



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGA**

**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 INFECTADOS POR VIH BAJO TRATAMIENTO
ANTIRRETROVIRAL DE ALTA EFICIENCIA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Bachiller Wolfgang Eduardo David Tadeo Vivas Varela, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutores: Dr. Miguel Alfonzo
Dra. Guillermina Alonso


CARACAS, VENEZUELA

Octubre, 2013

**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL Br. WOLFGANG VIVAS**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Wolfgang Eduardo David Tadeo Vivas Varela, C.I: 18.818.121, titulado “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 infectados por VIH bajo Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia”, para optar al título de Licenciado en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los dieciochos días del mes de Octubre del año 2013, dejando constar que la Prof. Guillermina Alonso actuó como coordinadora del jurado examinador.



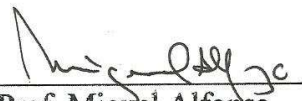
Prof. Martín Sánchez



Prof. Cristina Sanoja



Prof. Guillermina Alonso
(Tutor - Coordinador)



Prof. Miguel Alfonso
(Tutor)



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 23/10/2013, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado del bachiller **Vivas Varela, Wolfgang Eduardo David**: titular de la cédula de identidad No. 18.818.121; titulado: "**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 infectados con el VIH bajo tratamiento antirretroviral de alta eficiencia**"; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los veintitrés días del mes de octubre del año dos mil trece.



Dr. Jesús Guillermo Romero Muñoz
Presidente del
Consejo de la Escuela de Biología

JGR/br.-

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mis padres, Edict Varela y Wolfgang Vivas, por todo el apoyo y el amor que me han dado durante la realización de todos mis proyectos.

En memoria de mi hermano Guillermo, siempre serás una fuente de inspiración para mí, te amo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar les quiero agradecer a mis padres, quienes con su esfuerzo, amor y apoyo, me han hecho la persona que soy hoy en día y sin ustedes, no hubiese podido alcanzar este logro. Para mí son una constante fuente de inspiración y dedicación, muchas gracias por todo, los amo.

A mis hermanos, Johan y Marlon, como también a mi cuñada Betsi, por siempre estar atentos y prestarme tanto apoyo y aprecio. A mis sobrinos por alegrarme mis días, les deseo un mundo lleno de felicidad y oportunidades.

A los niños y a sus padres y representantes, quienes nos otorgaron su confianza y permitieron la realización de este Trabajo Especial de Grado. Gracias a ustedes, conozco más sobre la realidad que viven las personas con VIH, otorgándome un enorme aprendizaje de humildad y dedicación.

Al Dr. Miguel Alfonzo, quien desde el primer día me otorgó su confianza, apoyo y dedicación, permitiéndome desarrollarme en el mundo de la investigación durante la realización de este trabajo. Por brindarme la oportunidad que me permite optar al título de Licenciado al abrirme las puertas de su laboratorio. Más que una guía académica, ha sido un amigo en muchos sentidos. A usted, un millón de gracias.

A mi equipo de laboratorio por su apoyo y colaboración, a Ydelys Fuentes, Edwin Escobar, Abelardo Carrero, pero en especial a Eduardo Navarro, quien ha sido un compañero y amigo incondicional. Por su ayuda y apoyo desde el inicio de este trabajo, espero contar siempre con su amistad.

A los integrantes del Servicio de Enfermedades Infecciosas del hospital "J.M. de los Ríos". Al equipo de enfermeras, médicos residentes y en especial a las Dras. Luigina Siciliano y María Graciela López, quienes nos apoyaron desde el inicio de este proyecto, y que en conjunto pudimos lograr la culminación del mismo.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias, que por su dedicación me han permitido conocer las maravillas que encierran el mundo de la biología. Especialmente a mí jurado la Dra. Cristina Sanoja y el Dr. Martín Sánchez, por sus recomendaciones y consejos. A mi asesora académica la Dra. Guillermina Alonso, por sus valiosos consejos y correcciones, y por haberme acompañado en esta última etapa. A los profesores Gilberto Payares, Elizabeth Merentes, Roschman Gonzales y Palmira Guevara, gracias a sus conocimientos han logrado enamorarme de esta carrera.

A Dolly Montaña, quien desde mi primer día como estudiante me ha brindado todo su apoyo, cariño, paciencia y comprensión, juntos hemos podido recorrer la mayor parte de esta carrera y espero que el futuro nos llene de muchas oportunidades.

A mis amigos, quienes me han acompañado en los momentos más importantes de mi carrera, en especial a Jofran, Douglas y Franz, los cuales considero como hermanos, asimismo a María, Victoria, Carlos, Farilyn, Gaby, Paula y Jessika, gracias a ustedes por el apoyo, se les quiere.

A la Dra. Zury y a la Lic. Claudia del Instituto de Medicina Experimental, que confiaron en nosotros y nos permitieron culminar con la última etapa de este trabajo. Mis más sinceros agradecimientos y mejores deseos a ustedes.

A la cátedra de Fisiología quienes siempre estuvieron pendientes de mí y que con su apoyo me hicieron sentir uno más de la familia. Asimismo, al equipo de Clinifar por toda la ayuda suministrada durante la realización de este trabajo.

Finalmente, a mi querida Universidad Central de Venezuela, la casa de donde viene la sombra, por permitirme formar parte de ella y otorgarme todas las herramientas para mi formación como profesional. Hoy y siempre orgulloso Ucevista.

RESUMEN

Se estima que en la actualidad más de 33 millones de personas se encuentran infectadas por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), de los cuales 2,5 millones corresponden a niños menores de 15 años. El VIH infecta principalmente a las células TCD4⁺, generando una profunda disfunción en el sistema inmune de los individuos infectados, haciéndolos más susceptibles a enfermedades oportunistas como la Tuberculosis. El Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) es una vacuna de una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* y es la única disponible para la prevención de la Tuberculosis, sin embargo, se ha observado un incremento en el número de complicaciones asociadas a esta vacunación, especialmente en niños infectados por el VIH. La introducción del Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficacia (TAAE) ha conllevado a una importante disminución en la mortalidad y la morbilidad en individuos VIH⁺, se ha observado una disminución en el desarrollo de enfermedades oportunistas en estos pacientes. Por otra parte, los linfocitos T reguladores (Treg) son una subpoblación de células TCD4⁺ con función supresora de la respuesta inmune *in vivo* e *in vitro*, y juegan un papel importante en el organismo, controlando la activación del sistema inmune. Sin embargo, los estudios hechos sobre estas células en la infección por el VIH han arrojado resultados contradictorios y poco se conoce sobre su papel en el establecimiento de la respuesta inmune contra la vacuna BCG. Es por ello que decidimos estudiar el posible papel de los linfocitos Treg en el establecimiento de la respuesta inmune *in vitro* contra la vacuna BCG en niños infectados por el VIH bajo administración del TAAE durante 22 meses.

Para ello se procedió a la realización de diferentes ensayos *ex vivo* e *in vitro*. Se procedió a la determinación del número de células TCD4⁺ y TCD8⁺ de sangre (Totales, vírgenes y memoria), la frecuencia *ex vivo* de apoptosis en células TCD4⁺, como también la expresión *ex vivo* de moléculas asociadas a este proceso. Asimismo, para el estudio de la funcionalidad *in vitro* de células Treg se aplicó un protocolo nuevo para su purificación y se realizaron cultivos de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) en presencia o ausencia de Treg autólogas. Seguido se determinó la producción de citocinas Th1 y Th2 en sobrenadantes de cultivos de CMSP, como también la producción intracelular de IFN- γ y la proliferación *in vitro* de células TCD4⁺.

Encontramos que la administración del TAAE normaliza algunos parámetros y funciones de las células TCD4⁺. Particularmente se observó un incremento en el número de células TCD4⁺ y TCD8⁺, como también la disminución de moléculas inductoras de apoptosis e incremento de la

expresión de moléculas asociadas a la sobrevivencia celular. En conjunto se observó un decremento en la frecuencia de apoptosis de células TCD4⁺. Por otra parte, no se observaron cambios en la producción intracelular de IFN- γ en células TCD4⁺ y en sobrenadantes de CMSP, sin embargo, se alcanzó normalizar la producción de citocinas Th1 y Th2, particularmente la IL-6, IL-10 y TNF- α alcanzaron valores similares a lo observado en niños sanos. Asimismo, incrementó la capacidad de proliferación de las células TCD4⁺ en presencia de antígenos virales y la vacuna BCG. Por último, nuestros resultados indican que no hubo cambios significativos en los cultivos de CMSP en presencia de células Treg durante los 22 meses del estudio, indicando que la infección pediátrica por el VIH genera una profunda disfunción en estas células. Estos resultados pueden arrojar luces para entender de mejor manera la inmunopatología de la infección pediátrica por el VIH, indicando que es favorable vacunar con BCG a estos niños siempre y cuando se encuentren en un protocolo estricto de antirretrovirales.

INDICE DE CONTENIDOS

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. La respuesta inmunitaria.....	2
2.1.1. Establecimiento de la respuesta inmune mediada por linfocitos TCD4 ⁺	3
2.1.2. Regulación de la respuesta inmune.....	6
2.1.2.1. Los linfocitos T reguladores (Treg).....	7
2.2. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	10
2.2.1. Epidemiología actual del VIH/SIDA.....	10
2.2.2. La Replicación del VIH.....	13
2.2.3. Curso clínico de la infección por el VIH.....	15
2.2.4. Inmunopatología de la infección por el VIH.....	18
2.2.5. La terapia antirretroviral de alta eficiencia (TAAE).....	21
2.2.6. Los linfocitos T reguladores en la inmunopatología del VIH.....	25
2.3. La Tuberculosis como enfermedad oportunista en la infección por el VIH.....	28
2.3.1. Epidemiología actual de la Tuberculosis.....	28
2.3.2. Inmunología de la Tuberculosis.....	30
2.3.3. La vacuna BCG.....	33
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1. Grupo de estudio.....	37
4.2. Cuantificación <i>ex vivo</i> de subpoblaciones linfocitarias.....	38

4.3. Medición <i>ex vivo</i> del receptor de muerte celular Fas (CD95).....	38
4.4. Determinación de la expresión <i>ex vivo</i> de la molécula PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4+.....	39
4.5. Medición de la expresión <i>ex vivo</i> de IL-7Ra (CD127) en linfocitos TCD4+.....	39
4.6. Determinación de la frecuencia <i>ex vivo</i> de apoptosis en linfocitos TCD4+.....	40
4.7. Medición de la cantidad de linfocitos T reguladores <i>ex vivo</i>	41
4.8. Purificación de linfocitos T reguladores de sangre periférica.....	42
4.9. Cultivo de CMSP y linfocitos T reguladores.....	44
4.10. Determinación de la proliferación celular <i>in vitro</i> de linfocitos TCD4+.....	45
4.11. Medición <i>in vitro</i> de IFN- γ intracelular de células TCD4+.....	45
4.12. Determinación <i>in vitro</i> de citocinas Th1 y Th2 de plasma y sobrenadantes de CMSP en cultivo.....	46
4.13. Análisis estadístico.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. Descripción del grupo de estudio.....	48
5.2. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de pacientes pediátricos infectados por el VIH.....	49
5.3. Carga viral en los pacientes pediátricos VIH+.....	56
5.4. Expresión <i>ex vivo</i> del receptor de muerte celular Fas (CD95) en linfocitos TCD4+ de niños VIH+ y niños sanos.....	57
5.5. Expresión <i>ex vivo</i> de la molécula PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4+ de niños VIH+ y niños sanos.....	59
5.6. Expresión <i>ex vivo</i> de la molécula CD127 (IL-7Ra) en linfocitos TCD4+ de niños VIH+ y niños sanos.....	62

5.7. Frecuencia de apoptosis ex vivo en linfocitos TCD4+ de niños VIH+ y niños sanos.....	64
5.8. Determinación de la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica de niños infectados por el VIH y niños sanos.....	66
5.9. Purificación de linfocitos T reguladores de niños infectados por el VIH y de niños sanos....	69
5.10. Determinación de la proliferación celular de linfocitos TCD4+ de niños infectados por el VIH y niños sanos, en presencia de la vacuna BCG y la proteína viral gag.....	72
5.11. Determinación de la producción intracelular <i>in vitro</i> de IFN- γ en linfocitos TCD4+ de niños infectados por el VIH y niños sanos, en presencia de la vacuna BCG y la proteína viral gag.....	76
5.12. Determinación de la producción in vitro de citocinas Th1 y Th2 de plasma y sobrenadantes de CMSP en cultivo.....	79
6. DISCUSIÓN.....	87
7. CONCLUSIONES.....	112
8. BIBLIOGRAFÍA.....	115
9. ANEXOS.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

APC: Allophycocyanin (aloficocianina)

ARN: Acido ribonucleico

BCG: Bacilo de Galmette-Guerin

BrdU: Bromodeoxiuridina

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CPA: Células presentadoras de antígenos

FITC: Fluorescein isotriocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)

FoxP3: Forkhead box P3

IL: Interleucina o interleuquina

INF- γ : Interferón gamma

PD-1: Programmed cell death 1

PE: Phycoerythrin (ficoeritrina)

PerCP: Peridin chlorophyll protein

PHA: Phytohaemagglutin
(Fitohematoglutinina)

RCT: Receptores de células T

SI: Sistema inmunitario

SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

TAAE: Tratamiento antiretroviral de alta eficiencia

TB: Tuberculosis

TGF- β : Transforming growth factor beta
(Factor de crecimiento transformante beta)

TNF- α : Tumor necrosis factor alfa (Factor de necrosis tumoral alfa)

Treg: Células T reguladoras

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIS: Virus de la inmunodeficiencia en simios

INDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1: Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana.....	14
Figura 2: Curso clínico y perfil serológico de la infección por el VIH.....	17
Figura 3: Citogramas para la medición de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	50
Figura 4: Medición de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica.....	54-55
Figura 5: Carga viral de los pacientes pediátricos VIH+.....	56
Figura 6: Determinación de la expresión <i>ex vivo</i> de Fas (CD95) en linfocitos TCD4+.....	57
Figura 7: Medición de la expresión <i>ex vivo</i> de Fas (CD95) en linfocitos TCD4+.....	59
Figura 8: Determinación de la expresión <i>ex vivo</i> de PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4+.....	60
Figura 9: Medición de la expresión <i>ex vivo</i> de PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4+.....	61
Figura 10: Determinación de la expresión <i>ex vivo</i> de CD127 (IL-7R α) en linfocitos TCD4+.....	62
Figura 11: Medición de la expresión <i>ex vivo</i> de CD127 (IL-7R α) en linfocitos TCD4+.....	64
Figura 12: Determinación de la frecuencia de apoptosis <i>ex vivo</i> en linfocitos TCD4+.....	65
Figura 13: Medición de la frecuencia de apoptosis <i>ex vivo</i> en linfocitos TCD4+.....	66
Figura 14: Determinación de la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica de niños sanos y niños infectados por el VIH.....	67
Figura 15: Medición de la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica.....	68
Figura 16: Purificación de linfocitos T reguladores de niños infectados por el VIH y niños sanos.....	70-71
Figura 17: Purificación de los linfocitos T reguladores.....	72

Figura 18: Determinación de la proliferación de linfocitos TCD4+.....	74
Figura 19: Proliferación <i>in vitro</i> de linfocitos TCD4+ en CMSP de pacientes pediátricos VIH+.....	75
Figura 20: Determinación de la producción intracelular <i>in vitro</i> de IFN- γ en linfocitos TCD4+.....	77
Figura 21: Cuantificación de la producción intracelular <i>in vitro</i> de IFN- γ de linfocitos TCD4+ de pacientes pediátricos VIH+ e infantes sanos.....	78
Figura 22: Determinación de la producción de citocinas en CMSP.....	80
Figura 23: Cuantificación de la producción de citocinas Th1/Th2 en plasma y sobrenadantes de CMSP de cultivo de pacientes pediátricos VIH+ y niños sanos.....	83-86

1. INTRODUCCIÓN

La vacuna BCG (Bacilo de Calmette-Guérin) es la única disponible para la prevención de la Tuberculosis, siendo esta última, una de las principales enfermedades oportunistas en la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), causante de mortalidad debido al agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). La BCG es una vacuna elaborada con una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, cuyos primeros ensayos clínicos se realizaron entre 1921 a 1927 en Francia y Bélgica, y estos demostraron que la BCG era altamente eficiente protegiendo contra la Tuberculosis en niños (Andersen y Doherty, 2005). Sin embargo, se han reportado muchos casos de complicaciones asociadas a la vacunación, principalmente en niños infectados por el VIH generando una alta morbilidad, lo que hace dudar si la vacunación en esta población infantil sea conveniente, por lo tanto, es necesario realizar estudios que permitan caracterizar el establecimiento de la respuesta inmune de estos niños infectados por el VIH frente a esta vacuna (Hesseling y col., 2007).

Por otra parte, se estima que en la actualidad más de 33 millones de personas se encuentran infectadas con el VIH, agente causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), de los cuales 2,5 millones corresponden a niños menores de 15 años. En Latinoamérica en el 2010 1,4 millones de personas estaban infectadas por el VIH. Las zonas con mayor incidencia en la enfermedad son aquellas que tienen más población, como Brasil (ONUSIDA, 2010). En Venezuela los datos oficiales indican que existen 161.510 casos de personas VIH+ (UNGASS Venezuela, 2012). Sin embargo, con el advenimiento de la Terapia Antirretroviral de Alta Eficiencia (TAAE) se ha logrado una disminución significativa en la mortalidad asociada a VIH (ONUSIDA, 2010).

El VIH afecta principalmente a los linfocitos TCD4⁺, generando una profunda alteración en el sistema inmune de los pacientes. El VIH es capaz de estimular una respuesta inmune fuerte

mediada principalmente por células citotóxicas, sin embargo no elimina al virus (McMichael y Rowland-Jones, 2001). Se han planteado numerosas hipótesis para explicar este fenómeno, entre ellas se encuentra la activación de linfocitos T reguladores, que pueden promover la disminución en la respuesta inmune contra el virus, sin embargo, el papel de estos linfocitos T actualmente se encuentra bajo numerosos estudios, que han arrojado conclusiones contradictorias (Li y col., 2008).

En esta investigación, nos plantearémos estudiar algunos parámetros inmunológicos de los linfocitos TCD4⁺ de pacientes pediátricos infectados por el VIH, como también el posible papel de los linfocitos T reguladores en el establecimiento de la respuesta inmune contra la vacuna BCG a medida que aumenta el tiempo de la administración del TAAE. Esto con el fin último de comprender de mejor forma la inmunopatología de esta enfermedad en niños y establecer terapias con mejores criterios que pudiesen controlar de manera más eficaz la replicación viral, normalizando el sistema inmunológico de estos pacientes.

2. ANTECEDENTES

2.1. La respuesta inmunitaria

El sistema inmunitario (SI) protege a los organismos de una gran variedad de agentes infecciosos (bacterias, hongos, parásitos y virus) que pueden ocasionar diferentes enfermedades en el organismo hospedador. Para ello, el SI es capaz de reconocer a estos agentes patógenos y desencadenar una respuesta mediada por diversas células y moléculas efectoras, culminando con la eliminación de estos agentes (Murphy y col., 2009).

2.1.1. Establecimiento de la respuesta inmune mediada por linfocitos TCD4⁺

Una vez que ingresa el patógeno al organismo, son activados una gran variedad de mecanismos con el fin de eliminar a dicho agente. Inicialmente las células y moléculas asociadas a la respuesta inmune innata son reclutadas al lugar de infección. Esta respuesta se caracteriza por ser de tipo inespecífica, y no generar memoria inmunitaria protectora a largo plazo. Solo si un microorganismo infeccioso puede violar esta primera línea de defensa surgirá una respuesta inmunitaria adaptativa, con generación de células efectoras específicas para antígeno dirigidas al patógeno específico, y células de memoria que proporcionan inmunidad duradera contra reinfección por el mismo organismo (Murphy y col., 2009). La respuesta inmune adaptativa viene mediada principalmente por los linfocitos T, en particular los linfocitos TCD4⁺.

Los linfocitos T vírgenes son células de larga vida que residen en un “pool” de linfocitos que se mantienen recirculando y migrando continuamente de la sangre a la linfa, a través de zonas de células T especializadas en los órganos linfoides secundarios (Sprent y Tough, 2001). Específicamente, estas células T vírgenes se encuentran en las áreas de los órganos linfoides secundarios ricas en linfocitos T, como lo son: (1) la paracorteza de los nódulos linfáticos y en las placas de Peyer, y (2) en zonas linfoides específicas de la médula (Jenkins y col., 2001). Estas células expresan una serie de moléculas y receptores de membranas importantes para las funciones que cumplen. Por ejemplo: expresan la molécula CD45RA, que es una fosfatasa de 200 a 220 Kd, que las identifica como células vírgenes (Mora y Corado, 2003); exhiben en su superficie a la molécula CD62L, con lo que podrán movilizarse a través de las paredes de los vasos sanguíneos, y además poseen el receptor de quimiocinas denominado CCR7, el cual les permite la extravasación mediante la interacción de él con integrinas específicas (Jenkins y col., 2001; Sallusto y col., 2000).

La restricción de los linfocitos T vírgenes a los órganos linfáticos secundarios, implica que las células presentadoras de antígenos (CPA), representadas principalmente por las células dendríticas, inicien, estimulen y regulen la respuesta primaria mediada por estas células (Lanzavecchia y Sallusto, 2000).

Al producirse la entrada de un patógeno al organismo, este es reconocido por receptores de patrones moleculares asociados a patógenos que se encuentran en la membrana de las células del sistema inmune innato. Se origina entonces, la liberación de citocinas tales como TNF- α e IL-1. Esta señal de citocinas induce a las células dendríticas o a los monocitos a migrar vía vasos linfáticos aferentes hasta los tejidos locales y luego a los nódulos linfáticos después de procesar por primera vez el antígeno. Durante el proceso de migración, estas células maduran para producir complejos péptido-CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), a partir del antígeno ingerido, y los exhiben en la superficie celular junto con moléculas llamadas B7 recién sintetizadas (Jenkins y col., 2001). Después de arribar a los nódulos linfáticos, estas células dendríticas presentan los complejos péptido-CMH a las células TCD4⁺ vírgenes antígeno específicas y se establece entonces la formación de la sinapsis inmunológica para la efectiva activación del linfocito T (Murphy y col., 2009).

La activación de linfocitos T vírgenes implica tres señales inductivas distintas que se establecen entre las CPA y las células vírgenes: (1) la primera señal consiste en la interacción entre el complejo TCR/CD3 de las células T (TCR) y complejos péptido-CMH de las CPA, (2) la segunda señal es coestimuladora y sirve para amplificar o modificar la señal 1. Esta se lleva a cabo principalmente por medio de dos moléculas complementarias: B7-1 y B7-2 (llamadas también CD80 y CD86) que se expresan en la superficie de las CPA, y que interaccionan con el receptor CD28 de las células T (Van Stipdonk y col., 2001). (3) la última señal está conformada por un microambiente muy determinado de citocinas las cuales modularan la activación linfocitaria (Murphy y col., 2009).

