSA R, FRANCO JM, MARTINEZ-MOYA M, RUBIO A, SORIANO N, y col. 2003. Endogenous Il-7 Is Associated with Increased Thymic Volume in Adult Hiv-Infected Patients under Highly Active Antiretroviral Therapy. *Aids*.17(7):947-54.

SAID, EA, DUPUY FP, TRAUTMANN L, ZHANG Y, SHI Y, EL-FAR M, y col. 2010. Programmed Death-1-Induced Interleukin-10 Production by Monocytes Impairs Cd4+ T Cell Activation During Hiv Infection. *Nature medicine*.16(4):452-9.

SAKAGUCHI, S, SAKAGUCHI N, ASANO M, ITOH M, TODA M. 1995. Immunologic Self-Tolerance Maintained by Activated T Cells Expressing Il-2 Receptor Alpha-Chains (Cd25). Breakdown of a Single Mechanism of Self-Tolerance Causes Various Autoimmune Diseases. *Journal of immunology*.155(3):1151-64.

SAKAGUCHI, S, TAKAHASHI T, HATA H, NOMURA T, TAGAMI T, YAMAZAKI S, *y col.* 2003. Altered Thymic T-Cell Selection Due to a Mutation of the Zap-70 Gene Causes Autoimmune Arthritis in Mice. *Nature*.426(6965):454-60.

SATTENTAU, Q, WEISS RA. 1988. The Cd4 Antigen: Physiological Ligand and Hiv Receptor. *Cell*.52(5):631-633.

SCHOENBERGER, SP, TOES RE, VAN DER VOORT EI, OFFRINGA R, MELIEF CJ. 1998. T-Cell Help for Cytotoxic T Lymphocytes Is Mediated by Cd40-Cd40l Interactions. *Nature*.393(6684):480-3.

SCHOENBORN, JR, WILSON CB. 2007. Regulation of Interferon-Gamma During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in immunology*.96:41-101.

SCHRODER, K, HERTZOG PJ, RAVASI T, HUME DA. 2004. Interferon-Gamma: An Overview of Signals, Mechanisms and Functions. *Journal of leukocyte biology*.75(2):163-89.

SEISIDA. 2011. Cual Es El Tratamiento? In: Revisa Multidisciplinaria del SIDA. <http://www.seisida.es/index.php/vih-y-sida/cual-es-el-tratamiento>.

SHARP, M. 2009. Temas Especiales Para Los Niños Vih Positivos. *AIDSMEDS* [serial online] [cited Date Cited Year Cited];|Volume(Issue)|. | Available at:

SKOLIMOWSKA, KH, RANGAKA MX, MEINTJES G, PEPPER DJ, SELDON R, MATTHEWS K, *y col.* 2012. Altered Ratio of Ifn-Gamma/Il-10 in Patients with Drug Resistant Mycobacterium Tuberculosis and Hiv- Tuberculosis Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome. *PloS one*.7(10):e46481.

SMITH, CM, WILSON NS, WAITHMAN J, VILLADANGOS JA, CARBONE FR, HEATH WR, *y col.* 2004. Cognate Cd4(+) T Cell Licensing of Dendritic Cells in Cd8(+) T Cell Immunity. *Nature immunology*.5(11):1143-8.

STENGER, S, HANSON DA, TEITELBAUM R, DEWAN P, NIAZI KR, FROELICH CJ, *y col.* 1998. An Antimicrobial Activity of Cytolytic T Cells Mediated by Granulysin. *Science*.282(5386).

STENGER, S, ROSAT JP, BLOOM BR, KRENSKY AM, MODLIN RL. 1999. Granulysin: A Lethal Weapon of Cytolytic T Cells. *Immunology today*.29(9).

STREBEL, K, BOUR S. 1999. Molecular Interactions of Hiv with Host Factors. *Aids*.13 Suppl A:S13-24.

STYLIANOU, E, AUKRUST P, KVALE D, MULLER F, FROLAND SS. 1999. Il-10 in Hiv Infection: Increasing Serum Il-10 Levels with Disease Progression--Down-Regulatory Effect of Potent Anti-Retroviral Therapy. *Clinical and experimental immunology*.116(1):115-20.