Las diferentes funciones efectoras que cumplen las células T, seguidas de la interacción con las CPA, dependerán del estadio de la respuesta inmune. Mientras sean altamente estimuladas, éstas CPA llevarán a las células T a proliferar rápidamente, a sintetizar un amplio número de citocinas y a diferenciarse en células citotóxicas (en el caso de las TCD8⁺) y en células T colaboradoras (para el caso de las TCD4⁺) (Sprent y Surth, 2002). Una vez activados los linfocitos T, ahora células efectoras, pueden migrar a tejidos no linfoides y diseminarse por todo el cuerpo contribuyendo a la eliminación del patógeno (Murphy y col., 2009).

Al llegar a los tejidos infectados, las células TCD4⁺ activadas polarizarán su respuesta, según el patrón de citocinas secretadas, se pueden clasificar en: colaboradoras de tipo 1 (Th1) y colaboradoras de tipo 2 (Th2). Los Linfocitos Th1, los cuales se caracterizan por ser pro inflamatorios, son esenciales para la protección contra un número variado de infecciones intracelulares, esto debido a que sintetizan principalmente IFN- γ (Interferón-gamma), que es la principal citocina activadora de macrófagos; y TNF- β (Factor de necrosis tumoral-beta), que activa macrófagos, inhibe células B y es directamente citotóxico para algunas células (Murphy y col., 2009); y linfocitos Th2, que activan los linfocitos B específicos para producir anticuerpos, actuando en ciertas infecciones extracelulares (Lanzavecchia y Sallusto, 2000). Estas células son capaces de producir principalmente las siguientes citocinas: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Murphy y col., 2009).

A medida que ocurre la activación y expansión clonal de la respuesta inmunitaria, muchas de las poblaciones linfocitarias activadas son eliminadas por el fenómeno de apoptosis (Sprent y Tough, 2001). Esta muerte a gran escala de las células efectoras evita una respuesta inmune exacerbada, pudiendo ocurrir una hipertrofia linfóide o una congestión del tráfico celular que comprometerían a la respuesta de las células vírgenes a nuevos patógenos (Sprent y Surh, 2002). Se conoce que involucra la señalización negativa por el receptor para la señal de coestimulación CTLA-4 (Citotóxico

T-Lymphocyte Antigen 4). También involucra la activación de muerte celular por la expresión de la molécula Fas (CD95), que promueve la apoptosis por la vía extrínseca (AICD).

Finalmente, aquellos clones de linfocitos que no sufren de apoptosis, responden rápida y efectivamente en posteriores infecciones por el mismo patógeno, generando memoria inmunológica. Se ha demostrado que las células memoria poseen una mayor afinidad por los complejos péptidos-CMH, poseen un tiempo de vida prolongado, son más rápidas en la producción de citocinas (Jenkins y col., 2001), además expresan la molécula CD45RO, que es una fosfatasa de 180 Kd (Mora y Corado, 2003).

2.1.2. Regulación de la respuesta inmune

Cada proceso fisiológico necesita ser regulado durante y después que haya completado su misión. Sin regulación, estos procesos poseen un alto riesgo de convertirse en patologías. Por lo tanto, la regulación es un punto clave en la homeostasis del organismo. Este fenómeno aplica particularmente en el establecimiento de la respuesta inmune (Beissert y col., 2006).

La respuesta inmune posee dos características fundamentales: es autolimitada y autorregulada, por lo tanto, en condiciones normales, solo está presente mientras sea necesaria. Es autolimitada, por varias razones entre ellas: el antígeno es generalmente eliminado, los efectores humorales de la respuesta son secretados durante un tiempo breve y poseen una vida media corta. Es autorregulada porque los efectores generados durante el desarrollo de la respuesta actúan como moduladores de la misma (Mora y Corado, 2003).

Entre los factores que determinan y regulan la magnitud, duración y tipo de respuesta inmune se encuentran: el antígeno, las células presentadoras de antígeno, los anticuerpos, las

citocinas, la constitución genética del hospedador, entre otros (Mora y Corado, 2003). Sin embargo, los linfocitos T reguladores (Treg) han sido descritos como uno de los factores más importantes en la regulación de la respuesta inmune.

2.1.2.1. Los Linfocitos T reguladores (Treg)

Sakaguchi y colaboradores (1995) describieron en ratones una población de linfocitos T, la cual constituía entre el 5-10% del total de linfocitos TCD4⁺ circulantes en ratones. Estas células identificadas con el fenotipo CD4⁺CD25⁺, exhibían potentes funciones supresoras tanto *in vitro* como *in vivo* (Sakaguchi y col., 2001; Sakaguchi, 2004; Sakaguchi y col., 2008, Sakaguchi y col., 2010). Una población similar con fenotipo comparable fue también identificado en humanos (Dieckmann y col., 2001). Sumando los resultados de estos trabajos, se pudo concluir que esta población celular juega un papel importante en la supresión de la respuesta autoinmune a través de la inhibición de células T autoreactivas (Beissert y col., 2006). Alteraciones en las funciones o en el desarrollo de estas células son unas de las primeras causas de enfermedades autoinmunes e inflamatorias en humanos y otros animales (Sakaguchi y col., 2008; Sakaguchi y col., 2010).

Además de las células Treg naturales cuyo fenotipo es TCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, se ha demostrado que otros tipos de células T poseen actividad reguladora y que pueden, en ciertas condiciones, prevenir autoinmunidad en roedores (Jiang y Chess, 2006). La mayoría de estas células, como células T secretoras de IL-10, células T secretoras del factor de crecimiento TGF- β y ciertas células TCD4⁺CD8⁻ y CD8⁺CD28⁻, son células Treg adaptativas, es decir, adquieren su función reguladora seguido de una estimulación antigénica específica y en un microambiente de citocinas particular. Por lo tanto, estas células contrastan con las células Treg naturales, las cuales

se desarrollan en el timo como una subpoblación de linfocitos T especializada en funciones supresoras (Sakaguchi y col., 2010).

Una clásica característica de los linfocitos TCD4⁺CD25⁺ es su falta de respuesta proliferativa por activación del TCR o por estimulación con anticuerpos mitogénicos. Por lo tanto, estas células son anérgicas (Thompson y Powrie, 2004; Beissert y col., 2006). Sin embargo, la supresión de la respuesta inmune *in vitro* es dependiente del contacto directo de los linfocitos Treg y las células efectoras (Thompson y Powrie, 2004). Se ha descrito que la función supresora es parcialmente mediada por las citocinas TGF- β e IL-10 (Beissert y col., 2006).

Como se describió previamente, la molécula CD25 (Receptor de la cadena alfa de la Interleuquina 2, IL-2) es un marcador muy útil para la identificación de los linfocitos Treg. Sin embargo, esta molécula puede ser expresada en cualquier célula T después de ser activada (Sakaguchi y col., 2001). Por lo tanto, la población de CD4⁺CD25⁺ parece ser heterogénea, y se asume que solo una subpoblación de esta posee funciones supresoras, siendo esta la subpoblación CD4⁺CD25^{high} (alta expresión de CD25) (Beissert y col., 2006). En experimentos donde se utilizaron ratones a los que les fueron extraídos linfocitos que expresaban CD25, desarrollaron tiempo después enfermedades autoinmunes, sin embargo, la reconstitución de los linfocitos TCD4⁺CD25⁺ resultó en una inhibición de la autoinmunidad (Sakaguchi y col., 2008), indicando que estos linfocitos expresan funciones supresoras.

Otra característica importante es que los linfocitos Treg expresan específicamente el factor de transcripción FoxP3 (forkhead box P3). El gen FoxP3 fue inicialmente identificado como un gen defectuoso en ratones, originando una enfermedad conocida como Scurfy, la cual se caracteriza por exhibir una hiperactivación de linfocitos TCD4⁺ y sobreproducción de citocinas (Sakaguchi y col., 2008). La mutación de este gen en humanos es la causa principal de una enfermedad conocida

como IPEX (Beissert y col., 2006), una enfermedad autoinmune relacionada a Scurfy. La expresión de FoxP3 en células TCD4⁺ vírgenes confiere actividad supresora e induce la expresión de moléculas de superficie específicas de linfocitos Treg, como CD25, antígeno de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4, por sus siglas en inglés) y receptor de la TNF inducido por glucocorticoides (GITR, por sus siglas en inglés) (Hori y col., 2003). La expresión de estos receptores también se relacionan con la expresión de FoxP3 en células humanas. La inducción de actividad supresora en células T convencionales mediante la expresión de FoxP3, junto al desarrollo de enfermedades autoinmunes en ratones mutantes deficientes de FoxP3, indican que este factor de transcripción es un regulador importante en la función y diferenciación de células Treg (Beissert y col., 2006; Sakaguchi y col., 2010)

La detección de FoxP3 intracelular hace difícil el estudio de los linfocitos Treg, por lo tanto, marcadores de superficie son cruciales para identificar y purificar células Treg viables. En ratones, células TCD4⁺FoxP3 pueden ser identificados mediante la expresión de CD25. Sin embargo, la expresión de CD25 no puede ser utilizado para estudios en humanos, ya que en sangre periférica de adultos, aproximadamente el 30% son células TCD4⁺CD25⁺. Solo entre 1-2% de las células con alta expresión de CD25 han demostrado funciones supresoras y pueden ser consideradas como Treg (Baecher y col., 2001). Además, dado que los niveles de expresión de FoxP3 y CD25 son proporcionales en células T humanas, la purificación de células que expresen en alta densidad CD25 excluye células Treg FoxP3^{low}CD25^{mid} (baja expresión de FoxP3 y expresión intermedia de CD25). Sin embargo, por causas prácticas, no hay un criterio firme para determinar el límite entre la expresión alta e intermedia de CD25, complicando la reproducibilidad en el análisis para los estudios del número y funciones de estas células, particularmente en condiciones de inflamación las cuales las células T activadas expresan CD25 (Sakaguchi, 2010).

Como se ha descrito previamente, debido a su gran potencial terapéutico ha existido la necesidad de identificar nuevos marcadores de superficie para la purificación de las células Treg., entre ellos se encuentran: CTLA-4 (CD152); los receptores de quimiocinas CCR4 y CCR8; el gen de activación de linfocitos 3 (LAG-3 por sus siglas en inglés) y la integrina $\alpha_3\beta_7$ (CD103) (Beissert y col., 2006). Sin embargo, recientemente se describió que las células T reguladoras presentan una baja expresión de la molécula CD127 (receptor de la cadena alfa de la Interleuquina 7, IL-7). Varios estudios demostraron efectivamente que CD127 se expresa en menor proporción, esto debido a que FoxP3 interactúa con el promotor de CD127, inhibiendo su expresión (Liu y col., 2006; Seddiki y col., 2006; Hartigan-O'Connor y col., 2007). Por lo tanto, es actualmente utilizado para la purificación y estudio de esta subpoblación linfocitaria.

2.2. El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

2.2.1. Epidemiología actual del VIH/SIDA

Actualmente la infección por el VIH implica uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que afecta a un número importantes de individuos, incluyendo la población infantil, siendo esta epidemia parte de los Objetivos de Desarrollo del Milenio. Desde su descubrimiento en 1981, el SIDA ha alcanzado proporciones epidémicas por todo el planeta (ONUSIDA, 2010) y ha generado diversidad de publicaciones en todos los campos de la ciencia, estudios que han permitido entender como el virus infecta a la célula blanco y cuál es su ciclo de replicación, conocimiento que han hecho posible el desarrollo de estrategias terapéuticas para su control y así minimizar su diseminación.

Se estima que para el 2010 hubo en promedio 33,3 millones de personas infectadas por el VIH, de los cuales 2,5 millones corresponden a niños menores de 15 años, siendo la región de África

Sub-sahariana donde se encuentra la mayoría de las personas infectadas. Asimismo, la epidemia mundial del SIDA causó 1,8 millones de muertes en dicho año (14% menos de lo reportado en 2004) y se estimó un total de 260.000 defunciones en niños, lo que corresponde una disminución del 19% con respecto a 2004. Aunque, la tasa de crecimiento se ha mantenido relativamente constante en la población de personas VIH+, en 2010 hubo un estimado de 2,9 millones de personas que fueron infectadas por el VIH, lo que evidencia una disminución del 21% con respecto a lo estimado en 1997 (3,1 millones de personas infectadas), año el cual se alcanzó el pico de nuevas infecciones (ONUSIDA, 2010).

La disminución en las muertes como también en las nuevas infecciones, se debe principalmente al aumento en la disponibilidad de los antirretrovirales, así como también en el cuidado y apoyo de la población infectada por el VIH. Los efectos de las terapias antirretrovirales son especialmente evidentes en África sub-sahariana, donde se reportó que 320.000 personas menos murieron por causas relacionadas al SIDA en 2010 que en 2004, cuando los antirretrovirales comenzaron a ser dramáticamente distribuidos globalmente (ONUSIDA, 2010).

Las muertes asociadas al SIDA comenzaron a declinar en África Sub-sahariana y en el Caribe en 2005. Diferentes patrones han emergido en diferentes regiones. En América del Norte y Europa Central y Occidental, las muertes debidas al SIDA comenzaron a declinar poco después que los antirretrovirales fueron introducidos en 1996. Debido a los elevados costos de las terapias, la disponibilidad de los antirretrovirales estuvo muy limitada en los países de bajos y medianos ingresos entre 1996 y 2000. Una excepción importante fue Brasil, que en 1996 se convirtió en el primer país de ingresos medianos en adoptar una política nacional de terapia antirretrovirales gratuitas. Además del tratamiento de la infección por el VIH en sí misma, también se alcanzaron logros considerables en cuanto al desarrollo de tratamientos y pautas preventivas para numerosas

enfermedades oportunistas relacionadas con la infección por el VIH, lo que permitió ayudar a prevenir, retrasar la enfermedad y la muerte, mejorando la calidad de vida de estas personas (ONUSIDA, 2010).

Como se ha dicho previamente, el avance en la disponibilidad de los tratamientos antirretrovirales, cuidado y apoyo ha sido uno de los mayores éxitos logrados en 2010. Más personas se encuentran recibiendo las terapias antirretrovirales alrededor del mundo. En Diciembre del 2009, se estimó que 5,2 millones de personas de países de bajos y medianos ingresos reciben las terapias antirretrovirales. Esto representa un incremento de 1,2 millones de personas, o cerca del 30%, sobre el número de personas que recibían las terapias en el año 2008 (ONUSIDA, 2010).

En América Latina se estima que para 2009 había 1,9 millones de personas infectadas por VIH, con 92.000 nuevas infecciones, sin embargo, las estadísticas sugieren que el VIH en América Latina está bajo control. La prevalencia en la población general está estable en 0,4%. Más de la mitad de las personas que requieren tratamiento pueden recibirlo y el acceso universal al tratamiento es una realidad en Brasil, Costa Rica y México. América Latina fue una de las primeras regiones en comprometerse con el acceso universal cuando los actores interesados se reunieron en Brasil para tratar la ampliación de los programas de lucha contra el VIH. Cerca del 95% de la respuesta contra el SIDA en la región es financiada con recursos internos.

En Venezuela se reportó el primer caso de VIH en el año 1982 y a partir de esta fecha, las cifras de personas que viven con el VIH en el país han crecido de manera sostenida. Estimaciones realizadas por el programa Spectrum de ONUSIDA indican que la prevalencia para 2011 en Venezuela era de 0,54, con número estimado de 161.510 casos, de los cuales 4.535 son menores de 15 años (2,81% del total de la población menor a 15 años en Venezuela) (UNGASS Venezuela, 2012).

2.2.2. La replicación del VIH

El virus de la Inmunodeficiencia Humana es el agente etiológico causante del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El VIH se ha clasificado en: VIH tipo 1 (VIH-1) y VIH tipo 2 (VIH-2), ambos son transmitidos por contacto sexual, a través de la sangre y de madre a hijo. Los dos grupos virales pueden producir una sintomatología similar en humano, son morfológicamente similares y comparten el mismo linfotropismo celular CD4⁺, es decir, infecta principalmente a los linfocitos TCD4⁺, que expresan sobre su superficie el receptor del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II) (Pantaleo y Fauci, 1996). 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 dideoxineucleósidos, como la AZT (azidotimidina o zidovudina) que es un potente inhibidor de la replicación viral y es usado como medicamento contra el SIDA. Sin embargo, el VIH-2 se encuentra solo en África Occidental y en la India (Zagury y col. 1988), siendo el VIH-1 el virus más extendido a nivel mundial y principal causante del SIDA.

El virión contiene dos copias de ARN genómico, de simple cadena y polaridad positiva, encerradas en una cápside de proteínas virales y rodeadas por una doble capa de fosfolípidos derivados de la membrana celular del hospedador (ver **figura 1**). El ARN viral codifica nueve marcos abiertos de lectura (ORF). Tres de estos codifican a las poliproteínas Gag, Pol y Env; que son subsecuentemente proteolizadas en proteínas individuales comunes en todos los retrovirus. Las cuatro proteínas Gag: MA (matriz), CA (cápside), NC (nucleocápside) y p6; y las dos proteínas Env: SU (superficie o gp120) y TM (transmembrana o gp41); son componentes estructurales que forman la envoltura del virión. Las tres proteínas Pol: PR (proteasa), RT e IN (integrasa), proveen de

funciones enzimáticas esenciales y son encapsuladas con la partícula. (Frankel y Young, 1998). Además, el VIH-1 codifica seis genes adicionales: tat, rev, vif, vpr, vpx y nef. Los genes tat y rev son responsables de las activaciones transcripcionales y post-transcripcionales de la expresión de todos los genes virales (Tang, 1999).

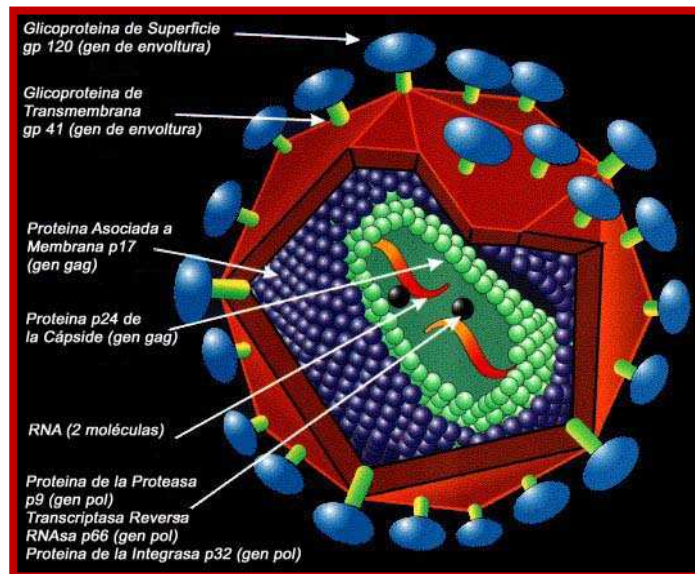


Figura 1: Estructura del Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Se muestran las proteínas de actividad enzimática, integral y de superficie de la membrana y el material genético. Extraído de: http://servidor-opsu.tach.ula.ve/alum/pd_4/fundasadarta/FUNDA8.html

Mediante experimentos *in vitro* se demostró como linfocitos TCD4⁺ eran el blanco “preferencial” para la replicación del VIH que, en última instancia, originaba la muerte celular de los mismos (Rosenberg y Fauci, 1989; Stevenson y col., 1990; Pantaleo y Fauci, 1996; Ho y col., 1995; Brinchmann, 2000). El VIH inicia su ciclo infeccioso uniéndose a su receptor CD4 específico sobre la superficie del linfocito T mediante una glicoproteína de la envoltura. Esta glicoproteína es la gp120 y se origina de la ruptura de un complejo proteico mayor, la glicoproteína gp160, ésta ruptura además produce una segunda glicoproteína importante para el proceso de infección, la glicoproteína transmembrana gp41. La unión de CD4 con gp120 facilita la fusión directa de la membrana viral con

la membrana celular del hospedador, este proceso a su vez es facilitado por la glicoproteína gp41 (Poranen y col., 2002).

Seguida la fusión y entrada del virus, este es descubierto o desensamblado en el citoplasma y los complejos de nucleoproteínas son rápidamente transportados al núcleo del linfocito T, mediados por la proteína viral Vrp, la cual puede detener la proliferación de las células T en la fase G2 del ciclo celular. Antes de que el genoma viral pueda ser integrado en el cromosoma del linfocito, una enzima proveniente del virión, la transcriptasa reversa cataliza las reacciones para transformar el ARN viral en ADN doble cadena (Frankel y Young, 1998), que luego se integrará al genoma celular. El ADN viral integrado constituye el provirus, y una vez que la célula recibe una señal de activación, una ARN polimerasa crea copias del material genético viral a medida que se sintetizan los ARN mensajeros que codificarán para proteínas virales (Wu y Marsh, 2001; Stevenson y col., 1990). Una vez ensambladas todas las proteínas virales, gracias a la acción de la proteasa, los viriones recién formados se liberan al exterior celular a través de un proceso de gemación, que promueve la infección de mas linfocitos TCD4⁺ (Greene, 1990).

2.2.3. Curso clínico de la infección por el VIH

En la **figura 2** se muestra el curso clínico típico de un paciente infectado por el VIH en ausencia de terapia antirretroviral. Se han podido identificar 3 fases evolutivas de la infección por el VIH: (1) infección primaria, (2) latencia clínica y (3) fase de SIDA. Dicho curso de infección es característico de aquellos llamados “progresores típicos”, quienes representan la mayoría de los individuos. El tiempo promedio desde el inicio de la infección, hasta la fase SIDA es de 8 a 10 años (Pantaleo y Fauci, 1995; Pantaleo y Fauci, 1996).

La primera fase (Fase de infección primaria o aguda) se caracteriza por un aumento exacerbado de la viremia (hasta 10^7 copias de ARN viral por mL de plasma) y un alto nivel de expresión viral y copias de ADN viral en células mononucleares de sangre periférica (Pantaleo y Fauci, 1996). Por otra parte, también se caracteriza por una disminución temprana de linfocitos TCD4⁺, por el establecimiento de un gran pool de células TCD4⁺ latentes infectadas (Pantaleo y Fauci, 1995; Pantaleo y Fauci, 1996) y por el desarrollo de una respuesta inmune específica (Rosenberg y Fauci, 1989).

La infección primaria comienza con variantes del virus que no inducen sincitio (fusión de células TCD4 a través de una interacción gp120/CD4 gp41/CXCR4) y que usan al CCR5 como correceptor, siendo capaces de infectar macrófagos y células TCD4⁺ memoria, estas cepas se denominan R5. Sin embargo, en un 50% de los pacientes infectados con el virus, variantes del VIH-1 (cepas R4) que inducen sincitio son capaces de infectar, no sólo células memoria, sino también células TCD4⁺ vírgenes y timocitos, usando el correceptor CXCR4, hecho que se observa únicamente en ensayos *in vitro* (Hazenberg y col., 2000; Margolis y Shattock, 2006). La inducción del sincitio es un mecanismo potencial de inducción de apoptosis en células TCD4⁺ no infectadas (Amendola y col., 1996).

En la segunda fase (Fase de latencia o crónica), la viremia es de unos órdenes de menor magnitud, aumentando progresivamente a medida que avanza el tiempo. El número de células TCD4⁺ de sangre periférica se recupera parcialmente después de la fase aguda, aunque disminuye con el tiempo (Douek, 2003). El incremento en el número de células se debe a que el sistema inmune posee la habilidad de recuperación por vías dependientes e independientes del timo. Está ampliamente aceptado que la infección afecta adversamente al timo, tanto en niños como en adultos. Estudios clínicos han demostrado que el timo de niños y adultos infectados con VIH-1 sufren

cambios morfológicos anormales que incluyen una disminución elevada de timocitos y una avanzada involución de éste órgano (Haynes y col., 2000; Douek y col., 2003).

En la fase clínica SIDA, el número de células TCD4⁺ disminuye hasta valores por debajo de las 200 células/ μ l en sangre periférica, y la carga viral aumenta exponencialmente tanto en nódulos linfáticos como en sangre periférica, a medida que ocurre un deterioro irreversible de los órganos linfoides secundarios y ocurrencia de infecciones oportunistas que conllevan a la muerte del paciente (Pantaleo y Fauci, 1996).

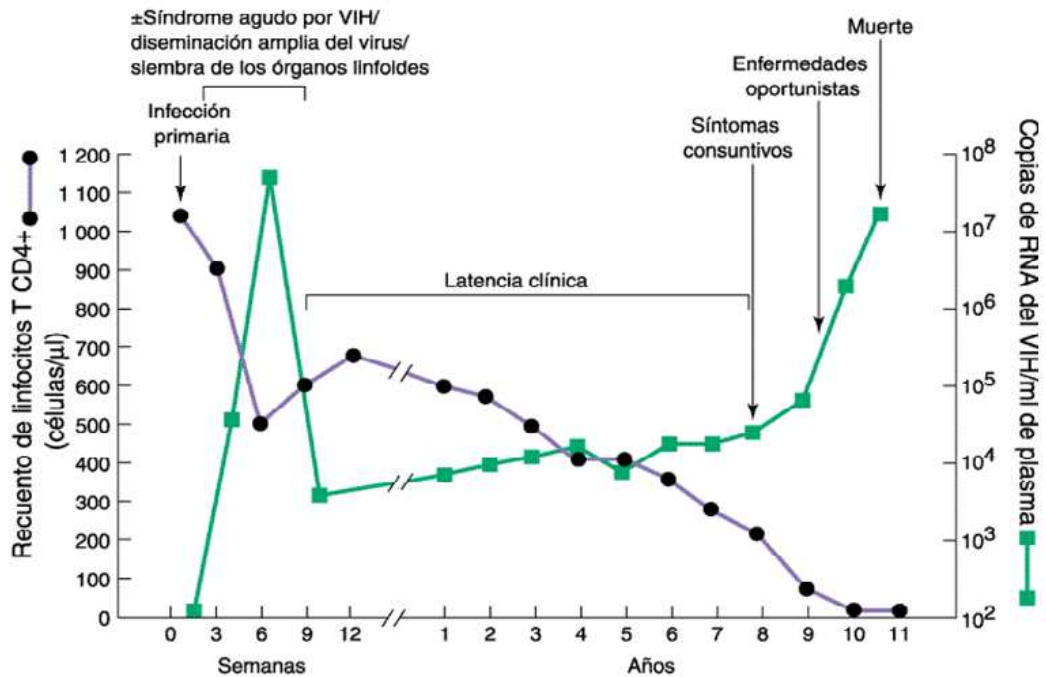


Figura 2: Curso clínico y perfil serológico de la infección por el VIH. Se observa las 3 fases del proceso infeccioso. Poco después de la infección primaria, el ARN viral es perceptible en suero. Sin embargo, la infección se identifica por la presencia de anticuerpos anti-VIH. Por lo general, no aparecen síntomas asociados al SIDA durante al menos 8 años después de la infección, aunque este intervalo es variable y depende de cada individuo. El inicio de la fase de SIDA es anunciado por el descenso de células T y aumento de la carga viral. Extraído de: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/spanish-chapter7-3.htm>.

2.2.4. Inmunopatología de la infección por el VIH

El VIH como bien se describió previamente, produce una disminución progresiva de las células TCD4⁺ en el individuo infectado (Pantaleo y Fauci, 1996). Esta disminución ocasiona pérdida de la función colaboradora de los linfocitos TCD4⁺ que conduce a la inmunosupresión del sistema inmunitario y con el tiempo, en ausencia de la terapia antirretroviral, al SIDA (Pantaleo y Fauci, 1996; Chinen y Shearer, 2002).

El VIH induce una fuerte y eficiente respuesta inmune humoral y celular, sin embargo, la infección es parcialmente controlada. Se conoce que el control de la viremia se genera principalmente por los linfocitos TCD8⁺, los cuales pueden proliferar, producir citocinas y Perforina, que destruyen las células infectadas controlando así la infección. Sin embargo, estas células dependen casi exclusivamente de los linfocitos TCD4⁺ para generar una respuesta efectiva anti-VIH. Los linfocitos TCD4⁺ en la infección por VIH se encuentran comprometidos funcionalmente, y como consecuencia se inhibe una respuesta anti-VIH efectiva (Prendergast y col., 2012).

En contraste con los pacientes adultos infectados por VIH, los niños infectados por el virus presentan una mayor viremia y la respuesta inmune en la infancia temprana, se caracteriza por ser de tipo Th2. Aunque la respuesta mediada por células TCD8⁺ es detectable desde el nacimiento, esta es incapaz de reducir la carga viral. Sin embargo, el mayor contraste entre adultos y niños, es la respuesta mediada por linfocitos TCD4⁺, ya que en niños, es muy reducida. En la mayoría de niños menores a 1 año, no es detectable la actividad específica anti-VIH (Prendergast y col., 2012). Sin embargo, se ha reportado que la respuesta inmune anti-VIH mejora con la edad (Walker y col., 2004).

La aparente contradicción que existe al no haber un control de la infección, a pesar que se genere la respuesta inmune, puede ser explicada a través de numerosos mecanismos del virus para evadir la respuesta inmune, entre los que se encuentran: la latencia del provirus del VIH, el cambio de la cepa viral de R5 a X4, la disminución de la expresión de moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), las mutaciones de los epítopes de las proteínas virales y el aumento de la expresión celular del ligando de Fas, (McMichael y Rowland-Jones, 2001; Chinen y Shearer, 2002), siendo este último uno de los mecanismos por el cual los linfocitos Treg pueden estar jugando un papel importante en esta inmunopatología, ya sea por la hiperactivación del sistema inmunitario (Kinter y col., 2004; Tsunemi, 2005; Card y col. 2009 ;Moreno-Fernandez y col., 2011) o como mecanismo evasor del virus frente a esta respuesta (Andersson y col., 2005; Nilsson, y col. 2006; Chase y col., 2008; Hu y col., 2008; Ji y Cloyd, 2009; Zelinskyy y col., 2009).

La patogénesis del VIH/SIDA desde su caracterización ha sido muy bien estudiada y se puede dividir en dos amplias categorías, la primera es aquella concerniente al efecto citopático directo del virus sobre las células TCD4⁺ (patogénesis viral) y una segunda categoría es la que engloba a todos los efectos indirectos de la infección, en los cuales la inmunopatogénesis toma la mayor parte, a través de: 1) células T citotóxicas CD8⁺ que pueden matar a las células TCD4⁺ infectadas con el virus; 2) la infección de células presentadoras de antígenos que origina efectos sobre muchas moléculas, los cuales incluyen: una baja regulación de IL-12, CMH II y B7, y una alta regulación de IL-10 y Fas; 3) supresión inmune inducida por proteínas del VIH, como gp120, Tat o Nef y 4) muerte de las células T por apoptosis (Pantaleo y Fauci, 1995; Pantaleo y Fauci, 1996).

El decremento del número total de linfocitos TCD4⁺, en parte es inducido mediante apoptosis por el VIH, producción impar o redistribución a los órganos linfáticos (McCune, 2001). Particularmente se ha demostrado que el gen Tat del VIH-1 incrementa la expresión del receptor de

muerte CD95 en linfocitos T, tanto en niños como en adultos, mediando la muerte celular programada de los linfocitos TCD4⁺ vírgenes y memoria por la vía extrínseca o AICD (Westendorp, 1995). Estas células CD4 que exponen el receptor en su superficie promueven la unión con células que expresen Fas ligando (FasL) en su superficie, como macrófagos, y una vez que se ha fijado este ligando de muerte al receptor se inician una serie de eventos citoplasmáticos que determinan la apoptosis. Específicamente, esta unión promueve el reclutamiento de adaptadores (FADD, Fas-associated death domain o dominios de muerte asociados a Fas) y pro-caspasas iniciadoras, pro-caspasas 10 y 8 en el linfocito TCD4⁺. El receptor Fas interactúa con FADD y éste interactúa con las pro-caspasas a través de dominios proteicos denominados DD (death domain) que resultarán en la formación del DISC (death inducing signaling complex o complejo de señalización que induce la muerte). La proximidad de DISC a las procaspasas 8 y 10 las lleva a su forma activa y estas a su vez pueden activar a la pro-caspasa 3 y así iniciar la Apoptosis (Benedict y col., 2002).

La molécula PD-1 perteneciente de la familia CD28 ha sido estudiada últimamente en la inmunopatología del VIH. La PD-1 es expresada induciblemente en células T, que luego puede unirse con el Receptor de Células T (TCR), resultando en la detención del ciclo celular y la terminación en la activación de las células T (Day y col., 2006; Kaufman y Walker, 2009). Ensayos con ratones knockout y usando anticuerpos que bloquean PD-1, han demostrado la importancia de esta molécula en la homeostasis de la respuesta inmunitaria (Day y col., 2006). Sin embargo, recientes estudios realizados en humanos infectados por VIH, indican que la PD-1 juega un papel importante promoviendo la apoptosis en linfocitos T (Petrovas y col., 2006).

La importancia de la molécula PD-1 ha sido bien establecida en linfocitos TCD8⁺, donde se ha observado una sobreexpresión de la misma en pacientes infectados por VIH y dicha expresión se correlaciona con disfunción en la actividad citotóxica de estas células (Day y col., 2006; Petrovas y

col., 2006; Zhang y col., 2007; Kaufman y Walker, 2009). Recientemente se demostró que la proteína viral Nef, induce la expresión de PD-1 durante la infección *in vitro* (Muthumani y col., 2008). Aunque son pocos los estudios realizados sobre la expresión de PD-1 en linfocitos TCD4⁺, existen ciertas similitudes entre ambos tipos celulares, por ejemplo, se observa una alta expresión de la molécula en linfocitos TCD4⁺ de pacientes con VIH, además que también se correlaciona con la carga viral y es inversamente proporcional con el número total de células TCD4⁺ (Day y col., 2006; D'Souza y col., 2007).

Por otra parte, La IL-7 es una citocina crucial que está envuelta en la regeneración, activación y homeostasis de las células T en el sistema inmune (Bradley y col., 2005; Fry y Mackall, 2005; Zhang y col., 2009). Un estudio reciente ha demostrado que la administración *in vivo* de IL-7 en humanos incrementa la diversidad de RCT a través de la expansión preferencial de células T vírgenes, sugiriendo que una terapia basada en la IL-7 podría mejorar y ampliar la respuesta inmune, particularmente en individuos infectados por VIH (Sportes y col., 2008), sin embargo, existen autores que recomiendan no usar una terapia basada en esta citocina en pacientes VIH⁺ (Sharma y col., 2008). Por otra parte, se ha observado en pacientes infectados por VIH que la expresión de CD127 en células T es menor que en individuos sanos y que dicha expresión se correlaciona inversamente con la progresión de la enfermedad (Sharma y col., 2008).

2.2.5. La terapia antirretroviral de alta eficiencia (TAAE)

La tasa de mortalidad por VIH ha disminuido notablemente desde la disponibilidad del tratamiento antirretroviral de alta eficiencia (TAAE) (Crum y col., 2006). 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). El TAAE o triterapia, ha mejorado enormemente la tasa de morbilidad (por una incidencia disminuida de infecciones oportunistas) y de mortalidad (Hammer y col., 1997; Powderly, 2000). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos hechos por los grupos de investigación y uso de la triterapia, aun persisten grandes problemas sobre la comprensión de la dinámica hospedador-virus, de la inmunopatología de la infección, de la reconstitución del sistema inmunológico ante la terapia y la de erradicación de la infección (Alfonzo, 2004).

El conocimiento profundo sobre el ciclo de replicación del virus ha permitido, a pesar de su complejidad, obtener numerosos blancos potenciales a los agentes terapéuticos. Este virus se replica constantemente a lo largo de la infección, lo que constituye a la vez su fuerza y debilidad. Esta característica permitiría teóricamente, la utilización de antivirales desde el inicio de la infección. (Gortmaker y col., 2001; Alfonzo, 2004).

El efecto más evidente de la administración del TAAE, es el aumento de las células TCD4⁺ en estos pacientes, caracterizado por un aumento inicial de las células T memorias, seguido por un aumento tardío de células T vírgenes (Autran y col., 1997). Este aumento es consecuencia de la disminución en la carga viral. Sin embargo, esta dinámica difiere en niños infectados verticalmente, donde se ha reportado que la mayoría de las células nuevas llevan el marcador CD45RA, indicando que son células T vírgenes. Este patrón de la reconstitución del sistema inmunológico puede deberse a que el sistema inmune se encuentra en desarrollo y el timo se encuentra activamente produciendo nuevas células (Gibb y col., 2000; Resino y col., 2004).

Asimismo, se ha observado una reducción en la expresión de Fas/FasL en la superficie de las células T de pacientes infectados bajo administración del TAAE (Badley y col., 1998; Sloand y col., 1999). Sin embargo, un trabajo reciente demostró que permanece una alta expresión del

receptor Fas, a pesar que existe una disminución del ligando de Fas (FasL) en los tejidos linfoides. La incapacidad del TAAE en disminuir receptores de muerte en los tejidos linfoides puede conllevar a importantes consecuencias inmunológicas, ya que estos son los sitios de mayor pérdida de células T por apoptosis en la infección por el VIH, indicando que aunque el tratamiento suprime enormemente la replicación viral, no promueve una completa reconstitución del sistema inmune (Herbeuval y col., 2009). En niños se han observado resultados similares, siendo aquellos individuos con un bajo número de células TCD4⁺ expresan un mayor porcentaje el receptor, sin embargo, se estabiliza a medida que avanza la administración del TAAE (Bohler y col., 2001).

En otro orden de ideas, se ha demostrado que ocurre un aumento de la expresión de la molécula PD-1 en linfocitos TCD8⁺ de individuos infectados por el virus, siendo esta responsable en inducir apoptosis como también inhibir la activación de estas células (Day y col., 2006; Kaufman y Walker, 2009). El virus mediante la proteína Nef-1 puede inducir la expresión de PD-1 en las células T (Muthumani, K. y col., 2008). Sin embargo, se ha observado como la administración del TAAE puede disminuir la expresión de este receptor en estas células (Trauttman y col., 2006). Incluso varios autores postulan la expresión de este receptor como marcador para el estudio de la progresión de la enfermedad (Rosignoli y col., 2007). También se han obtenidos resultados similares en linfocitos TCD4⁺, donde se ha encontrado una mayor expresión de esta molécula en pacientes adultos VIH⁺ cuando se compara con individuos sanos (Day y col., 2006, D'Souza y col., 2007). Por otra parte, solo un trabajo sobre esta molécula se ha realizado en niños infectados. En este sentido Prendergast y colaboradores (2012), quienes demostraron que en estos niños hay una mayor expresión de PD-1 en las células TCD8⁺, y que se correlaciona inversamente con la activación de la respuesta inmune. Sin embargo, más estudios son necesarios para dilucidar con mayor detalle la dinámica de este receptor, siendo el mismo un blanco terapéutico muy prometedor.

Un marcador importante que se ha estado estudiando en la inmunopatología de la infección por el VIH, es la expresión de CD127 (IL-7R α). Se conoce que la expresión de CD127 en células TCD4⁺ y TCD8⁺ es mucho menor en pacientes adultos infectados con el virus, que en individuos sanos (Colle y col., 2006; Benito y col., 2008, Zhang y col., 2009). Esto también se observa en niños infectados (Sharma y col., 2008). El VIH mediante la proteína Tat puede promover la disminución en la expresión de este receptor (Faller y col., 2006).

La IL-7 ha sido propuesta para su uso de forma terapéutica, ya que ella está involucrada en la timopoiesis, mantenimiento de células TCD8⁺ memoria y homeostasis de células T periféricas (Alpdogan y van den Brink, 2005; Bradley y col., 2005), pero al presentarse diversas alteraciones en el sistema inmune a pesar de los niveles altos de IL-7, se sugiere que este tipo de terapia puede que no sea beneficiosa (Sharma y col., 2008), e incluso, se ha relacionado que la disminución de CD127 y el aumento de IL-7 plasmático, promueve la expresión de Fas, haciendo más susceptibles las células a apoptosis (Fluur y col., 2007). Sin embargo, se ha observado que el TAAE puede aumentar la expresión celular de CD127 en pacientes adultos (Colle y col., 2006; Benito y col., 2008) y en niños VIH⁺ (Sharma y col., 2008), promoviendo la supervivencia de las células T en estos pacientes.

Uno de los efectos más pronunciados en la administración del TAAE es la disminución en la frecuencia de apoptosis en células T de adultos y niños (Roger y col., 1999; McCune, 2001), el cual puede ser explicado parcialmente mediante la disminución en la expresión de moléculas inductoras de apoptosis a medida que aumentan moléculas asociadas a la sobrevivencia celular (Petrovas y col., 2006; Fluor y col., 2007; Vivas y col., 2012). Sin embargo, también se ha observado que la administración del TAAE también mejora algunas funciones de los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺.

La proliferación celular ha sido demostrada como una de las principales funciones efectoras de los linfocitos T durante el establecimiento de la respuesta inmune en respuesta a infecciones

(Sprent y Tough, 2001), pero en pacientes típicos infectados con el virus se ha observado una disminución en la capacidad proliferativa de estas células, cuando se compara con pacientes no progresores e individuos sanos (Lyasere y col., 2003; Lichterfeld y col., 2004; Betts y col., 2006). Sin embargo, se ha demostrado ciertas mejorías cualitativas en esta respuesta proliferativa *in vitro* a mitógenos y a diversos antígenos específicos, en aquellos pacientes que reciben la triterapia (Autran y col., 1997). Al contrario, las respuestas de proliferación a los antígenos del VIH-1 muestran solo una mejoría menor (Mezzaroma y col., 1999).

Numerosos trabajos han descrito la recuperación en la respuesta inmune contra ciertos patógenos oportunistas (Li y col., 1999; Rinaldo y col., 1999; Alfonzo y col., 2003). Sin embargo, células T específicas contra el virus son detectadas solo cuando el tratamiento es iniciado poco después de haber sucedido la infección primaria (Rosenberg y col., 1997; Mezzaroma y col., 1999). Las células Th1 específicas contra el VIH y productoras de IFN- γ , no son totalmente eliminadas luego de una exposición prolongada al virus, persistiendo en una baja frecuencia, incluso después de la aplicación del tratamiento. Posiblemente, esta gran discrepancia entre una rápida restauración de la respuesta inmune contra patógenos oportunistas y una pobre respuesta contra el virus se deba a la diferencia en la exposición antigénica, ya que el TAAE suprime enormemente la carga viral pero sin afectar a estos patógenos oportunistas (Carcelain y col., 2001; Streeck y col., 2008).

2.2.6. Los linfocitos T reguladores en la inmunopatología del VIH

Como ya se describió previamente, los linfocitos Treg son pilares fundamentales en la regulación de la respuesta inmune, sin embargo, poco se conoce sobre su papel en la inmunopatología del VIH. En general, los linfocitos Treg pudiesen tener diferentes propiedades

funcionales en la inmunopatología del VIH: por una parte podría limitar la activación general del sistema inmune, característico en pacientes con VIH o podrían suprimir la respuesta inmune antiviral (Li y col., 2008).

La caracterización del papel de las células Treg en la infección por el VIH-1 es controversial, mayormente por la falta de consistencia en la determinación del fenotipo de estos linfocitos en conjunto con métodos técnicos para estudiar la funcionalidad y el número de Treg, el estado clínico de los pacientes en los estudios, y el poco conocimiento que se tiene hasta ahora sobre la dinámica de estas células en sangre periférica durante el tiempo del curso de la enfermedad (Holmes y col., 2008). Numerosos estudios sugieren que el papel de las Treg en la infección por el VIH es perjudicial para el paciente, ya que suprime la respuesta inmune específica contra el VIH (Andersson y col., 2005; Nilsson y col., 2006; Li y col., 2008), mientras que otros proponen un papel beneficioso de las Treg al suprimir la activación crónica del sistema inmune durante la infección (Kinter y col., 2004; Card y col., 2009; Moreno-Fernández y col., 2011).

Numerosos grupos han demostrado que el número de células Treg se encuentran disminuidas en sangre periférica durante la infección por el virus (Oswald-Ritchter y col., 2004; Andersson y col., 2005; Apoil y col., 2005; Eggena y col., 2005; Nilsson y col., 2006; Baker y col., 2007). Nilsson y colaboradores (2006) demostraron que, en pacientes adultos VIH⁺, los linfocitos Treg tienden a disminuir en sangre periférica a medida que se acumulan en los ganglios linfáticos. Esto último también se comprobó en simios infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia en Simios (VIS) (Estes y col., 2006). Se demostró además que estas células acumuladas en los órganos linfáticos mantenían una fuerte actividad supresora, afectando las funciones efectoras de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ (Nilsson y col., 2006; Li y col., 2008), siendo estos órganos reservorios importante para la replicación viral (Pantaleo y col., 1993). Por otra parte, la proteína viral gp120

promueve mediante una interacción directa la acumulación de linfocitos Treg, por lo que posiblemente, la acumulación de esta población celular puede implicar un mecanismo de evasión del virus frente a la respuesta inmune del hospedador (Nilsson y col., 2006).

Los linfocitos Treg expresan los correceptores CXCR4 y CCR5 necesarios para la infección por el VIH. Dado que las células Treg son funcionalmente anérgicas *in vitro*, fue sorprendente encontrar que las células Treg mantienen altos niveles de infección por el VIH (Oswald-Ritchter y col., 2004). Dos evidencias parecen indicar que la infección y replicación del VIH en las Treg podría ser importante *in vivo*. Primero, aunque menos del 5% del total de células TCD4⁺ de sangre periférica son Treg, cerca del 50% de células TCD4⁺ de órganos linfoides en mucosas de pacientes VIH⁺ son Treg (Nilsson y col., 2006). Por lo tanto, las Treg podrían representar un número significativo de blanco para la infección del VIH en órganos linfáticos. Segundo, cerca del 13% de las Treg de simios son infectadas por el VIS de los órganos linfáticos de estos animales. Por lo tanto, las Treg parecen ser blancos importantes del VIH para su replicación e infección, al menos en los órganos linfáticos de mucosas durante la infección aguda (Estes y col., 2006; Holmes y col., 2008).