SUCHARD, MS, MAYNE E, GREEN VA, SHALEKOFF S, DONNINGER SL, STEVENS WS, *y col.* 2010. Foxp3 Expression Is Upregulated in Cd4t Cells in Progressive Hiv-1 Infection and Is a Marker of Disease Severity. *PloS one*.5(7):e11762.

TAN, JT, DUDL E, LEROY E, MURRAY R, SPRENT J, WEINBERG KI, y col. 2001. Il-7 Is Critical for Homeostatic Proliferation and Survival of Naive T Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.98(15):8732-7.

TAN, JT, ERNST B, KIEPER WC, LEROY E, SPRENT J, SURH CD. 2002. Interleukin (Il)-15 and Il-7 Jointly Regulate Homeostatic Proliferation of Memory Phenotype Cd8+ Cells but Are Not Required for Memory Phenotype Cd4+ Cells. *The Journal of experimental medicine*.195(12):1523-32.

TANG, YM, XU XJ. 2011. Advances in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: Pathogenesis, Early Diagnosis/Differential Diagnosis, and Treatment. *TheScientificWorldJournal*.11:697-708.

TAOUFIK, Y, LANTZ O, WALLON C, CHARLES A, DUSSAIX E, DELFRAISSY JF. 1997. Human Immunodeficiency Virus Gp120 Inhibits Interleukin-12 Secretion by Human Monocytes: An Indirect Interleukin-10-Mediated Effect. *Blood*.89(8):2842-8.

TRAUTMANN, L, JANBAZIAN L, CHOMONT N, SAID EA, GIMMIG S, BESSETTE B, y col. 2006. Upregulation of Pd-1 Expression on Hiv-Specific Cd8+ T Cells Leads to Reversible Immune Dysfunction. *Nature medicine*.12(10):1198-202.

ULRICH, M. 1979. Células, Mediadores Y Mecanismos En La Respuesta Inmunológica Mediada Por Celulas. *inmunologia Clinica*.155:1151-1164.

VAN CRAVEL, R, OTTENHOFF TH, VAN DER MEEN J. 2002. Innate Inmunity to *Mycobacterium Tuberculosis*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*.15(2):294-309.

VARGAS-ROJAS, MI, JIMENEZ-ALVAREZ L, RAMÍREZ G, TORRES-GARCIA D, BARQUERA R, GASTULEUM-MARTINEZ AA, y col. 2008. Pd-1 Y Sus Ligandos Como Reguladores De La Respuesta Inmune. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*.21(4):235-240.

VECCHIET, J, DALESSANDRO M, TRAVASI F, FALASCA K, DI IORIO A, SCHIAVONE C, y col. 2003. Interleukin-4 and Interferon-Gamma Production During Hiv-1 Infection and Changes Induced by Antiretroviral Therapy. *International journal of immunopathology and pharmacology*.16(2):157-66.

VERGARA, U. 2009. Linfocitos T Reguladores Y Respuesta Inmune. *Cs Vet*.24:72-79.

VILLEGAS, C, ARAMNGO M. 2012. Involvement of Regulatory T Cells in Ovarian Cancer. *Involvement of regulatory T cells in ovarian cancer*.39(1).

VIVAS, W. 2013. Estudio Sobre El Posible Papel De Los Linfocitos T Reguladores En El Establecimiento De La Respuesta Inmune in Vitro Contra La Vacuna Bcg En Niños Infeccionados Con El Vih Bajo Tratamiento Antirretroviral De Alta Eficiencia [Trabajo Especial de Grado] Universidad Central de Venezuela.

WANG, FX, XU Y, SULLIVAN J, SOUDER E, ARGYRIS EG, ACHEAMPONG EA, *y col.* 2005. Il-7 Is a Potent and Proviral Strain-Specific Inducer of Latent Hiv-1 Cellular Reservoirs of Infected Individuals on Virally Suppressive Haart. *The Journal of clinical investigation.*115(1):128-37.