Sin embargo, otros estudios demostraron que en pacientes adultos infectados por el VIH con valores detectables de ARN viral, había un mayor número de linfocitos Treg en sangre periférica, en comparación con pacientes cuyos niveles de ARN viral no eran detectables, sin embargo, las funciones supresoras de los linfocitos Treg eran menores en estos pacientes adultos (Tsunemi y col., 2005; Eppel y col., 2006; Montes y col., 2006; Mozos y col., 2007; Lim y col., 2007). Como se mencionó previamente, la inhibición de la respuesta inmune contra VIH puede ser beneficiosa para el individuo infectado, ya que puede disminuir la hiperactivación del sistema inmune, la cual es una de las causantes principales en la reducción del número de linfocitos TCD4⁺ y por lo tanto, con la progresión de la enfermedad (Kinter y col., 2004; Card y col., 2009; Moreno-Fernández y col., 2011).

Hasta la fecha, son muy pocos los datos disponibles concernientes al papel de las Treg en la infección pediátrica con el VIH. La eliminación de las células Treg en infantes sanos pero expuestos al VIH ha demostrado un incremento en la respuesta inmune *in vitro* específica contra el VIH (Legrand y col., 2006). Sin embargo, Freguja y colaboradores (2011) demostraron que la activación del sistema inmune en niños infectados por el VIH contribuye a la expansión de linfocitos Treg, pero, la actividad supresora de estas células es ineficiente en limitar la activación del sistema inmune, que a su vez puede contribuir a la progresión de la enfermedad en estos pacientes pediátricos.

2.3. La Tuberculosis como enfermedad oportunista en la infección por el VIH

2.3.1. Epidemiología actual de la Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Afecta principalmente a los pulmones (TB pulmonar) pero también puede afectar a otros tejidos (TB extrapulmonar). La enfermedad se propaga en el aire cuando personas enfermas con TB pulmonar expulsa bacterias, por ejemplo, tosiendo. En general, una pequeña proporción de personas infectadas desarrollará la enfermedad, sin embargo, las probabilidades de desarrollar TB es mucha mayor en aquellas personas infectadas por el VIH (Andersen y Doherty, 2005; WHO, 2011).

El impacto de la TB puede ser medido en términos de incidencia (definido como el número de nuevos casos de TB derivados en un período dado, usualmente un año), prevalencia (definido como el número de casos de TB en un tiempo determinado) y mortalidad (definido como el número de muertes causadas por TB en un periodo de tiempo, usualmente un año) (WHO, 2011).

Sin tratamiento, la tasa de mortalidad es alta por esta infección bacteriana. El uso de una combinación de drogas desarrolladas en las décadas de 1940 y 1950, puede dramáticamente reducir la tasa de mortalidad. En ensayos clínicos, se ha documentado una tasa de curación cercana al 90%. Sin embargo, la TB sigue siendo uno de los mayores problemas de salud mundial. En 2010, se estimó en promedio 8,8 millones de casos incidentes de TB, 12 millones de casos prevalentes y 1,4 millones de muertes (Incluyendo muertes en personas infectadas por el VIH). Se destaca que la TB es la segunda causa de muerte debido a un agente infeccioso a nivel mundial (Solo por detrás de la infección por el VIH) (WHO, 2011).

La tasa de incidencia global decayó levemente entre 1990 hasta 1997, y luego incremento alrededor del 2001, ya que el número de casos de TB en África aumentó con la epidemia del VIH. Desde 2002, la tasa de incidencia comenzó a decaer alrededor del 1,3% por año y esta tendencia se mantiene. El número absoluto de incidencia también comenzó a decaer lentamente desde 2006, cuando la disminución en la tasa comenzó a exceder a la tasa de crecimiento de la población mundial (WHO, 2011).

Como se ha descrito previamente, existe un estimado de 12 millones de casos prevalentes, esto es equivalente a 178 casos por 100.000 habitantes. Por último, se reportó para el año 2010 1,4 millones de muerte, de los cuales 1,1 millones corresponden a personas no infectadas por el VIH y 0,4 personas infectadas por el virus. Sin embargo, la tasa de mortalidad ha ido disminuyendo rápidamente, con un promedio de 8,6% por año entre 1990 y 2010 (WHO, 2010).

Desde 2004, Venezuela está clasificada en el grupo de los países de la Región de las Américas con mediana carga de TB. Las tasas de incidencia se han mantenido estables desde 1993, sin embargo, entre el 2005 hasta el 2010 se observó una disminución, desde 25,8 por 100.000 habitantes hasta 21,9 por 100.000 habitantes. Los casos nuevos de TB en pacientes con VIH/SIDA

pasaron de 398 a 476 en el período 2010-2011, es decir, aumentó un 19,59%. Por último, La tasa de mortalidad de TB en el quinquenio 1999-2005 fue de 2,8 y en 2009 alcanzó 1,94 por 100.000 habitantes (RSCMV, 2011; WHO, 2011).

2.3.2. Inmunología de la Tuberculosis

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* usualmente no conlleva a que se desarrolle la enfermedad. El sistema inmunológico genera una respuesta que es capaz de contener al patógeno, pero no lo elimina. Solo en un pequeño porcentaje se desarrolla la enfermedad, probablemente debido a la falta de una respuesta inmune eficiente. En la mayoría de los casos, la infección es asintomática y la latencia clínica se extiende en el mayor de los casos durante la vida del individuo. Sin embargo, la reactivación de la infección latente puede ocurrir en respuesta a perturbaciones en el sistema inmunológico, por ejemplo, la inmunodeficiencia causada por la infección con el VIH (Flynn y Chan, 2001).

Mycobacterium tuberculosis persiste en los macrófagos dentro de un granuloma en los órganos del individuo infectado. Un granuloma consiste de macrófagos y células gigantes, células T y B, y fibroblastos. En la infección latente, el estado de la bacteria dentro de los granulomas es desconocido. El organismo puede encontrarse en un estado no replicativo, como también puede que se esté replicando activamente pero el sistema inmune lo destruye, o puede encontrarse metabólicamente alterado con ciclos replicativos limitados. Sin embargo, alteraciones en el sistema inmune puede reactivarla, con necrosis y daños en los tejidos pulmonares (Flynn y Chan, 2001; Lewinsohn y col., 2004).

Los macrófagos son las primeras células que sirven como hospedadoras de *M. tuberculosis*, estas son infectadas por las bacterias que logran pasar a través del tracto respiratorio hacia los

alveolos terminales. Macrófagos activados inhiben el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* a través de diversos mecanismos, los cuales todavía falta por conocer. En ratones como en humanos, la producción del óxido nítrico es crítico para el control de la infección por esta bacteria (Rook y Hernandez-Pando, 1996; Flynn y Chan, 2001). Se ha descrito además que los macrófagos pueden sufrir apoptosis cuando son infectados por la bacteria, siendo este otro mecanismo de protección en el individuo infectado (Molloy y col., 1994, Flynn y Chan, 2001; Lewinsohn y col., 2004), y los macrófagos producen citocinas que pueden promover la compartimentalización de la TB ya sea de forma directa o indirecta. Estas incluyen IFN- γ , el TNF- α , también secretado por células T, e Interleuquina 12 (IL-12) e Interleuquina 18 (IL-18) también secretado por células dendríticas (Flynn y Chan, 2001).

Sin embargo, también se ha reportado que *M. tuberculosis* ha desarrollado mecanismos de evasión de esta respuesta. Uno de esos importantes mecanismos reside en inhibir la maduración y acidificación de los endosomas que contienen las bacterias dentro de los macrófagos (Flynn y Chan, 2001). Además, la bacteria induce la producción de citocinas inmunosupresoras, como el TGF- β , la cual inhibe la respuesta anti-TB desactivando macrófagos y respuesta T específica. El TGF- β inhibe la producción *in vitro* de TNF- α e IL-12 en macrófagos (Hirsch y col., 1994; Toossi y col., 1997; Flynn y Chan, 2001).

Por otra parte, las células dendríticas (CD) también son importantes en el establecimiento de una respuesta inmune contra *M. tuberculosis*. Las CD residentes en el tejido pulmonar, pueden promover la diferenciación de células T hacia una respuesta de tipo Th1 o Th2, a través de la secreción de IL-11 o IL-10 respectivamente. Estas células promueven principalmente una respuesta de tipo Th2, sin embargo, la exposición con patógenos inhalados induce la activación y maduración

de las células dendríticas para la producción de IL-12, induciendo una respuesta de tipo Th1 (Holt, 2000).

Evidencias clínicas y experimentales sugieren que la inmunidad mediada por células T es esencial para controlar la infección por *M tuberculosis*. En humanos, condiciones clínicas donde la respuesta mediada por células TCD4⁺ se encuentra comprometida, como en la infección por VIH, incrementa dramáticamente el desarrollo de TB (Barnes y col., 1991; Diane y col., 1999). Numerosos estudios indican que las células TCD4⁺ de individuos infectados producen IFN- γ en respuesta a una gran variedad de antígenos micobacterianos. La principal función efectora en linfocitos TCD4⁺ se cree es la producción de IFN- γ y otras citocinas que puedan activar macrófagos, promoviendo el control del patógeno. Numerosos trabajos han demostrado que las Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de adultos infectados, secretan IFN- γ en condiciones *in vitro* (Cooper y col., 1993; Flynn y col., 1993; Hirsch y col., 1999). Por otra parte, se ha demostrado que la respuesta de Th2 no es capaz de controlar la infección, y se le ha asociado a la progresión de la enfermedad con este tipo de respuesta celular (Flynn y Chan, 2001).

Los niños de edades tempranas que son infectados por *M. tuberculosis* poseen un mayor riesgo de desarrollar TB en comparación a niños mayores y adultos. Sin tratamiento, la mayoría de los niños menores a un año mueren por TB. La manifestación de la TB varía dramáticamente con la edad. Los niños inmunocompetentes menores a dos años son los que poseen la mayor probabilidad de desarrollar TB y la probabilidad aumenta si se encuentra infectado por el VIH. Esta mayor susceptibilidad se debe principalmente a que estos niños se encuentran en un proceso de maduración y desarrollo del sistema inmunológico, lo que los hace más susceptibles a las enfermedades (Lewinsohn y col., 2004).

Se ha demostrado que en niños infectados por *M. tuberculosis*, la quimiotaxis de monocitos se encuentra disminuida con respecto a los adultos y solo se normaliza hasta alcanzar los 6 años de edad. Los neonatos poseen una reducida capacidad de producir IFN- γ y TNF- α , por parte de células T y macrófagos. Además la estimulación antigénica *in vitro* promueve una respuesta Th2. Estos resultados podrían explicar porque estos niños infectados son más susceptibles a desarrollar TB (Lewinsohn y col., 2004).

2.3.3. La vacuna BCG

El incremento en la prevalencia de la infección por VIH en niños, asociados con inmunodeficiencias, ha llevado a la preocupación en la eficacia y complicaciones de la inmunización en estos niños (Ninane, col., 1988). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que la vacuna BCG sea administrada a todos los infantes asintomáticos, independientemente que haya sido expuesto al VIH (Hesseling y col., 2007).

La BCG es una vacuna viva y atenuada de *Mycobacterium bovis*, es la única vacuna disponible actualmente contra la Tuberculosis y hoy en día, mas de 3 millones de personas han recibido la vacuna, convirtiéndola en la vacuna con mayor uso a nivel mundial. Esta vacuna se originó por el continuo pasaje *in vitro* de una cepa virulenta a comienzos del siglo pasado, este proceso se realizó por 13 años consecutivos (Andersen y Doherty, 2005).

Debido a la gran demanda a nivel mundial de la vacuna, la cepa inicial fue ampliamente distribuida a diversos laboratorios a nivel mundial. Esta diseminación y producción local se dio antes de emplearse protocolos de estandarización efectiva, por lo tanto, muchas cepas locales de BCG fueron establecidas con diferencias genéticas y en la composición antigénica (Oettinger y col., 1999). Por lo tanto, BCG posee una eficacia relativa variando entre 0% hasta 80% para prevenir la forma

diseminada de la enfermedad, sin embargo, posee un bajo efecto en prevenir la forma pulmonar de la TB (Andersen y Doherty, 2005; Trunz y col., 2006). No existe una evidencia clara que la BCG protege a los niños infectados con VIH de estas formas de la enfermedad, incluso puede ocasionar una enfermedad conocida como BCGitis ocasionando una gran morbilidad en estos niños (Hesseling y col., 2005; Mansoor y col., 2009).

Los determinantes para el establecimiento de una respuesta inmune eficaz contra TB inducida por la vacunación no están dilucidados completamente, aunque, la respuesta de tipo Th1, caracterizada por la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-2, se cree es esencial. Se ha demostrado que en niños sanos, la BCG induce la proliferación de poblaciones de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ que producen las citocinas antes mencionadas, lo que es considerado como un indicador en la calidad de la respuesta inmune (Soares y col., 2008). Al contrario, se ha observado que en niños infectados por el virus, la producción de estas citocinas es mucho menor (Mansoor y col., 2009). Kampmann y colaboradores (2006) demostraron que en niños infectados por el VIH pero que recibieron el TAAE, la producción *in vitro* de citocinas como IFN- γ , TNF- α e IL-10, sigue siendo mucho menor.

Por último, La base para una vacunación exitosa reside en la capacidad del individuo para generar memoria inmunológica. La memoria inmunológica es la habilidad del sistema inmune para responder rápidamente frente a un patógeno, que ha sido previamente encontrado ya sea por una infección o inmunización, como resultado se genera una expansión clonal de linfocitos antígeno-específicos (Sprent y col., 1997). Las células de memoria pueden mantenerse por un largo periodo de tiempo sin que haya estimulación antigénica. Este mecanismo de mantenimiento de memoria puede ser sujeto a destrucción por parte del VIH-1, ya que el virus infecta y destruye o altera funcionalmente las células presentadoras de antígeno o diferentes poblaciones linfocitarias (Obaro y col., 2004).

Los pacientes infectados por el VIH poseen una mayor probabilidad de desarrollar infecciones oportunistas. En este orden de ideas, poco se conoce si la vacunación con BCG protege a los niños VIH+ contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, algunas evidencias indican que esta vacunación es menos eficiente en estos pacientes pediátricos. Tampoco se conoce si la administración del TAAE promueve una mayor protección frente a *Mycobacterium tuberculosis* a través de una buena respuesta inmune contra la vacuna BCG. Es por ello que decidimos estudiar si la administración durante 22 meses del TAAE tiene algún impacto sobre el establecimiento de la respuesta inmune contra la vacuna BCG y el posible papel de los linfocitos T reguladores en el mismo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos General

Analizar el posible papel de los linfocitos T reguladores en el establecimiento de la respuesta inmune mediada por linfocitos TCD4⁺ contra BCG en niños VIH⁺ bajo administración durante 122 meses del Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia y en niños sanos.

3.2. Objetivos Específicos

1. Medir las subpoblaciones celulares de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ (totales, virgen y memoria).
2. Medir la expresión *ex vivo* de receptores de muerte celular Fas (CD95) y PD-1 (CD279), como también el receptor de supervivencia celular CD127 (IL-7R α) en los linfocitos TCD4⁺ (totales, virgen y memoria).
3. Determinar la frecuencia de apoptosis en linfocitos TCD4⁺ totales.
4. Medir la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica.
5. Purificar células Treg humanas mediante el uso de perlas y columnas magnéticas, utilizando la discriminación fenotípica CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}.
6. Medir la linfoproliferación celular *in vitro* de Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) en presencia o ausencia de linfocitos Treg, bajo estimulación del mitógeno PHA (Fitohematoglutinina), de la vacuna BCG y la proteína viral Gag.
7. Medir la producción *in vitro* de IFN- γ intracelular de linfocitos TCD4⁺ bajo las condiciones previamente mencionadas.
8. Medir la producción *in vitro* de citocinas Th1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) y Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) a partir de plasma y sobrenadantes de cultivos de CMSP durante 72 horas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Grupo de estudio

En el estudio, se incluyeron 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 de forma voluntaria el estudio y dieron su consentimiento por escrito (Véase apartado **Anexos**). Las edades de los niños participantes oscilaban entre 0 y 2 años de edad. Se incluyeron a niños infectados con el VIH por transmisión vertical, es decir, contagio por la madre que suele ocurrir durante el parto, los pacientes no debieron ser tratados previamente con antirretrovirales, no haber presentado sintomatología de TB activa y debieron ser vacunados con BCG. El estudio se realizó durante 22 meses y se incluyeron 8 niños sanos y 6 niños VIH+, sin embargo 4 de ellos concluyeron el estudio.

La 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 con antirretrovirales, seguido por una segunda toma al segundo mes del tratamiento. Se ha demostrado que los niños VIH+ sin tratamiento, progresan más rápido a la fase SIDA de la enfermedad, sin embargo, estos pacientes también responden más rápido al tratamiento (Resino y col., 2004). Se espera que en los niños que responden bien a los antirretrovirales, disminuya su carga viral en 10 unidades (ejemplo: de 500.000 copias ARN/mL a 50.000 copias ARN/mL) (Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children, 2012). Por lo tanto, los datos obtenidos durante este mes son de gran importancia clínica.

Seguido al segundo mes, las tomas de muestras sanguíneas se realizaron cada 4 meses hasta cumplir los 22 meses del estudio.

4.2. Cuantificación *ex vivo* de subpoblaciones linfocitarias

La identificación de las subpoblaciones celulares 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) y 50µL de sangre total de pacientes y de niños sanos. Brevemente, se incubaron los anticuerpos monoclonales con la sangre durante 30 minutos en oscuridad a 4°C, para posteriormente agregarle 450 µL de solución de lisis (“FACS Lysing Solution”, BD) e incubar durante 15 minutos. Este procedimiento se realizó por duplicado. Después de lisar la sangre, se procedió a centrifugar (1000g) y resuspender en 300 µL de solución tampón PBS. Finalmente se analizó y se cuantificaron las poblaciones celulares mediante citometría de flujo (citómetro de flujo BD FACSCalibur con software CellQuest), con una adquisición de 20.000 eventos. Los análisis fueron realizados a partir de los parámetros de “foward scatter” y “side scatter”, fijando la ventana en la población que agrupaba a los linfocitos T vivos, los cuales fueron marcados con el anticuerpo monoclonal específico para CD3.

4.3. Medición *ex vivo* del receptor de muerte celular Fas (CD95)

La molécula FAS (CD95) es uno de los factores inductores de apoptosis celular, cuyo papel en la inmunopatología causada por la infección con el VIH es de gran importancia. Es uno de los responsables de la inducción de la apoptosis masiva en los linfocitos que ocurre en esta infección. Se determinó la expresión *ex vivo* de la molécula CD95 en la superficie de diferentes subpoblaciones linfocitarias mediante el marcaje selectivo de esta molécula por un anticuerpo ratón anti-CD95 humano conjugado con FITC (BD) y con una serie de anticuerpos (ratón anti-CD3 humano-PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC, ratón anti-CD45RO humano-PE). Se incubó 50 µL de sangre periférica

con estos anticuerpos por 30 minutos en oscuridad a 4°C, se lavaron las células y se lisaron los glóbulos rojos utilizando una solución de lisis (350µL) (“FACS Lysing Solution” de BD) por 15 minutos. Este procedimiento se realizó por duplicado. Posteriormente, las células fueron lavadas una vez más (1000g durante 5 minutos) y se resuspendieron en 300µL de PBS, siendo entonces analizadas en el citómetro de flujo.

4.4. Determinación de la expresión *ex vivo* de la molécula PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4+

PD-1 es una proteína transmembrana que es expresada induciblemente en células T. Recientes trabajos han demostrado que este receptor disminuye la respuesta inmunológica y se ha observado una mayor expresión de esta molécula en las células T de personas infectadas por el VIH. Por lo tanto, nos propusimos estudiar si la administración del TAAE altera la expresión *ex vivo* de estas moléculas de superficie en los linfocitos TCD4+ de niños VIH+. Para ello, se procedió a incubar 50µL de sangre periférica con anticuerpos monoclonales específicos contra PD-1 (ratón anti-PD-1 humano-PE) (BD) y una batería de anticuerpos monoclonales (ratón anti-CD3 humano-PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC, ratón anti-CD45RA humano-FITC), durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Seguido se procedió a lisar los glóbulos rojos utilizando solución de lisis (“FACS Lysing Solution”, BD) por 15 minutos. Por último, se lavaron las células y se resuspendió en 300µL de PBS para su posterior adquisición por citometría de flujo.

4.5. Medición de la expresión *ex vivo* de IL-7R α (CD127) en linfocitos TCD4 $^{+}$

Se ha demostrado que la citocina IL-7 es un factor importante en la supervivencia de los linfocitos T, especialmente en células de memoria. Sus efectos dependen de la expresión de su receptor. En este Trabajo Especial de Grado nos propusimos medir la expresión de una subunidad del receptor de la IL-7, la subunidad alfa, denominada como CD127 o IL-7R α . Esto con el objetivo principal de estudiar si la expresión del receptor está alterada en las células TCD4 $^{+}$ de los pacientes pediátricos VIH $^{+}$, y si la administración del TAAE modifica la expresión de este receptor en el tiempo. Para ello se cuantificó la expresión *ex vivo* de esta molécula CD127 en la superficie de linfocitos TCD4 $^{+}$ totales y en las subpoblaciones vírgenes y memoria, esto mediante el marcaje selectivo de esta molécula por un anticuerpo monoclonal ratón anti-CD127 humano conjugado con el fluorocromo PE (BD) y con una serie de anticuerpos (ratón anti-CD3 humano-PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC, ratón anti-CD45RO humano-FITC). Se incubó 50 μ L de sangre con estos anticuerpos durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad, se lavaron las células y se lisaron los glóbulos rojos mediante solución de lisis ("FACS Lysing Solution", BD) por 15 minutos. Por último, se realizó otro lavado y las células fueron resuspendidas en 300 μ L de PBS.

4.6. Determinación de la frecuencia *ex vivo* de apoptosis en linfocitos TCD4 $^{+}$

En las células normales la distribución de los fosfolípidos de la membrana plasmática es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como la fosfatidilserina (PS), y la externa fundamentalmente de fosfolípidos neutros. En una célula apoptótica se produce una traslocación de los restos de PS de la membrana interna a la membrana externa, exponiendo de esta manera los restos de PS al exterior. Esto ocurre en las primeras etapas de la apoptosis, en la fase de apoptosis temprana, donde se mantiene la integridad de la membrana plasmática.

La Annexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, la cual tiene una gran afinidad de unión a los restos de PS. Por lo tanto, la Annexina-V puede unirse a los restos de PS de las células apoptóticas al ser estos accesibles por estar en el exterior. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales (van Engeland y col., 1998)

Para llevar a cabo el ensayo se empleó un kit comercial de BD Biosciences., el cual nos permitió la cuantificación del porcentaje de células TCD4⁺ (totales) en sangre periférica. El kit contiene el reactivo Annexina-V asociado al fluorocromo FITC, yoduro de propidio y una solución amortiguadora (Buffer de unión) que permite que las células posean una concentración de calcio óptima que facilite la interacción entre residuos de PS con la molécula Annexina-V. El yoduro de propidio es capaz, por sí mismo de emitir fluorescencia que es detectable por el citómetro de flujo (detector para PE). Gracias a su capacidad de fijarse al ADN celular, el yoduro de propidio se emplea para identificar las células necróticas, las cuales exponen su ADN al perder integridad de la membrana plasmática. Las células apoptóticas bajo ésta metodología manifiestan un fenotipo constituido por: marcaje positivo para Annexina-V y un marcaje negativo para yoduro de propidio.

En este sentido, se incubó 50 μ L de sangre periférica sin diluir, con anticuerpos (ratón anti-CD3 humano-PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC) y reactivos Annexina-V y yoduro de propidio en buffer de unión por 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Luego se lisó dos veces los glóbulos rojos con 450 μ L de solución de lisis ("FACS Lysing Solution", BD) por 15 minutos. Por último, se procedió a lavar las células y se resuspendieron en 300 μ L de PBS para su adquisición en el citómetro.

4.7. Medición de la cantidad de linfocitos T reguladores *ex vivo*

Para conocer si la administración del Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia genera algún efecto sobre la cantidad de linfocitos Treg totales en sangre periférica, se procedió a su medición *ex vivo*. Los linfocitos Treg son células cuyo fenotipo es CD4⁺CD25^{high} (en alta densidad), además de expresar el factor de transcripción FoxP3. Sin embargo, recientemente se demostró que los linfocitos Treg expresan en una menor proporción el receptor alfa de la IL-7 (CD127) (Seddiki y col., 2006).

En este sentido, se incubó inicialmente 50µL de sangre periférica con anticuerpos monoclonales (ratón anti-CD3 humano-PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC, ratón anti-CD127 humano-PE y ratón anti-CD25 humano-FITC) por 30 minutos a 4°C y en oscuridad. Posteriormente se lisó dos veces los glóbulos rojos con solución de lisis ("FACS Lysing Solution", BD) y se resuspendió la mezcla celular en 300µL de PBS para su adquisición en el citómetro.

4.8. Purificación de linfocitos T reguladores de sangre periférica

Las Células Mononucleares de Sangre Periférica (CMSP) de niños sanos y pacientes fueron purificadas mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidad. Para llevarlo a cabo empleamos Histopaque 1077 (Sigma) para generar un gradiente de densidad que permitió el aislamiento de CMSP. La centrifugación se realizó por un tiempo de 30 minutos y a una velocidad de 500g. Como resultado se generó una capa de células, por encima de la capa de eritrocitos-granulocitos y por debajo del plasma sanguíneo, la cual contendría las CMSP. Estas fueron lavadas dos veces con PBS y contadas en el último lavado en una cámara de Neubauer en presencia de azul de tripano ("Trypan Blue") (Sigma), siendo entonces cuantificadas tomando en cuenta su viabilidad. El azul de tripano es un colorante aniónico grande del grupo de los colorantes azóicos.

Este método se basa en el principio de que las células son muy selectivas a los compuestos que pueden pasar a través de sus membranas, en una célula viable, el azul de tripano no es absorbido; sin embargo, sí atraviesa la membrana de aquellas células muertas (no viables) (Altman y col., 1993). Previamente una alícuota de 1 mL de plasma sanguíneo fue almacenada a -80°C para la posterior determinación de citocinas Th1/Th2 (Véase apartado **4.12 de materiales y métodos**).

Nosotros purificamos los linfocitos Treg naturales utilizando el fenotipo $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low}}$, con el uso de columnas con microperlas magnéticas, y anticuerpos asociados a microperlas magnéticas (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 (Miltenyi y col., 1990).

En este sentido, la purificación de linfocitos Treg se realizó en dos etapas. La primera la cual consiste en la selección negativa de células $\text{TCD4}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ y una segunda etapa de selección positiva de una fracción de células $\text{TCD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^{\text{low}}$. Para ello, a partir de las CMSP previamente purificadas, se lavaron y resuspendieron en $40\mu\text{L}$ de solución amortiguadora (PBS+5%SBF+EDTA), para luego incubar con $10\mu\text{L}$ de anticuerpos biotinilado (anti-CD8, CD19, CD123 y CD127), durante 30 minutos a 4°C . Seguido se lavaron las células y se incubaron con anticuerpos anti-biotina con microperlas magnéticas ($10\mu\text{L}$). Por último se realizó un lavado y resuspendió la mezcla celular en $500\mu\text{L}$ de solución amortiguadora para la separación por la primera columna. En esta columna se obtuvieron dos fracciones: por selección positiva CMSP con alta expresión de CD127 (F2), y por selección negativa linfocitos $\text{TCD4}^+\text{CD127}^{\text{low}}$ (F1).

La fracción F1 fue lavada y se incubaron con anticuerpos con microperlas magnéticas anti-CD25 (10 μ L) durante 30 minutos a 4°C. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en 500 μ L de buffer para la separación por la segunda columna. En este procedimiento se obtuvo por selección positiva la fracción de linfocitos Treg (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) (Treg⁺ naturales) y selección negativa de 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⁻. Para ello, 50 μ L de cada fracción se incubó con una batería de anticuerpos (ratón anti-CD3 humano-PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC, ratón anti-CD25 humano-FITC y ratón anti-CD127 humano-PE), las cuales fueron analizadas por citometría de flujo.

4.9. Cultivo de CMSP y linfocitos T reguladores

El cultivo celular nos permitió evaluar *in vitro* algunos parámetros funcionales de linfocitos TCD4⁺ en respuesta al desafío con una mezcla de antígenos y mitógenos. Como quisimos estudiar el posible papel de los linfocitos Treg en el establecimiento de la respuesta inmune *in vitro*, el cultivo se realizó bajo dos condiciones: cultivos de CMSP sin células Treg autólogas (100.000 CMSP por pozo), y cultivos de CMSP con linfocitos Treg (100.000 CMSP mas 5.000 Treg por pozo). Conociendo que los linfocitos Treg constituyen cerca del 5% del total de linfocitos T, quisimos mantener esta proporción en nuestras condiciones *in vitro*.

Por otra parte, las condiciones de estimulación en el cultivo incluyó la vacuna BCG (10 μ g/mL) (Instituto Pasteur, donado por el Hospital J.M. de los Ríos) y péptidos virales Gag (1 μ g/mL) (Sigma). Además las células en cultivo fueron estimuladas con PHA (Sigma) (5 μ g/mL en concentración final), el cual es una lectina extraíble del guisante común (*Phaseolus vulgaris*) y posee actividad mitogénica preferentemente de linfocitos T, por lo que estimula su proliferación inespecífica

(policlonal) (Chilson y Kelly-Chilson, 1989) y nos sirvió como control positivo. El control negativo se caracterizó por el cultivo de células en ausencia de estímulo. El medio de cultivo que se utilizó es de la marca comercial RPMI-1640 (Gibco), el mismo fue suplementado con: suero fetal bovino (10%) (Gibco), 1% buffer Hepes 1M (Gibco), 1% de piruvato de sodio (Sigma), 2% aminoácidos esenciales (Gibco), 1% Glutamina 200 mM (Gibco), 1% Penicilina 1×10^4 U/mL (Gibco). El cultivo se realizó por 72 horas, a 5,5% de CO₂ y a 37°C. Después de las 72 horas, se procedió a la obtención de sobrenadantes en el cultivo, y fueron almacenados a -80°C para la posterior determinación de citocinas Th1/Th2 (Véase apartado **4.12 de materiales y métodos**).

4.10. Determinación de la proliferación celular *in vitro* de linfocitos TCD4+

La determinación de la proliferación celular de linfocitos TCD4+, bajo las diferentes condiciones de estimulación se efectuó a las 72 horas de cultivo. En este sentido, el inicio de este protocolo experimental contempló una incubación de las CMSP con bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma) a una concentración final de 10µM durante 5 horas a 37°C. 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 deoxinucleótido en la síntesis de ADN (Sanders y col., 1993). La técnica implicará además el uso por 15 minutos de paraformaldehído al 4% en PBS a 4°C. Se lavaron las celular y luego por otros 15 minutos se procedió a permeabilizar las mismas con saponina al 5% en PBS con suero bovino fetal. La permeabilización permitirá el ingreso hacia el interior celular de anticuerpos monoclonales ratón anti-BrdU-FITC (conjugado con una DNasa), ratón anti-CD3 humano-PerCP y ratón anti-CD4 humano-APC. La incubación se realizó durante 30 minutos en oscuridad y a 4°C, para luego cuantificar el porcentaje de células T en el cultivo que

proliferaron en respuesta a estimulación PHA, BCG y Gag, bajo las dos condiciones previamente descritas (cultivo sin Treg y con Treg) por citometría de flujo.

4.11. Medición *in vitro* de IFN- γ intracelular de células TCD4+

Para la cuantificación de la producción intracelular de IFN- γ se procedió después de las 72 horas del cultivo de células a incubar con Brefeldina (inhibidor de la exocitosis celular) (Sigma) por 5 horas a 37°C. Luego las células fueron lavadas y recolectadas en tubos citómetros para resuspenderlas en 4% de paraformaldehído en PBS durante 15 minutos a 4°C. Se lavaron las células y seguido fueron permeabilizadas con saponina al 5% en PBS con suero bovino fetal por 15 minutos. Después fueron incubadas las células con una serie de anticuerpos (ratón anti-CD3 humano-PerCP, ratón anti-CD4 humano-APC, ratón anti-IFN- γ humano-PE). Transcurrido los 30 minutos de incubación en oscuridad y a 4°C, se procedió a lavar las células y resuspenderlas en 300 μ L de PBS para su posterior análisis por citometría de flujo.

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

A partir de plasma y sobrenadantes de cultivo de CMSP durante 72 horas (en presencia o ausencia de linfocitos Treg autólogos y bajo diferentes condiciones de estimulación antigénica), se realizó la cuantificación simultánea de varias citocinas Th1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) y Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) por la técnica de citometría de flujo, según las instrucciones de un estuche comercial ("CBA Cytometric Bead Array" de Becton Dickinson, San Diego, C.A.). El protocolo incluye la utilización de una población de 6 perlas, las cuales están unidas con anticuerpos específicos para las citocinas

antes mencionadas. Cada perla además está unida a fluorocromo que emite fluorescencia, variable de intensidad, según la citocina Th1/Th2 de reconocimiento para la cual fue diseñada. La incubación con un segundo anticuerpo, cuya fluorescencia se detectará en un canal distinto del citómetro, nos arrojó una medida de la concentración de cada citocina de la muestra. Para ello el “Kit” incluía reactivos estándares para la elaboración de curvas de calibración que permitió la realización de los cálculos.

4.13. Análisis estadístico

El análisis de los datos se llevó a cabo mediante el uso del programa SigmaStat para Windows. Se efectuó la comparación de los promedios encontrados entre el grupo de niños sanos y pacientes, como también entre cada uno de los días del tratamiento, por medio de la prueba ANOVA (Análisis de Varianza), para aquellos datos que se distribuyeron en forma normal. Para aquellos casos que no superaron la prueba de normalidad, la comparación entre grupos se llevó a cabo aplicando la prueba de Kruskal-Wallis. Las pruebas se consideraron estadísticamente significativas cuando los valores de p fueron menores a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1. Descripción del grupo de estudio

La selección de los niños, que fueron incluidos en el estudio, estuvo a cargo del servicio de Infectología del Hospital J.M. de los Ríos, el cual está dirigido por el Doctor Juan Félix García conjuntamente con las Doctoras Luigina Siciliano, María Graciela López y médicos residentes, quienes se encargaron del seguimiento clínico y del manejo de las historias de los pacientes infectados, de la prueba confirmatoria a VIH-1, de la determinación de la vía de transmisión del virus, de la administración de la triterapia y la extracción de las muestras de sangre de todos los individuos (Ver tabla 1).

Tabla1. Caracterización de niños sanos y niños VIH+ incluidos en el estudio.

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

En la tabla se especifica el grupo en el que fueron clasificados los niños, identificados por un código que mantiene la confidencialidad, así como su sexo y edad de ingreso en el estudio.

5.2. Subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica de pacientes pediátricos infectados por el VIH.

Al examinar los porcentajes y valores absolutos de las distintas subpoblaciones linfocitarias de los sujetos estudiados, encontramos que la infección por VIH en niños origina cambios drásticos en las cantidades sanguíneas de las subpoblaciones de células TCD4⁺. Por otra parte, también se encontró que la administración del Tratamiento Antirretroviral de Alta Eficiencia revierte estos cambios en esta subpoblación celular.

En la **figura 3** podemos observar los citogramas correspondientes a un experimento típico (un niño sano y un niño con VIH). En la **figura 3A** podemos observar los parámetros de dispersión, donde el eje Y representa la dispersión lateral y en el eje X la dispersión frontal, dichos parámetros fueron utilizados para la identificación de la población de linfocitos totales en sangre periférica. Seguido en la **figura 3B**, podemos observar la identificación de la subpoblación de linfocitos T mediante el marcaje con anticuerpos anti-CD3-PerCP (eje X) y el parámetro de dispersión lateral (eje Y). La identificación de la población de linfocitos TCD4⁺ se muestra en la **figura 3C**, donde el eje Y representa el marcaje con anticuerpos anti-CD4-APC y el eje X las subpoblaciones de linfocitos marcados positivamente con anticuerpos anti-CD3-PerCP. El procedimiento para la identificación de estas subpoblaciones fue similar para los demás ensayos *ex vivo* e *in vitro*. Podemos observar en estos citogramas de un experimento típico, que el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ en un niño VIH⁺ antes del TAAE (**Figura 3D**) es mucho menor en comparación a un niño sano (**Figura 3C**), sin embargo, como se ve en la **figura 3E**, el porcentaje de células aumenta a medida que avanza el tiempo de la triterapia. Por otra parte, se observa un efecto similar en el porcentaje de células TCD8⁺ totales, con la diferencia que los valores encontrados en el niño sano es menor al observado en el paciente pediátrico.

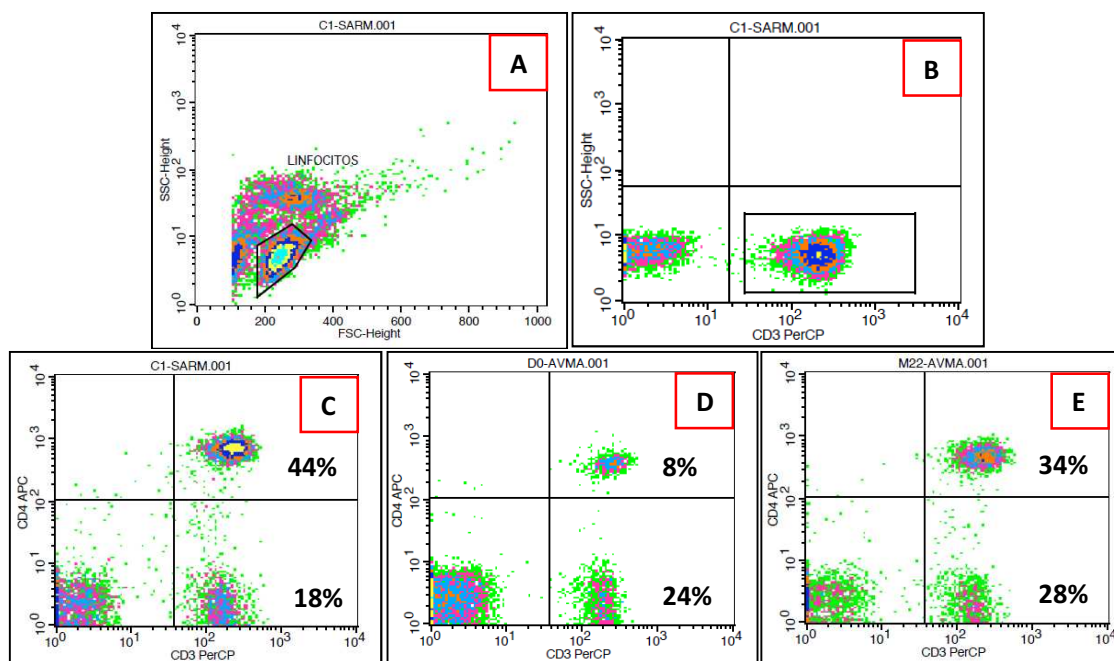


Figura 3: Citogramas para la medición de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. La determinación de las subpoblaciones linfocitarias se realizó mediante el uso de una batería de anticuerpos monoclonales (anti-CD3-perCP, anti-CD4-APC, anti-CD45RO-PE). Los porcentajes representan la cantidad de linfocitos T en sangre periférica. **(A)** Población de linfocitos totales, **(B)** subpoblación de linfocitos T, **(C)** Subpoblación de linfocitos TCD4⁺ totales de un niño sano, **(D)** Subpoblación de linfocitos TCD4⁺ totales de un niño VIH⁺ antes del TAAE y **(E)** Subpoblación de linfocitos TCD4⁺ totales de un niño VIH⁺ durante 22 meses del TAAE.

En la **figura 4A** se muestran los valores promedios de las cantidades de linfocitos T provenientes de los niños sanos y pacientes durante cada mes de tratamiento, donde se puede observar como los pacientes pediátricos presentan una disminución de los porcentajes de células TCD4⁺ totales antes de la administración del TAAE, sin embargo, estos valores aumentan a medida que avanza el tiempo, observándose diferencias estadísticamente significativas en los meses 10, 14 y 22. En detalle, los porcentajes de linfocitos TCD4⁺ totales fueron (promedio \pm desviación estándar): **grupo control**= 46,83 \pm 12,21, **pacientes pediátricos VIH⁺ antes del tratamiento (D0)**= 9,20 \pm 4,32 ($p < 0,05$ vs grupo control); durante el **mes 2**= 22,67 \pm 8,02; **mes 6**= 19,60 \pm 11,65; **mes**

10= $33,00 \pm 6,16$ ($p < 0,05$ vs D0), **mes 14=** $31,33 \pm 4,04$ ($p < 0,05$ vs D0) y en el **mes 22** de tratamiento= $28,75 \pm 11,79$ ($p < 0,05$ vs D0). Aunque los valores en los meses 10, 16 y 22 siguen siendo menores a lo observado en niños sanos, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes y el grupo control. De igual manera se observa un aumento en los valores absolutos de células TCD4⁺ (**Figura 4B**) en estos pacientes infectados. Los valores (células/ μ L de sangre) obtenidos fueron: **grupo control=** $2104,67 \pm 1314,68$; pacientes pediátricos VIH⁺ antes del tratamiento (**D0**)= $441,80 \pm 346,43$ ($p < 0,05$ vs grupo control); en el **mes 2=** $1762,67 \pm 401,28$; **mes 6=** $1380,80 \pm 1398,88$; **mes 10=** $1911,75 \pm 845,74$ ($p < 0,05$ vs D0); **mes 14=** $1526,67 \pm 117,74$ ($p < 0,05$ vs D0) y **mes 22=** $1729,33 \pm 892,11$ ($p < 0,05$ vs D0).

En cuanto a la subpoblación de células vírgenes (CD4CD45RA⁺) (**Figura 4C**) pudimos encontrar que la misma se encuentra disminuida con respecto a los niños sanos ($p < 0,05$), no obstante, a partir del mes 2 tiende a aumentar, encontrándose diferencias estadísticas con respecto al día 0 a partir del mes 14, sin embargo, no alcanza niveles similares a los niños sanos. Por otra parte, al examinar los valores absolutos (**Figura 4D**), vemos que hay una reducción importante de estos en los pacientes pediátricos antes del tratamiento ($p < 0,05$), y aumenta en el mes 2 ($p < 0,05$ vs Día 0) manteniéndose en valores similares durante el tiempo de estudio.

Con respecto a la subpoblación de células memoria (CD4CD45RO⁺) (**Figura 4C**), pudimos observar un menor porcentaje de estas en comparación a los niños sanos (sin diferencias estadísticas significativas), y tiende a aumentar a medida que avanza el tiempo del TAAE, alcanzándose diferencias en el mes 22 con respecto el día 0 y a los niños sanos. Analizando los valores absolutos (**Figura 4D**), se observa una tendencia similar: una menor cantidad de estas células en los pacientes VIH⁺ ($p < 0,05$ vs Control), y aumenta a medida que avanza el tratamiento

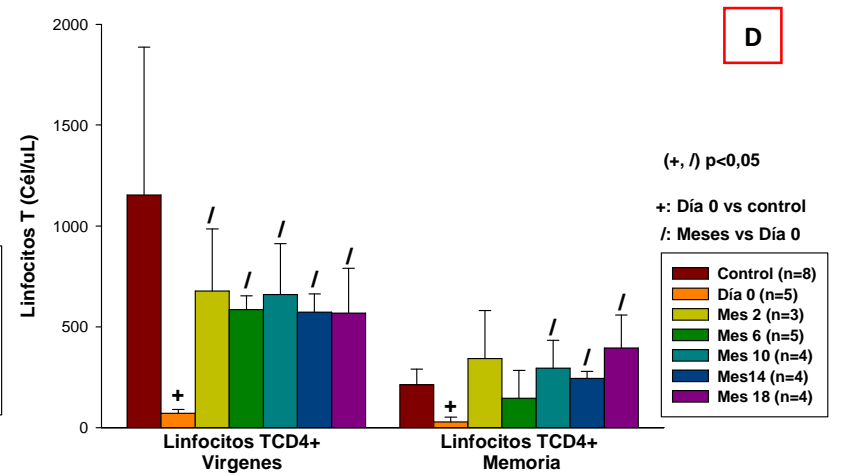
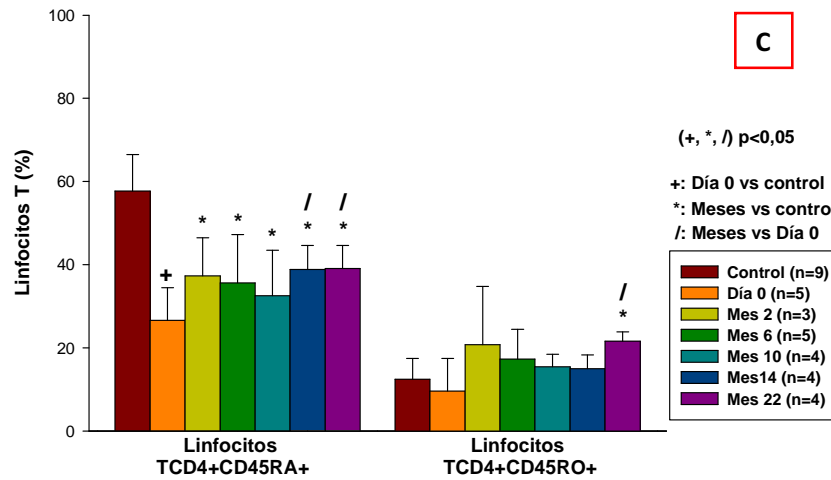
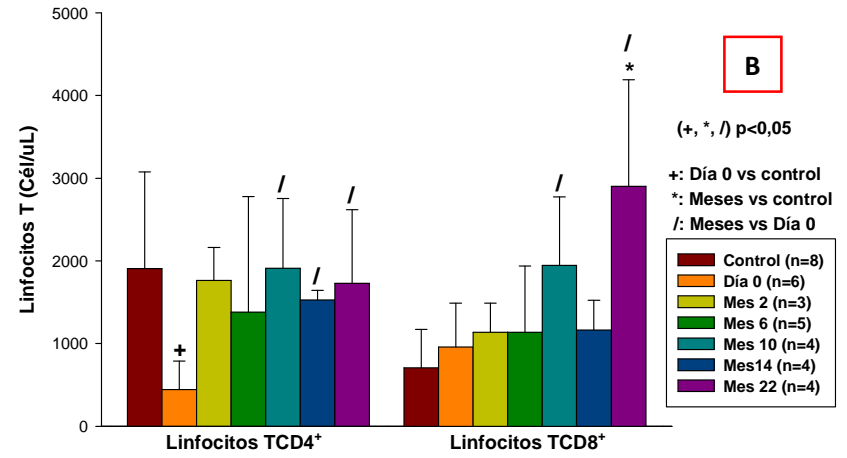
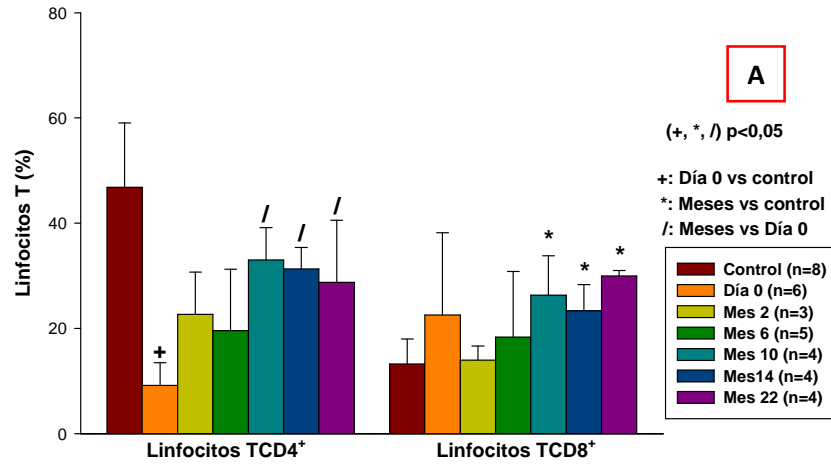
alcanzando valores similares a los niños sanos, con diferencias estadísticamente significativas con respecto al día 0 a partir del mes 10.