WANG, J, RODERIQUEZ G, ORAVECZ T, NORCROSS MA. 1998. Cytokine Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry and Replication in Human Monocytes/Macrophages through Modulation of Ccr5 Expression. *Journal of virology.*72(9):7642-7.

WANG, Y, ZHOU LM, GONG JL, ZHOU MK, SHEN FW, ZHENG XH, *y col.* 2007. [Frequency of the Cd4+Cd25nt/Hicd127lo Regulatory T Lymphocytes from the Peripheral Blood in Chinese Healthy Individuals]. *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology.*23(9):816-8.

WEEKES, MP, WILLS MR, SISSONS JG, CARMICHAEL AJ. 2006. Large Hiv-Specific Cd8 Cytotoxic T-Lymphocyte (Ctl) Clones Reduce Their Overall Size but Maintain High Frequencies of Memory Ctl Following Highly Active Antiretroviral Therapy. *Immunology.*118(1):25-38.

WEISS, L, DONKOVA-PETRINI V, CACCAVELLI L, BALBO M, CARBONNEIL C, LEVY Y. 2004. Human Immunodeficiency Virus-Driven Expansion of Cd4+Cd25+ Regulatory T Cells, Which Suppress Hiv-Specific Cd4 T-Cell Responses in Hiv-Infected Patients. *Blood.*104(10):3249-56.

WESCH, D, MARX S, KABELITZ D. 1997. Comparative Analysis of Alpha Beta and Gamma Delta T Cell Activation by Mycobacterium Tuberculosis and Isopentenyl Pyrophosphate. *European journal of immunology.*27(4):952-6.

WESTENDORP, MO, FRANK R, OCHSENBAUER C, STRICKER K, DHEIN J, WALCZAK H, *y col.* 1995. Sensitization of T Cells to Cd95-Mediated Apoptosis by Hiv-1 Tat and Gp120. *Nature.*375(6531):497-500.

WHO. 2007. Revised Bcg Vaccination Guidelines for Infants at Risk for Hiv Infection. *WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD.*21:18-24.

XU, XN, SCREATON GR, GOTCH FM, DONG T, TAN R, ALMOND N, *y col.* 1997. Evasion of Cytotoxic T Lymphocyte (Ctl) Responses by Nef-Dependent Induction of Fas Ligand (Cd95l) Expression on Simian Immunodeficiency Virus-Infected Cells. *The Journal of experimental medicine.*186(1):7-16.

ZHANG, D, SHANKAR P, XU Z, HARNISCH B, CHEN G, LANGE C, *y col.* 2003. Most Antiviral Cd8 T Cells During Chronic Viral Infection Do Not Express High Levels of Perforin and Are Not Directly Cytotoxic. *Blood.*101(1):226-35.

ZHANG, JY, ZHANG Z, WANG X, FU JL, YAO J, JIAO Y, *y col.* 2007. Pd-1 up-Regulation Is Correlated with Hiv-Specific Memory Cd8+ T-Cell Exhaustion in Typical Progressors but Not in Long-Term Nonprogressors. *Blood*.109(11):4671-8.

ZHANG, M, LI X, PANG X, DING L, WOOD O, CLOUSE K, *y col.* 2001. Identification of a Potential Hiv-Induced Source of Bystander-Mediated Apoptosis in T Cells: Upregulation of Trail in Primary Human Macrophages by Hiv-1 Tat. *Journal of biomedical science*.8(3):290-6.

ZHANG, SY, ZHANG Z, FU JL, KANG FB, XU XS, NIE WM, *y col.* 2009. Progressive Cd127 Down-Regulation Correlates with Increased Apoptosis of Cd8 T Cells During Chronic Hiv-1 Infection. *European journal of immunology*.39(5):1425-34.

ZUO, J, CHURCH J, BELZER M, KITCHEN C, ANK B, SCHMID I, *y col.* 2010. Short Communication: Enhanced Cd8+ T Cell Apoptosis in Hiv-Infected Adolescents with Virologic Failure on Protease Inhibitor-Based Therapy. *AIDS research and human retroviruses*.26(6):681-4.