Asimismo, se cuantificaron las concentraciones sanguíneas de las subpoblaciones de linfocitos TCD8⁺ totales, vírgenes y memoria, con la finalidad de estudiar los cambios que experimentan estas importantes células en la infección por VIH en niños, ampliando nuestro estudio. En la **figura 4A**, se muestran los resultados obtenidos en porcentajes de linfocitos TCD8⁺ totales, donde se observa un incremento de estas células en los pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante el tratamiento con respecto a los niños sanos, y con diferencias estadísticamente significativas en los meses 10, 14 y 22 ($p < 0,05$ vs Control). Los resultados fueron: **grupo control**= $13,25 \pm 4,77$, pacientes pediátricos VIH⁺ **antes del tratamiento** (D0)= $22,60 \pm 15,58$; durante el **mes 2**= $14,00 \pm 2,65$; **mes 6**= $18,40 \pm 12,42$; **mes 10**= $26,33 \pm 7,51$ ($p < 0,05$ vs grupo control), **mes 14**= $23,33 \pm 5,03$ ($p < 0,05$ vs grupo control) y en el **mes 22** de tratamiento= $30,00 \pm 1,00$ ($p < 0,05$ vs grupo control). En cuanto a los valores absolutos (**figura 4B**), encontramos que el número de células TCD8⁺ en sangre periférica es mayor en los pacientes VIH⁺ con respecto al grupo control ($957,40 \pm 533,20$ vs $705,79 \pm 464,61$) (sin diferencias estadísticamente significativas), asimismo, aumenta estos valores con el tiempo, encontrándose al analizar estadísticamente, diferencias significativas en los meses 14 y 22 con respecto al grupo control y al día 0.

En cuanto a la subpoblación de células TCD8⁺ vírgenes (CD8CD45RA⁺) (**Figura 4E**) se encontraron valores similares entre los niños sanos y los pacientes pediátricos VIH⁺ antes del TAAE, y tiende a aumentar con el tiempo, alcanzando diferencias en el mes 22 con respecto al grupo control ($p < 0,05$). Asimismo, cuando analizamos los valores absolutos (**Figura 4F**), encontramos un comportamiento muy parecido al antes descrito, con valores similares entre los niños sanos y los

pacientes pediátricos antes del tratamiento, y con tendencia a aumentar a medida que avanza el tiempo del TAAE, encontrándose diferencias en el mes 22 con respecto a los niños sanos

En la subpoblación memoria (CD8CD45RO⁺) (**Figura 4E**), se evidenció un mayor porcentaje de estas en niños VIH⁺ antes de la triterapia con respecto a lo encontrado en niños sanos ($p < 0,05$), sin embargo no se encontró diferencias significativas con respecto al día 0 y al grupo control. Por último, analizando los valores absolutos (**Figura 4F**) encontramos que se encuentran incrementados en los pacientes antes del TAAE ($p < 0,05$ vs Día 0), sin embargo, se mantuvo en niveles similares durante los demás meses del estudio ($p < 0,05$ vs Día 0).



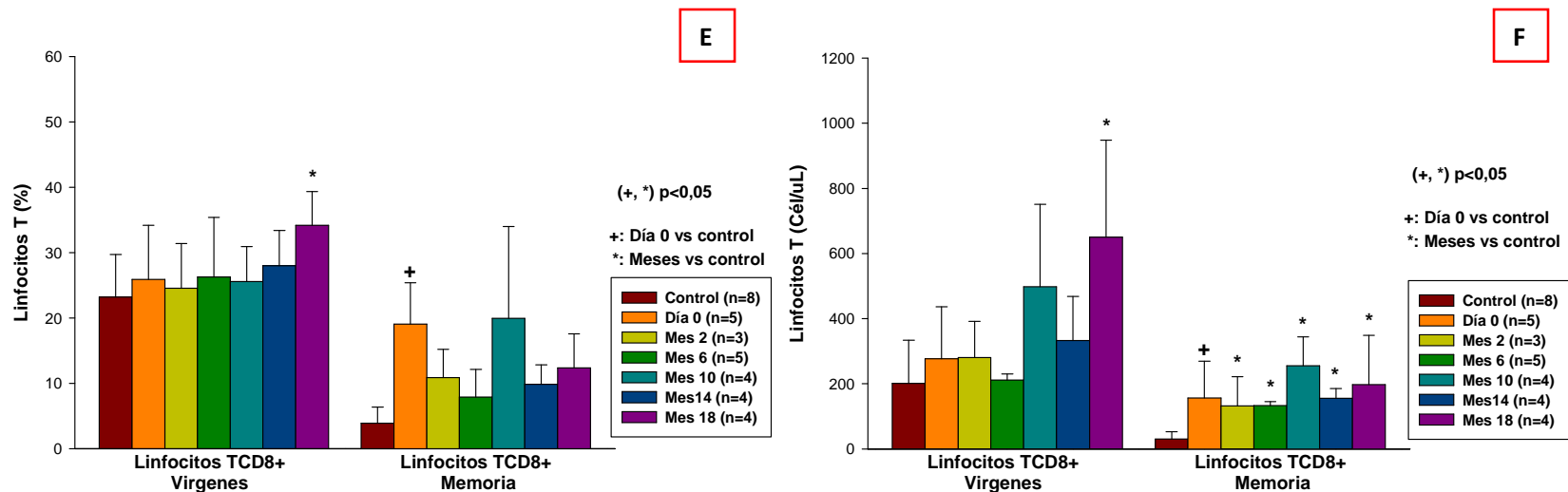


Figura 4: Medición de subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica. En la figura se describe como cambian las subpoblaciones linfocitarias antes y durante 22 meses de la administración del TAAE en niños con VIH. **(A)** Porcentaje de células TCD4⁺ y TCD8⁺ totales, **(B)** Valores absolutos de células TCD4⁺ y TCD8⁺ totales, **(C)** porcentaje de células TCD4⁺CD45RA⁺ y TCD4⁺CD45RO⁺, **(D)** valores absolutos de células TCD4⁺CD45RA⁺ y TCD4⁺CD45RO⁺, **(E)** porcentaje de células TCD8⁺CD45RA⁺ y TCD8⁺CD45RO⁺, **(F)** valores absolutos de células TCD8⁺CD45RA⁺ y TCD8⁺CD45RO⁺. Estos valores se determinaron a partir de 50 μ L de sangre periférica de pacientes pediátricos y de niños sanos, a través del uso de anticuerpos monoclonales (anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD8-APC, anti-CD45RA-FITC y anti-CD45RO-PE). La adquisición de los eventos fue de 20.000 eventos empleando el citómetro de flujo de cuatro detectores (FACScalibur). Las barras representan los resultados expresados como promedio \pm desviación estándar. Las diferencias de los promedios fueron analizados estadísticamente mediante la prueba ANOVA para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos.

5.3. Carga viral en los pacientes pediátricos VIH+.

La determinación de la carga viral de todos los pacientes incluidos en el estudio se realizó en el Instituto Nacional de Higiene, cuyos datos fueron suministrados al Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital J.M. de los Ríos. En nuestro estudio encontramos que los pacientes antes del tratamiento presentaron una carga viral con valores hasta 5 órdenes de magnitud (<500.000 copias/mL de plasma), sin embargo, a medida que avanzó el tratamiento, se observó una disminución en la carga viral, alcanzando valores por debajo del rango de detección (>50 copias/mL de plasma) ($p<0,05$).

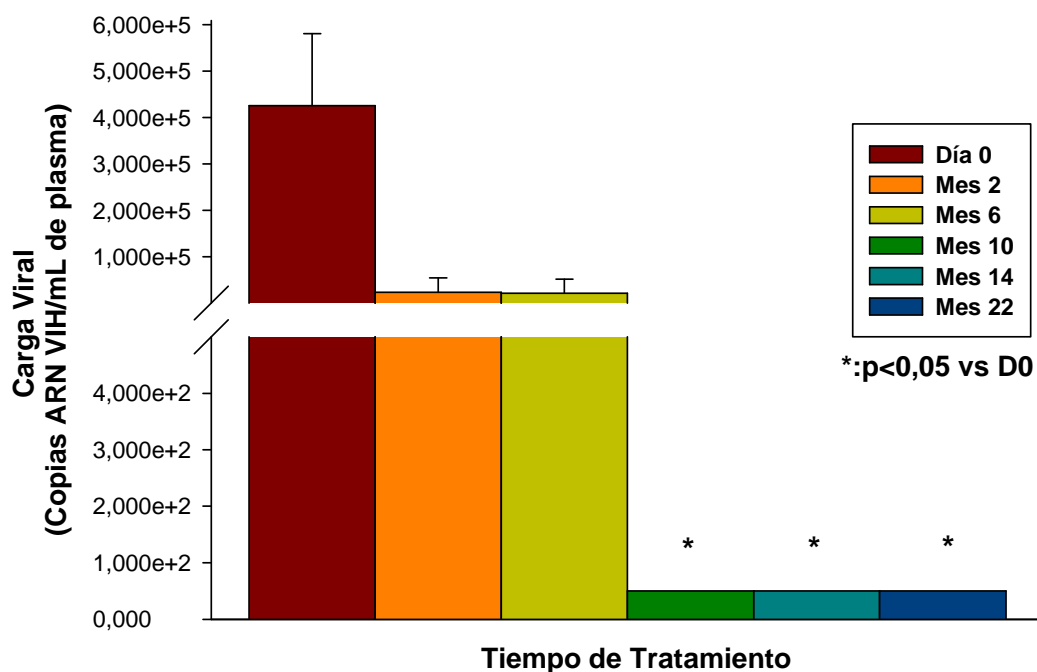


Figura 5: Carga viral de los pacientes pediátricos VIH+. Se determinó y se representaron gráficamente los valores que presentaron los pacientes al momento en que fueron incluidos en nuestro estudio y durante el tratamiento. Dichos valores se expresaron en la unidad: copias/ml de plasma. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método ANOVA.

5.4. Expresión *ex vivo* del receptor de muerte celular Fas (CD95) en linfocitos TCD4⁺ de niños VIH⁺ y niños sanos.

Se conoce que la expresión del receptor de muerte celular denominado Fas o CD95 cuando se une a su ligando (Fas-L) es capaz de inducir la muerte celular por apoptosis. Este proceso está exacerbado en la infección por VIH y es debido a los efectos citopáticos directos o indirectos del virus sobre los linfocitos TCD4⁺ (Westendorp y col., 1995 y Hosaka y col., 1998).

El estudio mediante ensayos *ex vivo* de la expresión de este receptor en la superficie de los linfocitos TCD4⁺, nos permitió obtener los siguientes resultados: En la **figura 6** podemos observar los histogramas correspondientes a un experimento típico (un niño sano y de un paciente antes y después de 22 meses del TAAE). Podemos observar que antes del tratamiento hay una alta expresión de Fas (10,8%) en las células TCD4⁺ totales de este niño infectado por el VIH (**Figura 6B**) cuando lo comparamos con un niño sano (2,6%) (**Figura 6A**), sin embargo, a medida que avanza el tiempo de la administración del tratamiento y se alcanza los 22 meses, hay una disminución importante en la expresión *ex vivo* de este receptor (**Figura 6C**), alcanzando un valor incluso por debajo de lo observado en un niño sano (1,8%). Los resultados obtenidos por citometría de flujo se procedieron a representarlos en la gráfica de barras como se muestra en la **figura 7**.

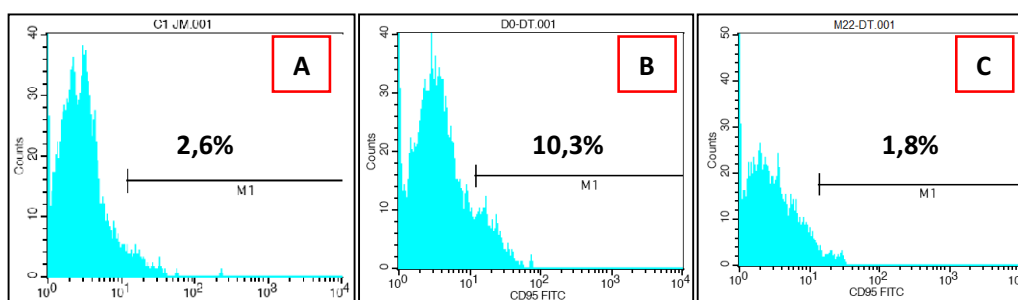


Figura 6: Determinación de la expresión *ex vivo* de Fas (CD95) en linfocitos TCD4⁺. Determinación de la expresión de Fas en un experimento típico. La determinación de la expresión de Fas se realizó a través del marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD95-FITC y anti-CD45RO-PE. Los porcentajes representan las células que expresan en su superficie el receptor. **(A)** Expresión de Fas en linfocitos TCD4⁺ totales de niño sano. **(B)** Expresión de Fas en linfocitos TCD4⁺ de niño VIH⁺ antes de la administración del tratamiento. **(C)** Expresión de Fas en linfocitos TCD4⁺ de niño VIH⁺ durante 22 meses de tratamiento.

En la **figura 7**, se observa el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ (totales, virgen y memoria) que expresaron el receptor de muerte celular Fas en ambos grupos de estudio (pacientes y niños sanos). Encontramos que los pacientes antes de comenzar el tratamiento, expresaron en los linfocitos TCD4⁺ totales un mayor porcentaje de Fas con respecto a los niños sanos ($p < 0,05$), sin embargo, a medida que avanza el tiempo del tratamiento, se destaca una disminución en la expresión de este receptor, con diferencias en los meses 10, 14 y 22 ($p < 0,05$), alcanzando valores similares a los niños sanos. Al contrario, en la población de células vírgenes (CD4⁺CD45RA⁺) no se observó diferencias significativas, sin embargo, la expresión de CD95 es mayor en los niños antes del tratamiento con respecto a los niños sanos y a medida que avanza el tiempo de tratamiento, se observa un comportamiento similar al antes descrito. Por último, la población memoria (CD4⁺CD45RO⁺) de los niños infectados por el VIH expresan el receptor Fas a niveles similares a las células de niños sanos y en un mayor porcentaje en comparación a la subpoblación virgen; pero observamos que existe una tendencia muy marcada en disminuir la expresión de este receptor a medida que avanza el tiempo de la administración del TAAE, alcanzando diferencias significativas a partir del mes 10 del tratamiento con respecto al grupo control y a los pacientes antes del tratamiento.

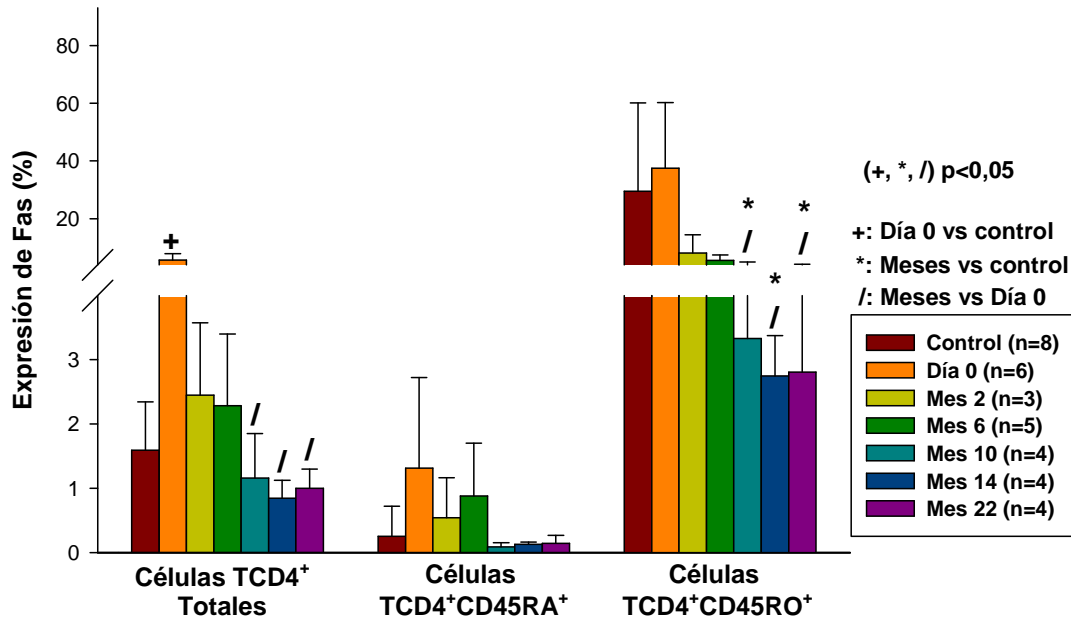


Figura 7: Medición de la expresión *ex vivo* de Fas (CD95) en linfocitos TCD4⁺. Se determinaron los porcentajes de células marcadas positivamente al receptor de muerte celular CD95 en linfocitos TCD4⁺ totales, vírgenes y memoria. Esto se realizó a partir de 50 μ L de sangre periférica de pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante 22 meses de la administración del TAAE. Los linfocitos TCD4⁺ totales, virgen y memoria que expresan el receptor CD95 fueron marcados con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD45RO-PE y anti-Fas-FITC. Los análisis se realizaron por citometría de flujo con adquisición de 20.000 eventos. Los resultados se representan en barras que expresan el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos.

5.5. Expresión *ex vivo* de la molécula PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4⁺ de niños VIH⁺ y niños sanos.

La molécula PD-1 es un miembro de la familia CD28 y es expresado induciblemente en linfocitos T después de su activación y se ha demostrado como un importante regulador negativo de la respuesta inmune, inhibiendo funciones efectoras de linfocitos T e induciendo apoptosis en estas células (Latchman y col., 2001). Se ha observado una sobreexpresión de la misma en linfocitos TCD8⁺ de pacientes infectados con el VIH (Day y col., 2006), sin embargo, poco se conoce sobre su

papel en linfocitos TCD4⁺, por lo que quisimos medir la expresión del receptor en la superficie de estas células.

En la **figura 8**, se muestran los histogramas de un experimento típico para la determinación de la expresión *ex vivo* del receptor PD-1. Como se observa en la **figura 8B** la expresión *ex vivo* de este receptor en los linfocitos TCD4⁺ totales de un niño VIH⁺ antes de comenzar el tratamiento (9,09%) es mayor a lo encontrado en un niño sano (1,46%) (**Figura 8A**). Sin embargo, en el mes 22 de tratamiento, se pudo contabilizar un menor porcentaje de este receptor (3,78%) (**Figura 8C**). Los resultados obtenidos por citometría de flujo fueron analizados y representados en la gráfica de barras como se muestra en la **figura 9**.

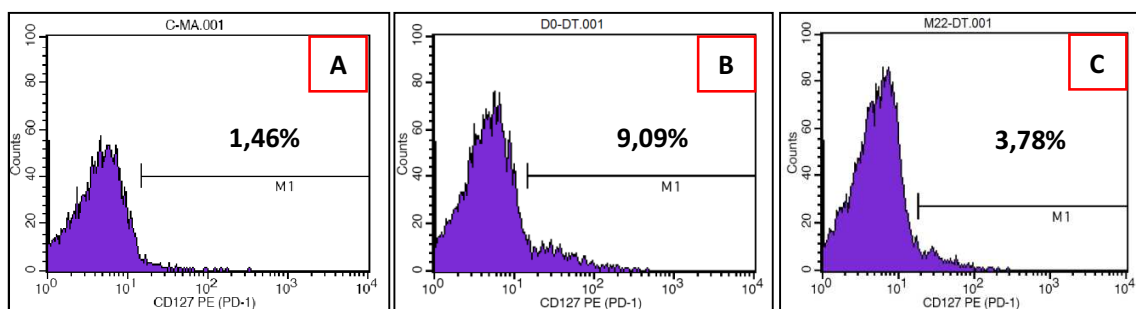


Figura 8: Determinación de la expresión *ex vivo* de PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4⁺. Determinación de la expresión de PD-1 en un experimento típico. La determinación de la expresión de PD-1 se realizó a través del marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD45RA-FITC y anti-PD-1-PE. Los porcentajes representan las células que presentan en su superficie el receptor. **(A)** Expresión de PD-1 en linfocitos TCD4⁺ totales de un niño sano. **(B)** Expresión de PD-1 en linfocitos TCD4⁺ de un niño infectado por el VIH antes de la administración del TAAE. **(C)** Expresión de PD-1 en linfocitos TCD4⁺ de un niño infectado por el VIH durante 22 meses de la administración del TAAE.

En la **figura 9** se muestran los porcentajes en la expresión de PD-1 en los linfocitos TCD4⁺ totales, como también en las subpoblaciones vírgenes (TCD4⁺CD45RA⁺) y memoria (TCD4⁺CD45RO⁺). Encontramos que en aquellos niños infectados con el VIH antes del tratamiento (día 0), hubo una mayor expresión de PD-1 en linfocitos TCD4⁺ totales cuando se compara con niños sanos ($p < 0,05$). La expresión de este receptor se mantiene a densidades elevadas durante los

meses 2 y 6, sin embargo, tiende a disminuir a medida que avanza el tiempo de la administración del tratamiento hasta alcanzar el mes 22, donde no se observan diferencias significativas con respecto a los niños sanos. Asimismo, se observó un comportamiento similar a antes mencionado en las células vírgenes de estos pacientes; siendo la expresión de este receptor mucho mayor en los pacientes antes del tratamiento que lo encontrado en niños sanos ($p < 0,05$), pero disminuye su densidad a medida que avanza el tiempo del TAAE. Por último, en la subpoblación memoria podemos observar que la expresión de PD-1 es similar entre los pacientes (antes del tratamiento) y los niños sanos, sin embargo, en el mes 22 se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión *ex vivo* del receptor con respecto al día 0 del estudio

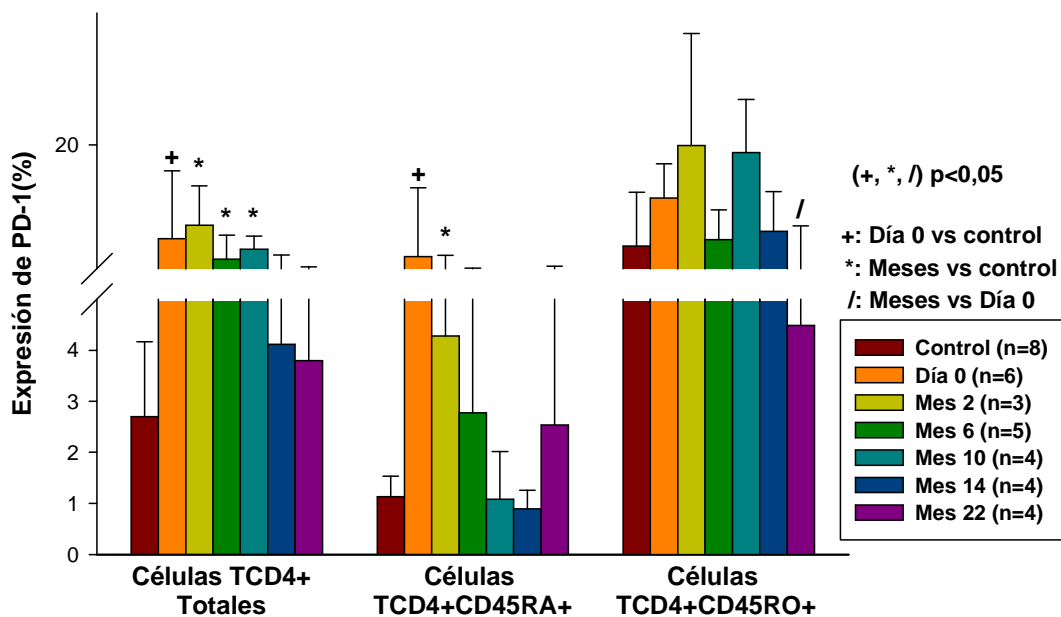


Figura 9: Medición de la expresión *ex vivo* de PD-1 (CD279) en linfocitos TCD4⁺. Se determinaron los porcentajes de linfocitos TCD4⁺ totales, vírgen y memoria, que expresaron positivamente al receptor PD-1. Esto se realizó a partir de 50 μ L de sangre periférica de niños sanos y pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante 22 meses de la administración del TAAE. Estas células fueron marcadas utilizando anticuerpos monoclonales (anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD45RA-FITC y anti-PD-1-PE). Los análisis se realizaron por citometría de flujo con adquisición de 20.000 eventos. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos.

5.6. Expresión *ex vivo* de la molécula CD127 (IL-7R α) en linfocitos TCD4⁺ de niños VIH⁺ y niños sanos.

El estudio del receptor CD127 en estos últimos años ha tenido un gran auge. Esto debido a que se ha podido demostrar que juega un papel importante en la sobrevivencia de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ (Bradley y col., 2005; Fry y Mackall, 2005; Zhang y col., 2009). El objetivo de estudiar este receptor en nuestro grupo fue el de dilucidar la manera en que la infección por el VIH afecta su expresión *ex vivo*, como también si la administración del TAAE en estos pacientes induce cambios en su expresión.

En la **figura 10** se muestran los histogramas correspondientes a un experimento típico para la determinación de la expresión *ex vivo* de CD127. Se observa como la expresión *ex vivo* de este receptor es menor en el niño infectado por el virus (82%) (**Figura 10A**), cuando lo comparamos con un niño sano (96%) (**Figura 10B**), sin embargo, a medida que avanza el tiempo de la administración hasta alcanzar los 22 meses, la densidad de esta molécula aumenta hasta alcanzar un valor similar a los niños sanos (93%) (**Figura 10C**). Los resultados obtenidos por citometría de flujo se procedieron a representarlos en la gráfica de barras como se muestra en la **figura 11**.

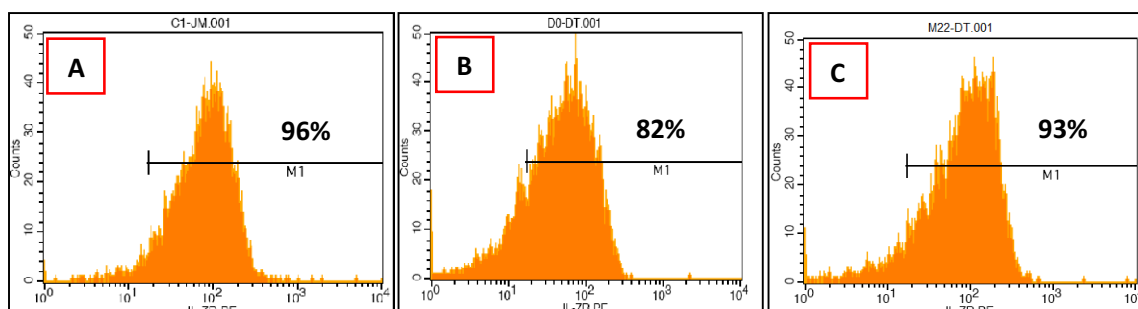


Figura 10: Determinación de la expresión *ex vivo* de CD127 (IL-7R α) en linfocitos TCD4⁺. Determinación de la expresión de CD127 en un experimento típico. La determinación de la expresión de PD-1 se realizó a través del marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-IL-7-PE y anti-CD45RO-FITC. Los porcentajes representan las células que presentan en su superficie el receptor. **(A)** Expresión de CD127 en linfocitos TCD4⁺ de un niño sano. **(B)** Expresión de CD127 en linfocitos TCD4⁺ de un

niño infectado por el VIH antes de la administración del TAAE. **(C)** Expresión de CD127 en linfocitos TCD4⁺ de un niño infectado por el VIH durante 22 meses de la administración del TAAE.

En la **figura 11** se muestran los resultados de la expresión *ex vivo* del receptor CD127 en los linfocitos TCD4⁺ totales, como también en las subpoblaciones vírgenes (TCD4⁺CD45RA⁺) y memoria (TCD4⁺CD45RO⁺). Estos resultados indican que los niños VIH⁺ tienen valores porcentuales de expresión de CD127 en sus células totales más bajos que el grupo control ($p < 0,05$). Sin embargo, a medida que avanza el tiempo de tratamiento, se observa una tendencia de aumento en la expresión de este receptor, alcanzando valores similares al grupo control a partir del mes 6. Al evaluar la expresión de CD127 en la subpoblación de células TCD4⁺ vírgenes, observamos también una disminución de este receptor con respecto al grupo control antes de comenzar el tratamiento ($p < 0,05$), sin embargo, se observa la misma tendencia de aumentar la expresión a medida que avanza el tiempo del TAAE. Finalmente, al examinar la expresión de CD127 en la subpoblación de linfocitos TCD4⁺ memoria, se observó de nuevo la misma tendencia que en los casos anteriores: una menor expresión de este receptor en niños VIH⁺ antes del TAAE ($p < 0,05$), pero aumenta a medida que avanza el tratamiento. A diferencia que en los casos anteriores, al segundo mes de tratamiento no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control, indicando que posiblemente, a partir del segundo mes, la expresión de este receptor en esta subpoblación celular de estos pacientes pediátricos se normaliza con respecto a los niños sanos.

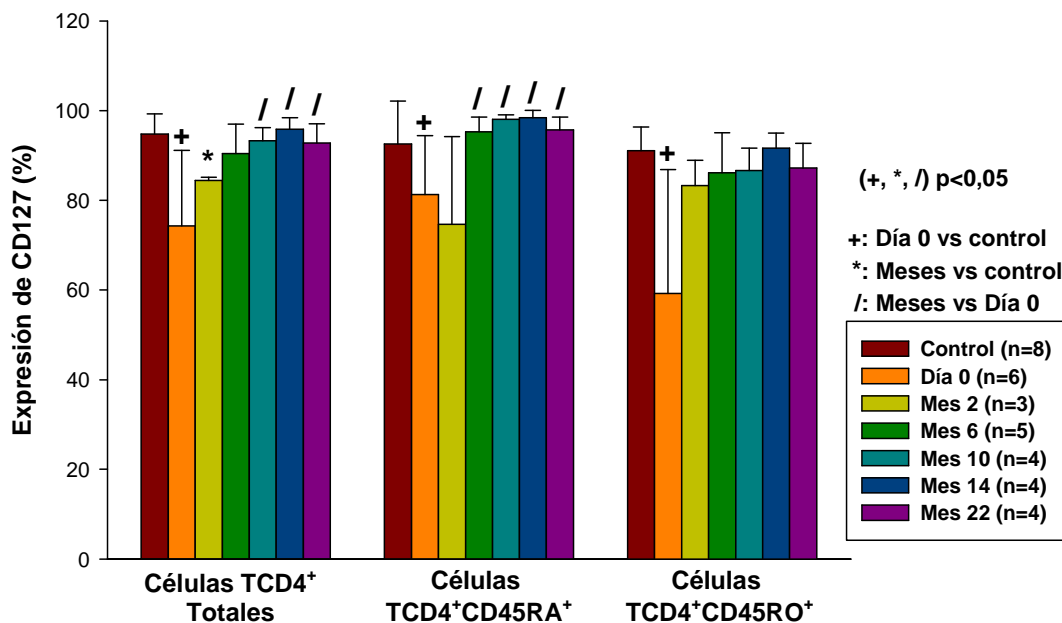


Figura 11: Medición de la expresión *ex vivo* de CD127 (IL-7R α) en linfocitos TCD4⁺. Se determinaron los porcentajes de células marcadas positivamente al receptor CD127 totales, vírgenes y memoria. Esto se realizó a partir de 50 μ L de sangre periférica de niños sanos y pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante 22 meses de la administración del TAAE. Los linfocitos TCD4⁺ totales, virgen y memoria que expresan el receptor CD127 fueron marcados con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-IL-7-PE y anti-CD45RO-FITC. Los análisis se realizaron por citometría de flujo con adquisición de 20.000 eventos. Los resultados se representan en barras que expresan el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos.

5.7. Frecuencia de apoptosis *ex vivo* en linfocitos TCD4⁺ de niños VIH⁺ y niños sanos.

La alta incidencia de apoptosis que ocurre en los linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺, es una de las características principales en la inmunopatología causada por la infección por VIH (Badley y col., 1998). En este trabajo quisimos estudiar mediante ensayos *ex vivo*, la frecuencia de apoptosis en linfocitos TCD4⁺ totales de niños sanos y niños infectados por el VIH antes y durante 22 meses de la administración del TAAE.

En la **figura 12** se observan los resultados de los citogramas de un experimento típico para la determinación de la frecuencia de apoptosis *ex vivo*. Podemos destacar que hay un mayor porcentaje de apoptosis en las células TCD4⁺ de un niño infectado por el VIH (6,2%) (**Figura 12B**), cuando se compara con un niño sano (0,81%) (**Figura 12A**); sin embargo, a medida que aumenta el tiempo en la administración del TAAE, existe una disminución en la frecuencia de apoptosis alcanzando un valor similar a un niño sano (0,88%) (**Figura 12C**). Los resultados obtenidos por citometría de flujo se procedieron a representarlos en la gráfica de barras como se muestra en la **figura 13**.

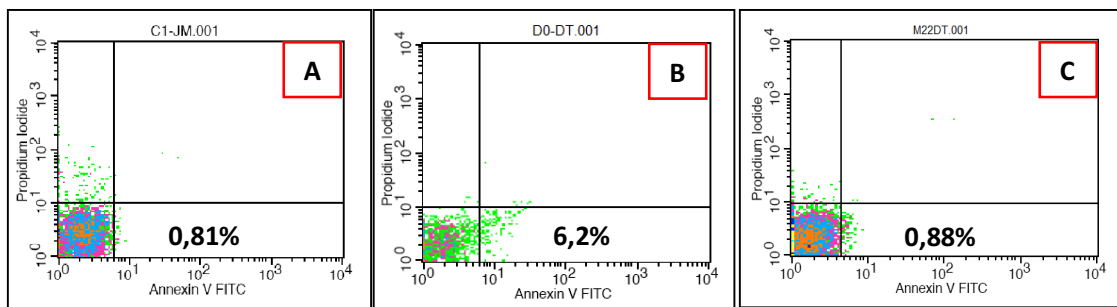


Figura 12: Determinación de la frecuencia de apoptosis *ex vivo* en linfocitos TCD4⁺. Determinación de apoptosis en un experimento típico. La determinación de la expresión de apoptosis se realizó a través del marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, y reactivos ioduro de propidio y Anexina-V-FITC. Los porcentajes representan las células en apoptosis. **(A)** Células TCD4⁺ en apoptosis de un niño sano. **(B)** Células en apoptosis de un niño infectado por el VIH antes de la administración del TAAE. **(C)** Células en apoptosis de un niño infectado por el VIH durante 22 meses de la administración del TAAE.

En la **figura 13**, se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la frecuencia de apoptosis en linfocitos TCD4⁺ totales de niños infectados por el VIH bajo administración del TAAE. Podemos destacar como la frecuencia de apoptosis es mayor en niños infectados por el VIH antes de comenzar la administración del TAAE con respecto al grupo de niños sanos ($p < 0,05$), sin

embargo, ya en el segundo mes del tratamiento, los niveles de apoptosis en estas células alcanzan valores similares al grupo control.

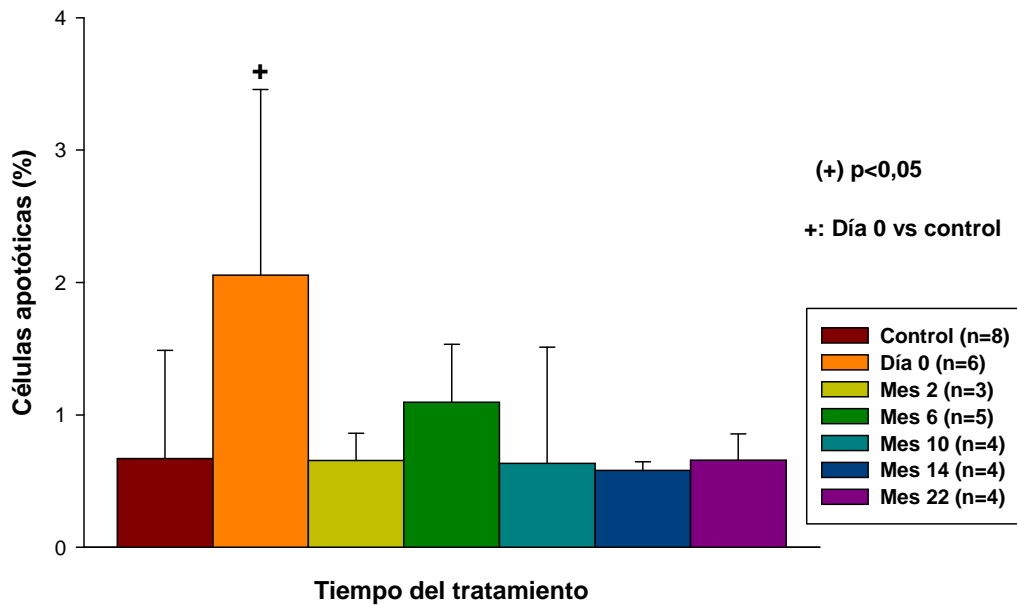


Figura 13: Medición de la frecuencia de apoptosis *ex vivo* en linfocitos TCD4⁺. Se determinó la frecuencia de apoptosis en linfocitos TCD4⁺, a partir de 50 μ L de sangre periférica de niños sanos y pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante 22 meses de la administración del TAAE. Estas células apoptóticas fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC y reactivos Annexina-V-FITC e Ioduro de propidio. Los análisis se realizaron por citometría de flujo con adquisición de 20.000 eventos. Los resultados se representan en barras que expresan el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA.

5.8. Determinación de la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica de niños infectados por el VIH y niños sanos

Los linfocitos Treg son las principales células involucradas en la regulación de la respuesta inmune y se ha asociado a la deficiencia en la cantidad como en la funcionalidad de estas células con la aparición de enfermedades autoinmunes tanto en ratones como en humanos (Sakaguchi y col., 2008). Los estudios realizados sobre estas células en la inmunopatología del VIH han arrojado

diferentes resultados contradictorios, y pocos son los estudios que se han realizado en niños infectados por este virus. Es por ello que nosotros quisimos estudiar la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica de niños sanos y niños infectados antes y durante 22 meses de administración del TAAE.

En la **figura 14** se observan los citogramas de un experimento típico para la determinación de la cantidad de linfocitos Treg en sangre periférica de niños sanos e infectados por el VIH durante 22 meses de tratamiento. Como se describe en la metodología (véase apartado Materiales y Métodos 4.7), la determinación de los linfocitos Treg se realizó mediante la discriminación fenotípica $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$, y se encontró que este paciente pediátrico tenía una mayor cantidad de estas células en sangre periférica (7,77%) (**Figura 14B**) en comparación al niño sano (2,03%) (**Figura 14A**), sin embargo, a medida que avanza el tratamiento, podemos destacar que en sangre periférica de este paciente hay una menor cantidad porcentual (5,24%) de estos linfocitos en sangre periférica (**Figura 14C**).

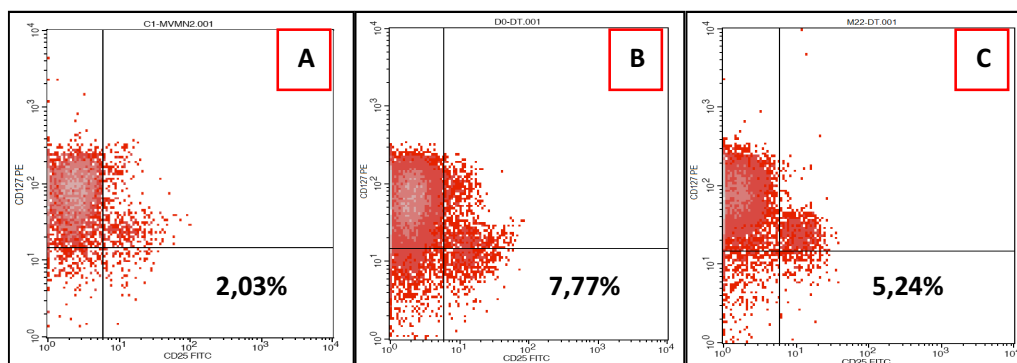


Figura 14: Determinación de la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica de niños sanos y niños infectados por el VIH. Determinación de la cantidad de linfocitos T reguladores en dos experimentos típicos. La determinación de la cantidad de linfocitos T reguladores se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD25-FITC y anti-CD127-PE. La subpoblación de linfocitos T reguladores corresponde aquella cuyo fenotipo sea $CD4^+CD25^{high}CD127^{low}$. Los porcentajes representan la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica. **(A)** Linfocitos T reguladores en un niño sano. **(B)** Linfocitos T reguladores en un niño infectado por el VIH antes de la administración del TAAE. **(C)** Linfocitos T reguladores en un niño infectado por el VIH durante 22 meses de la administración del TAAE.

En la **figura 15** se muestran los resultados obtenidos para la determinación de la cantidad de linfocitos Treg en sangre periférica de niños sanos y niños infectados por el VIH durante 22 meses de tratamiento. Podemos observar que, aunque no se encuentran diferencias estadísticamente significativas, se observa una mayor cantidad de linfocitos Treg en niños VIH+ antes del TAAE cuando lo comparamos con niños sanos, sin embargo, estas tienden a disminuir en sangre periférica a medida que avanza el tiempo del tratamiento.

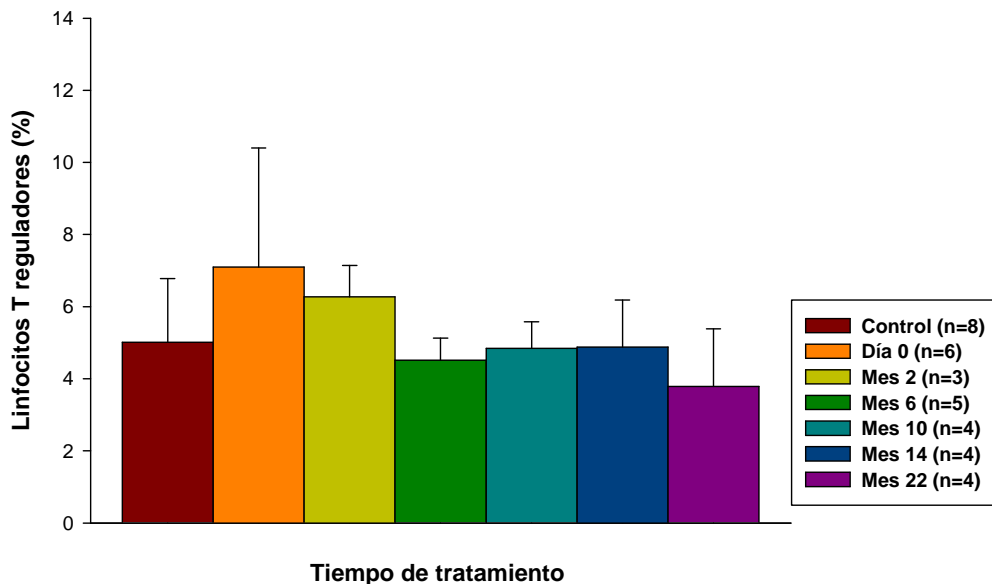


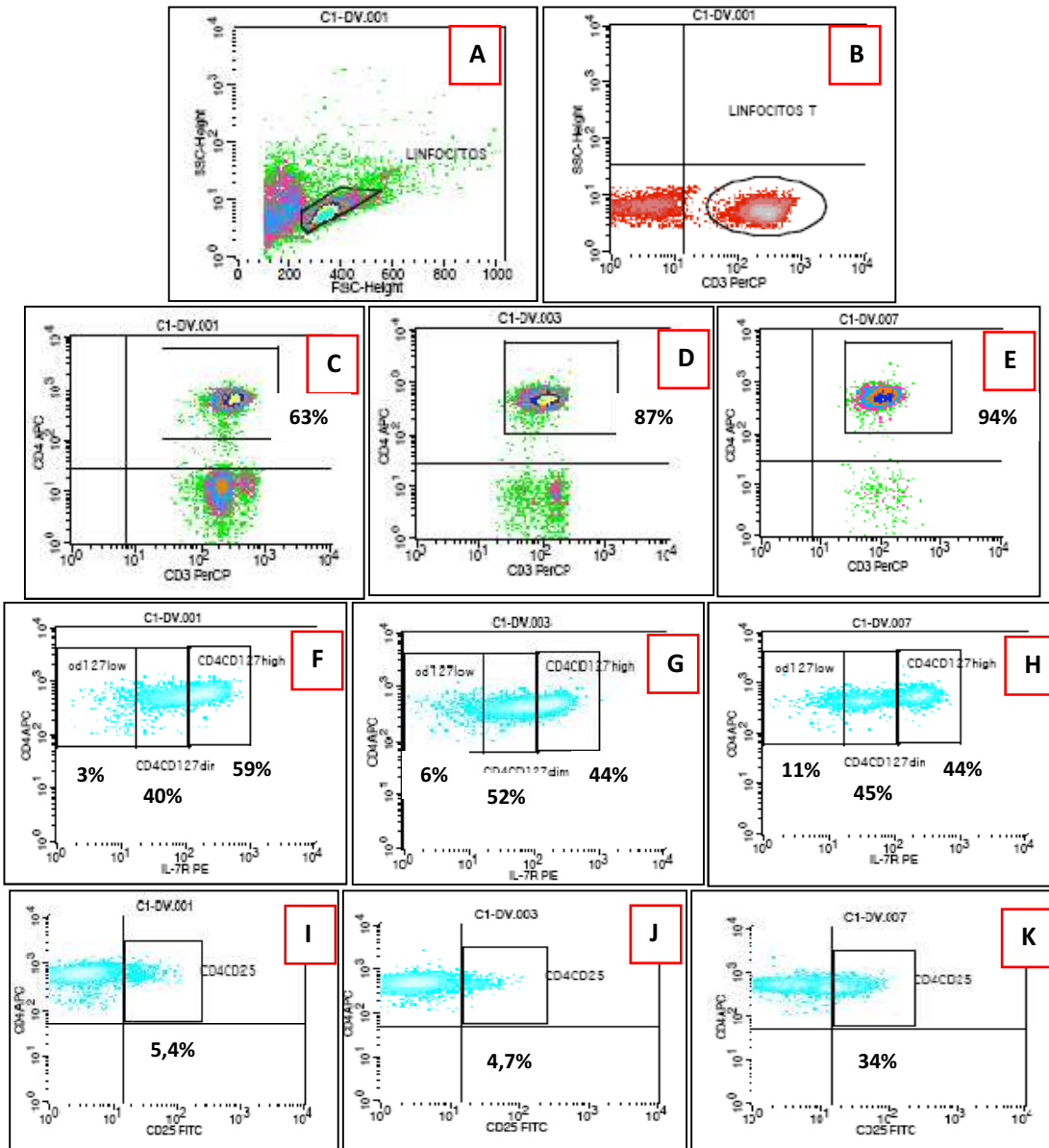
Figura 15: Medición de la cantidad de linfocitos T reguladores en sangre periférica. Se determinó la cantidad de linfocitos T reguladores, a partir de 50 μ L de sangre periférica de niños sanos y pacientes pediátricos VIH+ antes y durante 22 meses de la administración del TAAE. Estas células fueron marcadas con anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD25-FITC y anti-CD127-PE. Los análisis se realizaron por citometría de flujo con adquisición de 20.000 eventos. Los resultados se representan en barras que expresan el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA.