X.- ANEXOS

Tabla 5. Producción de IL-2 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8vs tiempo de tratamiento.

IL-2	n	Células		PHA		BCG		Gag	
		Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
CONTROL	8	25.23	4.5	27.79	8.9	27.61	5.7	27.75	7.8
CONTROL c/Treg	8	28.08	5.9	29.87	8.0	28.42	6.6	28.28	7.6
D0	6	23.77	2.9	27.13	3.2	23.84	1.8	18.17	6.6
DO c/Treg	6	24.33	4.2	24.43	1.6	21.77	2.8	22.04	1.8
M2	3	33.99	5.2	32.68	2.6	35.24	4.6	37.82	13.3
M2 c/Treg	3	35.34	5.3	32.47	2.1	31.77	1.6	31.76	6.2
M6	4	31.37	6.7	32.01	7.5	28.69	6.3	28.26	6.4
M6 c/Treg	4	29.69	6.4	31.14	5.6	32.42	7.3	25.46	6.4
M10	4	30.18	1.5	30.95	2.9	28.15	5.0	30.28	5.0
M10 c/Treg	4	25.51	2.7	26.04	6.3	29.43	9.9	27.17	3.8
M14	4	26.34	1.5	27.55	1.9	27.04	1.3	26.87	2.2
M14 c/Treg	4	25.03	4.8	28.29	1.3	23.88	0.4	27.10	3.1
M22	4	35.14	4.0	33.34	2.8	32.31	3.4	35.21	3.9
M22 c/Treg	4	30.30	4.2	29.27	1.9	32.66	5.0	31.37	1.7

Tabla 6. Producción de TNF- α en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8vs tiempo de tratamiento.

TNF-a	N	Celulas		PHA		BCG		Gag	
		Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
CONTROL	8	124.81	216.6	173.81	229.4	124.29	184.3	135.65	233.4
CONTROL c/Treg	8	127.62	219.2	165.89	229.9	131.29	188.4	122.16	200.5
D0	6	21.75	16.5	41.71	45.4	24.43	18.9	23.85	18.9
DO c/Treg	6	26.64	22.5	42.92	40.6	23.94	19.3	22.52	16.5
M2	3	142.42	146.9	299.31	397.2	159.07	140.1	212.86	268.0
M2 c/Treg	3	186.24	207.8	255.62	339.9	255.62	339.9	175.10	222.8
M6	4	353.98	438.7	426.16	433.9	278.86	330.9	312.67	319.5
M6 c/Treg	4	316.88	366.2	393.10	390.0	319.48	348.6	322.43	355.4
M10	4	146.52	236.8	258.45	422.3	269.99	372.4	209.17	256.6
M10 c/Treg	4	219.65	260.5	253.49	306.7	164.67	178.6	216.59	248.9
M14	4	237.36	222.2	324.45	267.4	189.16	193.6	233.42	225.9
M14 c/Treg	4	201.47	189.2	401.09	395.0	181.92	204.8	215.27	195.6
M22	4	48.91	41.2	115.44	98.4	61.12	59.6	63.84	48.4
M22 c/Treg	4	55.12	48.0	77.82	69.3	62.33	48.4	52.28	49.0

Tabla 7. Producción de INF- γ en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.

INF-g	n	Celulas		PHA		BCG		Gag	
		Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
CONTROL	8	18.11	10.4	636.58	1437.2	20.46	13.7	21.16	16.9
CONTROL c/Treg	8	19.68	12.6	721.28	1654.1	31.53	22.1	24.06	20.6
D0	6	12.76	1.1	130.28	216.9	13.54	1.6	14.69	3.2
DO c/Treg	6	14.14	2.9	113.42	178.1	13.35	1.5	14.38	2.8
M2	3	17.71	3.4	1016.76	1536.7	23.01	4.2	24.72	11.8
M2 c/Treg	3	18.84	3.2	784.15	1024.0	19.31	6.5	18.72	5.8
M6	4	16.29	1.4	1296.84	1608.9	17.71	3.8	15.36	0.8
M6 c/Treg	4	17.94	3.6	1019.73	1214.7	26.24	15.6	16.07	1.6
M10	4	14.67	1.9	860.30	1465.3	20.71	10.8	13.22	2.2
M10 c/Treg	4	16.26	6.5	1361.93	1685.0	18.78	6.1	22.93	16.1
M14	4	25.92	19.1	270.21	35.9	46.55	29.7	54.28	40.3
M14 c/Treg	4	26.82	20.8	576.18	333.1	31.61	17.6	40.08	27.7
M22	4	14.26	0.8	182.63	21.0	14.33	0.7	15.19	0.2
M22 c/Treg	4	14.47	1.3	149.99	15.5	15.40	1.1	13.76	0.8

Tabla 8. Producción de IL-4 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.

IL-4	n	Celulas		PHA		BCG		Gag	
		Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
CONTROL	8	13.18	2.1	15.78	3.2	12.98	1.6	13.19	2.2
CONTROL c/Treg	8	13.32	1.8	16.67	3.8	14.36	1.8	13.42	1.5
D0	6	10.58	0.8	11.90	1.0	11.70	1.5	10.80	2.3
DO c/Treg	6	11.17	1.8	11.52	1.5	10.95	2.2	10.52	1.0
M2	3	12.97	2.0	11.89	0.7	12.29	1.1	14.17	3.9
M2 c/Treg	3	12.85	0.6	12.02	1.6	12.50	0.2	11.87	1.7
M6	4	11.68	0.5	15.26	5.4	11.62	1.8	11.60	1.5
M6 c/Treg	4	12.08	1.7	14.06	4.4	13.06	1.9	10.42	1.7
M10	4	12.19	1.9	12.23	1.0	11.46	1.1	12.67	2.4
M10 c/Treg	4	11.08	0.9	11.59	2.3	11.80	3.1	10.95	1.1
M14	4	11.07	0.3	14.01	4.8	11.39	0.5	10.70	0.2
M14 c/Treg	4	10.74	1.1	12.94	1.8	10.56	0.6	11.31	0.6
M22	4	12.42	1.2	12.39	0.4	11.97	1.2	11.95	1.1
M22 c/Treg	4	12.09	0.9	11.43	0.7	11.85	0.9	11.14	0.3

Tabla 9. Producción de IL-6 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.

IL-6	n	Celulas		PHA		BCG		Gag	
		Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
CONTROL	8	2409.51	3088.7	5020.32	1711.9	2513.77	2578.1	2645.43	2970.8
CONTROL c/Treg	8	2536.81	3084.7	5252.44	1927.2	3011.42	2584.8	2761.40	2904.2
D0	6	606.24	510.1	1453.08	442.0	925.02	525.4	927.04	603.7
DO c/Treg	6	666.31	311.6	1965.84	1366.0	850.02	639.7	795.47	368.9
M2	3	5465.48	1675.2	5274.19	1840.1	5804.54	1361.6	5105.99	1832.3
M2 c/Treg	3	5360.37	2493.8	5301.09	1737.7	5226.31	2767.7	4568.31	1956.2
M6	4	4368.21	2359.0	4875.74	2521.4	4593.31	2350.5	4214.02	2198.6
M6 c/Treg	4	4144.19	1972.7	4620.21	2191.4	4611.07	2268.8	4648.67	1566.6
M10	4	6112.05	211.8	6179.63	49.5	5037.91	1545.4	4904.81	1838.3
M10 c/Treg	4	5137.61	915.2	4632.43	2233.1	4763.54	754.9	4848.46	1031.5
M14	4	5855.67	7.7	4815.00	1570.0	5716.60	99.0	5654.32	341.0
M14 c/Treg	4	5591.86	157.0	5000.01	1044.2	5286.44	113.0	5516.48	561.7
M22	4	3691.70	2831.4	4600.20	1602.8	2839.63	2447.2	3518.69	2708.8
M22 c/Treg	4	4015.12	2207.6	4928.10	924.9	4586.63	1427.4	3097.56	1877.2

Tabla 10. Producción de IL-10 en sobrenadante de cultivo celular de linfocitos T CD8 vs tiempo de tratamiento.

IL-10	n	Celulas		PHA		BCG		Gag	
		Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
CONTROL	8	27.72	29.0	84.76	95.4	15.83	7.3	30.96	30.8
CONTROL c/Treg	8	32.30	35.1	67.30	78.2	18.15	5.4	30.77	27.1
D0	6	9.30	1.5	11.39	1.1	9.84	0.8	9.46	1.0
DO c/Treg	6	10.71	2.5	11.20	2.6	9.44	2.0	8.83	0.4
M2	3	23.84	3.5	27.69	3.1	37.10	8.2	58.40	71.3
M2 c/Treg	3	84.23	89.3	27.40	13.2	27.40	13.2	50.54	60.2
M6	4	42.73	30.3	31.51	33.4	31.51	33.4	58.27	60.4
M6 c/Treg	4	43.92	31.2	29.64	30.0	46.54	39.1	61.82	70.5
M10	4	10.24	0.1	10.59	0.6	37.30	46.9	32.73	39.8
M10 c/Treg	4	45.75	62.6	25.42	25.4	40.63	49.1	35.78	46.0
M14	4	34.33	34.6	38.35	33.3	30.84	31.0	70.00	72.5
M14 c/Treg	4	86.04	84.0	41.38	27.4	28.43	28.8	53.87	43.5
M22	4	15.25	8.2	34.32	25.9	17.72	9.3	18.36	7.7
M22 c/Treg	4	16.23	10.8	29.97	14.5	18.60	8.0	15.50	7.1

Formulario de Consentimiento

Proyecto Hospital de Niños/Escuela J. M. Vargas (UCV)
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA BCG EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
INFECCIÓN VIH+ BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE ALTA EFICIENCIA: MECANISMOS
INMUNOREGULATORIOS INVOLUCRADOS

He leído el documento de información relativo a este estudio donde observé bien el carácter puramente científico y por el cual yo no obtendré ningún beneficio económico.

Pude discutir libremente con el Doctor _____ quien me explicó la naturaleza y los objetivos de este estudio.

Yo acepto que los datos registrados en este protocolo puedan ser objeto de un tratamiento informatizado. Yo estoy consciente que tengo derecho el acceso a la información de los mismos y puedo pedirlo en todo momento ante el Dr. _____ la información pertinente.

Yo doy mi consentimiento para que participe mi representado (a) en este estudio en las condiciones descritas en la nota de información y yo acepto someterme con frecuencia a las visitas médicas y a los exámenes previstos por el protocolo. Yo me reservo el derecho de interrumpir el seguimiento sin tener que justificar mi decisión, pero me comprometo en ese caso de informar al Dr. _____

Nombres y apellidos del paciente _____

Nombre del médico investigador _____

Fecha _____

Firma:

Formulario de Información

Proyecto Hospital de Niños/Escuela J. M. Vargas (UCV)
EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA BCG EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON
INFECCIÓN VIH+ BAJO TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE ALTA EFICIENCIA: MECANISMOS
INMUNOREGULATORIOS INVOLUCRADOS

El médico tratante de su representado (a) le propone participar en este estudio. Esta nota de información es dirigida a Ud, para que le permita obtener orientación antes de decidir su aceptación en que participe su representado (a) participar y de firmar el formulario de consentimiento.

Este estudio es de naturaleza científica. La investigación persigue el objetivo de estudiar pacientes pediátricos seropositivos para el VIH, los cuales fueron vacunados con la BCG y queremos evaluar de manera longitudinal si la respuesta inmunológica contra BCG se establece adecuadamente cuando estos pacientes son tratados con la terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE). Para esto se va estudiar por un máximo de dos años a través de tomas sanguíneas de 5 ml (máximo) cada cuatro (4) meses para determinar una serie de parámetros inmunológicos, a medida que se va administrando la terapia antiviral. Este estudio es importante para poder determinar cómo la TAAE permite que el sistema inmune tenga las condiciones adecuadas para desarrollar una respuesta inmune eficaz bajo la administración de una vacuna como la BCG, aún en presencia de la inmunodeficiencia adquirida por la infección por el VIH. Es importante que conozca que con este estudio, Ud. no tendrá beneficio económico alguno de este estudio

Porqué proponer este estudio?

Los pacientes pediátricos seropositivos para el VIH son expuestos al riesgo de desarrollar infecciones oportunistas por microbios, de las cuales la población general está normalmente protegida. Se han encontrado que el deterioro de sus sistema inmune es de tal nivel, que ciertas vacunas de uso rutinario en bebés son generalmente ineficaz para conferir protección al vacunado, ya que no se establece adecuadamente una

respuesta inmune específica para la vacuna administrada. Con el advenimiento de la TAAE, esta situación se ha revertido, debido a que el sistema inmune se comienza a restablecer con la terapia, pero los mecanismos responsables de esta mejoría, y especialmente en la respuesta inmune inducida por la vacuna, son desconocidos o incompletamente comprendidos, por lo que se requiere investigar con mayor intensidad para identificar aquellos factores del sistema inmunológico que son mejorados por la TAAE y permiten la mencionada inmunidad específica contra BCG. Con esto, se puede establecer factores de mejoría con la administración del TAAE, aparte del número de linfocitos T CD4 y la carga viral, y establecer estrategias terapéuticas con un criterio más racional. Esto conllevaría a una mejor calidad de vida de estos pacientes pediátricos.

Descripción y obligaciones del estudio

Si Ud da su consentimiento para participar en este estudio, su participación consistirá en una visita médica donde se le realizará su historia familiar y clínica, donde se determinará ciertos parámetros inmunológicos: el porcentaje y número de células T CD4 (El primer examen se hará en nuestros laboratorios).

* Debe tener un cuadro clínico donde hay una ausencia de infecciones oportunista

* Su representado (el paciente pediátrico) debe donar entre 4-5 ml de sangre total (dependiendo del peso y estado clínico del paciente) para realizar la serie de experimentos en las instalaciones de nuestros laboratorios. Ud. tendrá información de los resultados clínicos y estudios inmunológicos de su estado clínico. Igualmente, se le hará un seguimiento de la condición del sistema inmune por un máximo de dos años, donde cada cuatro (4) meses, por lo cual, para esto se tomará la misma cantidad de sangre.

* Asimismo, el paciente pediátrico debe tener la condición de que aún no se le haya tratado con ninguna terapia antiretroviral, sino después del inicio del estudio, si el médico tratante decide que lo amerita, por lo que tendrá consecuentemente un seguimiento clínico.

* El paciente debe ser vacunado con la BCG, si aún no ha sido aplicada

Confidencialidad y anonimato

Todas las informaciones obtenidas de este estudio relativas a ud mismo quedarán estrictamente confidenciales y anónimas: Sólo los médicos que se ocupan directamente de la gestión de este estudio tendrán acceso a su historia médica, y estarán bajo las reglas muy estrictas del secreto médico.

Los datos registrados en este estudio serán tratados y analizados en un sistema de informática y Ud tendrá derecho acceder a los mismos en todo momento ante el médico que lo sigue en este estudio.

Otras disposiciones

Conforme al reglamento de la Comisión de Bioética del Hospital de Niños J. M. De Los Ríos, este estudio ha sido objeto de un examen de esta comisión quien donó una opinión favorable. Si Ud desea obtener informaciones complementarias antes de decidir de participar con su representado en este estudio, en ese caso ud puede solicitarlas al responsable científico. Ud es libre de rechazar su participación en este estudio en todo momento, retirar su consentimiento sin tener que justificarse y sin que esta decisión de ninguna forma afecte la calidad de cuidado que se le dará por el médico tratante. Se le comunicará los resultados a futuro y se les transmitirá toda información nueva en el curso del estudio que pudiera influir sobre la disponibilidad de su participación.