5.9. Purificación de linfocitos T reguladores de niños infectados por el VIH y de niños sanos.

Para el estudio de los linfocitos Treg sobre el establecimiento de la respuesta inmune contra la vacuna BCG en estos niños infectados por el VIH, lo primero que se realizó fue la purificación de estas células siguiendo el protocolo descrito en la metodología. Al final de cada paso de purificación, se procedió mediante citometría a la identificación de las células Treg en cada una de las fracciones obtenidas, con el fin de conocer el porcentaje de purificación de estas células para luego hacer el cultivo.

En la **figura 16** se muestran los citogramas de un experimento típico para la purificación de los linfocitos T reguladores. Los análisis se realizaron en las fracciones de **CMSP** inicialmente purificadas a partir de sangre periférica total, en la fracción **F1** resultante de la primera columna de purificación ($CD4+CD127^{low}$) y la fracción **Treg⁺** ($CD4+CD25+CD127^{low}$) resultante de la segunda columna de purificación (véase apartado **Materiales y Métodos 4.8**). La **figura 16A** muestra la identificación de los linfocitos totales mediante los parámetros de dispersión frontal y lateral, seguida de la identificación de linfocitos T mediante la discriminación con el marcaje de anticuerpos monoclonales anti-CD3-perCP (**Figura 16B**). Los citogramas correspondientes a la fracción de **CMSP** corresponden a las **figuras 16C, 16F, 16I y 16L**; las figuras correspondientes a la fracción **F1** son: **16D, 16G, 16J, y 16M**; por último, las que corresponden a la fracción **Treg⁺** son: **16E, 16H, 16K y 16N**. Se destaca como a medida que avanza el proceso de purificación a través de estas 3 fracciones hay un aumento en el porcentaje de linfocitos TCD4⁺ (**Figuras 16C, 16D y 16E**) (63%, 87% y 94%, respectivamente), como también un aumento en el porcentaje de linfocitos TCD4⁺TCD127^{low} (**Figuras 16F, 16G y 16H**) (3%, 6% y 11%, respectivamente). Asimismo, hubo un aumento en la población de linfocitos TCD4⁺CD25^{high} (**Figuras 16I, 16J y 16K**) (5,4%, 4,7% y 34%,

respectivamente). Por último observamos un gran aumento en la población de linfocitos T reguladores (CD4⁺CD127^{low}CD25^{high}) a medida que avanza la purificación de estas células (Figuras 16L, 16M y 16N) (6,1%, 7% y 45%, respectivamente).



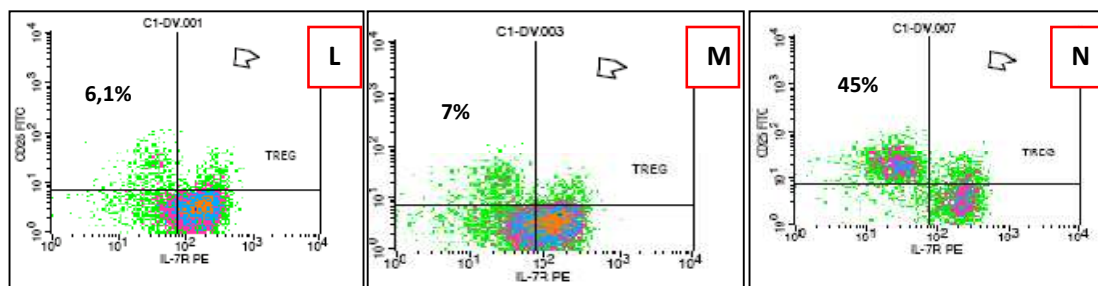


Figura 16: Purificación de linfocitos T reguladores de niños infectados por el VIH y niños sanos. Purificación de linfocitos T reguladores en un experimento típico. El fenotipo de cada una de las fracciones resultantes en el proceso de purificación se realizó mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD25-FITC y anti-CD127-PE. **(A)** Población de linfocitos totales. **(B)** Linfocitos T. **(C)** Linfocitos TCD4⁺ en la fracción de CMSP. **(D)** Linfocitos TCD4⁺ en la fracción F1. **(E)** Linfocitos TCD4⁺ en la fracción T reguladora. **(F)** Linfocitos TCD4⁺CD127^{low} en la fracción de CMSP. **(G)** Linfocitos TCD4⁺CD127^{low} en la fracción de F1. **(H)** Linfocitos TCD4⁺CD127^{low} en la fracción de T reguladora. **(I)** Linfocitos TCD4⁺CD25^{high} en la fracción de CMSP. **(J)** Linfocitos TCD4⁺CD25^{high} en la fracción de F1. **(K)** Linfocitos TCD4⁺CD25^{high} en la fracción de T reguladora. **(L)** Linfocitos TCD4⁺CD127^{low}CD25^{high} en la fracción de CMSP. **(M)** Linfocitos TCD4⁺CD127^{low}CD25^{high} en la fracción de F1. **(N)** Linfocitos TCD4⁺CD127^{low}CD25^{high} en la fracción de T reguladora.

En la **figura 17**, se muestran los resultados obtenidos por citometría de flujo correspondiente a la purificación de linfocitos Treg autólogos de cada uno de los niños sanos y pacientes antes y durante la administración del TAAE. En el eje Y se representa el porcentaje de la purificación, en el eje X se observa las subpoblaciones celulares, entre los que se encuentran: células TCD4⁺ totales, células TCD4⁺CD127^{low} (baja expresión de CD127), células TCD4⁺CD25^{high} (alta expresión de CD25) y linfocitos TCD4⁺CD25^{high}CD127^{Low} (linfocitos T reguladores). Podemos destacar que a medida que avanza el proceso de purificación, aumenta el porcentaje de las células TCD4⁺ ($p < 0,05$). La subpoblación que expresa una baja densidad el receptor CD127 no cambió en las diferentes fases de purificación, sin embargo, aumentó aquellas que expresan en alta densidad CD25 ($p < 0,05$). Sumado a estos resultados, se observa cómo hay un gran aumento en la purificación de los linfocitos Treg ($p < 0,05$), lo que permitió realizar el cultivo celular y estudiar su funcionalidad.

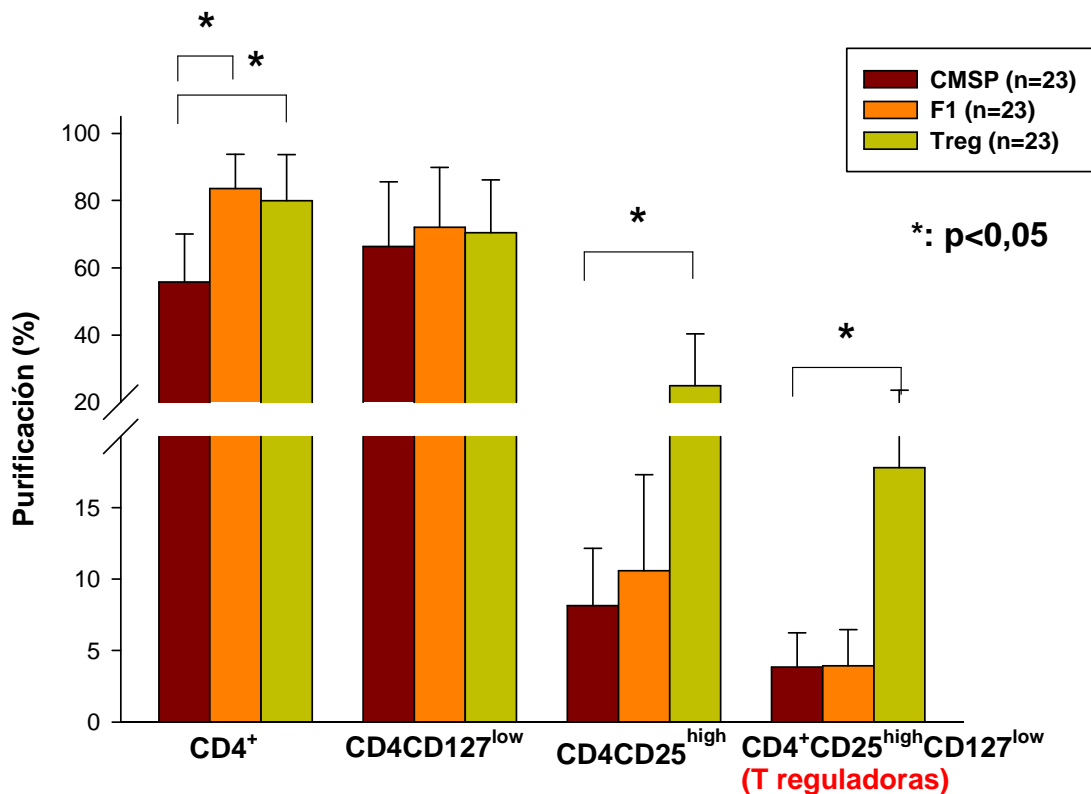


Figura 17: Purificación de los linfocitos T reguladores. La purificación se realizó a partir de CMSP previamente purificadas y mediante el uso de columnas con microperlas magnéticas, anticuerpos con microperlas magnéticas y separadores (MACS). A cada fracción resultante en el proceso de purificación, se procedió a determinar su fenotipo mediante el uso de anticuerpos anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD25-FITC y anti-CD127-PE. Los análisis se realizaron por citometría de flujo con adquisición de 20.000 eventos. Los resultados se representan en barras que expresan el promedio \pm la desviación estándar. El porcentaje representado en la gráfica corresponde al incremento en la purificación de los diferentes tipos celulares en las diferentes fracciones. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA.

5.10. Determinación de la proliferación celular de linfocitos TCD4⁺ de niños infectados por el VIH y niños sanos, en presencia de la vacuna BCG y la proteína viral gag.

Los linfocitos T reconocen a los antígenos a través de la interacción de los receptores de células T (RCT) y péptidos/CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) los cuales son

expresados en la superficie de las Células Presentadoras de Antígenos (CPA). La activación de los RCT resulta en la proliferación y diferenciación que determinará la clase de respuesta inmune que se producirá contra dicho antígeno (Lanzavecchia y Sallusto, 2000). Al ser la proliferación celular uno de los principales eventos involucrados en el establecimiento de la respuesta inmunológica, quisimos estudiar si esta función se ve afectada en niños VIH+, si la administración del tratamiento promueve una mayor proliferación contra la vacuna BCG y la proteína viral gag y por último, si los linfocitos T reguladores ejercen algún mecanismo inhibitorio sobre esta función.

Como en casos anteriores, en **la figura 18** se muestran los citogramas correspondientes a un experimento típico (niño VIH+ después de 14 meses de tratamiento). Podemos observar que en ausencia de estímulo (**Figura 18A**), existe un porcentaje muy bajo de proliferación (1,80%), sin embargo, en presencia del mitógeno PHA (**Figura 18B**), hubo una mayor proliferación de estas células (50,97%). En presencia de la vacuna BCG (**Figura 18C**), estas células proliferaron más cuando lo comparamos con el control (sin estímulo) (6,27%). Sin embargo, se observa como particularmente en este niño la presencia de la proteína viral gag no estimula la proliferación de linfocitos TCD4+ (**Figura 18D**).

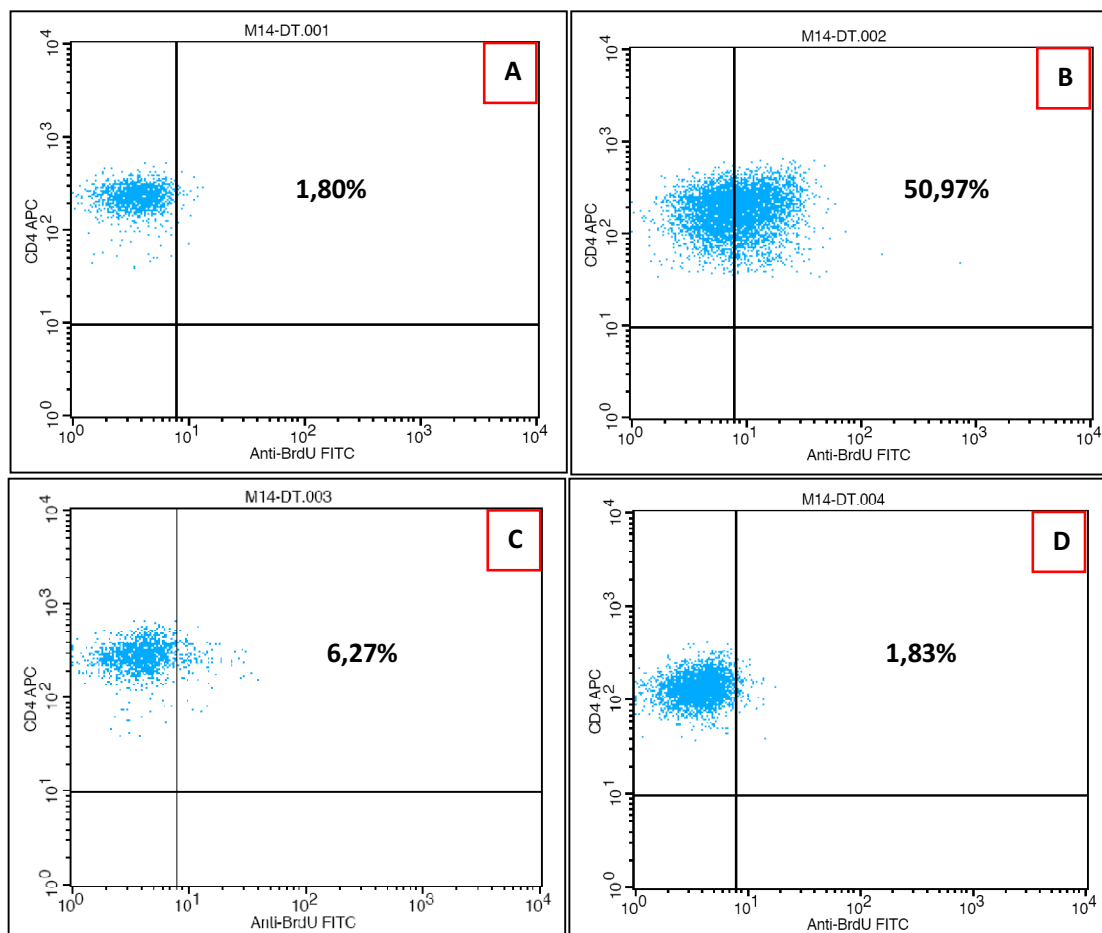


Figura 18: Determinación de la proliferación de linfocitos TCD4⁺. La determinación de la proliferación de células TCD4⁺ se realizó mediante la incorporación de BrdU y el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC y anti-BrdU-FITC. Los porcentajes representan la cantidad de linfocitos TCD4⁺ que proliferaron en ausencia o presencia de diferentes estímulos antigénicos. **(A)** Proliferación de células TCD4⁺ en ausencia de estímulo. **(B)** Proliferación de células TCD4⁺ en presencia de PHA. **(C)** Proliferación de células TCD4⁺ en presencia de la vacuna BCG. **(D)** Proliferación de células TCD4⁺ en presencia de la proteína viral gag.

Al analizar los resultados de incorporación de BrdU como marcador de proliferación celular de linfocitos TCD4⁺ totales. Se observó que la estimulación por PHA produjo un aumento importante en el porcentaje de células que incorporaron BrdU, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto a las demás condiciones de cultivos (sin estímulo, en presencia de BCG y Gag). Por otra parte, se obtuvo que en pacientes infectados antes del tratamiento presentaron

valores más bajo de proliferación en presencia de la vacuna BCG, sin embargo, aumenta a medida que avanza el tiempo, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas a partir del mes 2 ($p < 0,05$). Al contrario, cuando se analizaron los valores de proliferación de estas células en presencia de péptidos virales Gag, se pudo constatar que la capacidad de proliferación específica en pacientes VIH+ antes del tratamiento es mayor que los niños sanos, e incluso aumenta con el tiempo de la triterapia, alcanzando diferencias significativas con respecto al día 0 en el mes 22 ($p < 0,05$). En ninguna de las condiciones se observó diferencias entre los cultivos de CMSP sin linfocitos T reguladores y en presencia de éstas células (Ver **figura 19**).

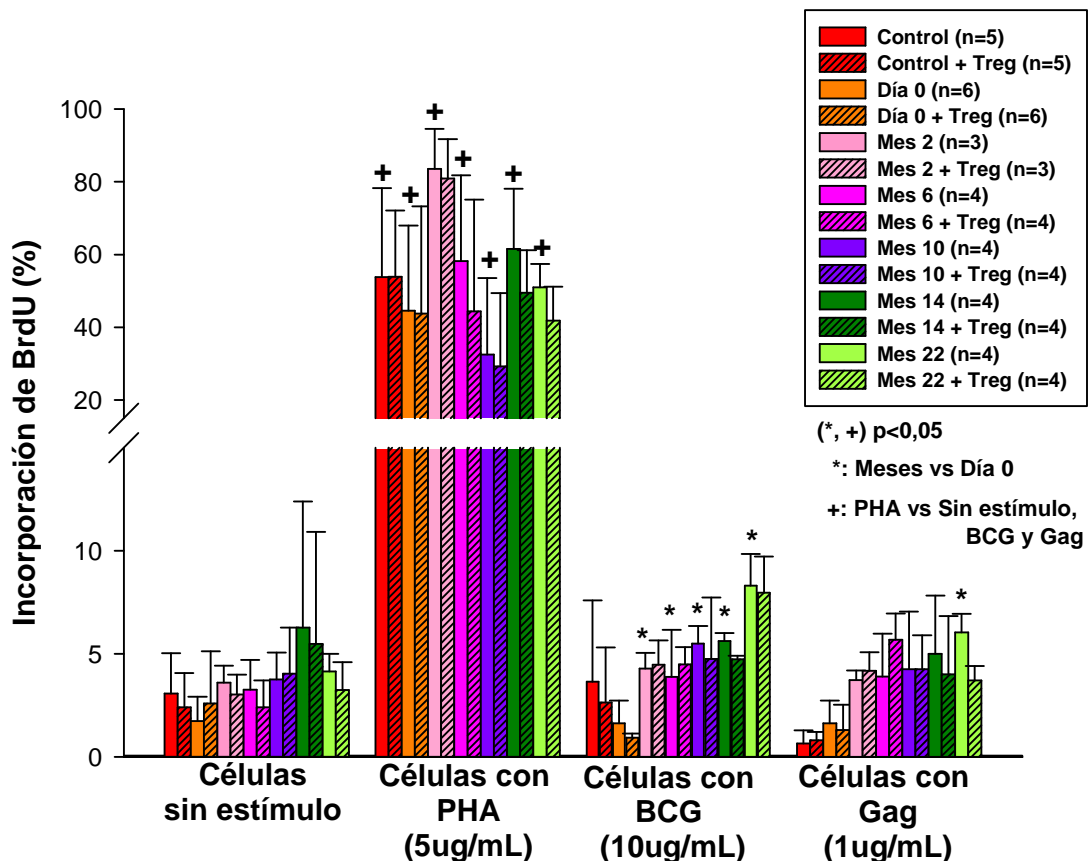


Figura 19: Proliferación *in vitro* de linfocitos TCD4+ en CMSP de pacientes pediátricos VIH+. Se determinaron los porcentajes de proliferación de linfocitos T CD4+ totales de pacientes pediátricos antes y durante 22 meses del TAAE, y de infantes sanos que constituyeron el grupo control, en presencia de diferentes condiciones de: no estimulación, estimulación con PHA, la vacuna BCG y la proteína viral Gag; a las 72 horas de cultivo de las PBMC, mediante la medición de la incorporación de BrdU que se detecta

mediante el uso de anticuerpo monoclonal anti-BrdU-FITC con ADNasa (BD), con una adquisición de 20.000 eventos totales. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos.

5.11. **Determinación de la producción intracelular *in vitro* de IFN- γ en linfocitos TCD4⁺ de niños infectados por el VIH y niños sanos, en presencia de la vacuna BCG y la proteína viral gag.**

Desde hace algunos años se ha investigado el papel protector que juega la citocina IFN- γ , en la infección por VIH. Esta citocina es producida por las células TCD4⁺ y TCD8⁺ en respuestas inmunes antivirales específicas (Murphy y col., 2009) y su producción se ha visto disminuida en pacientes, pediátricos y adultos, avanzados en la enfermedad por VIH/SIDA (Lieberman y col., 2001). Por otra parte, se ha demostrado que esta molécula posee un papel muy importante en la resistencia a la infección por *Mycobacterium tuberculosis* (Flynn y Chann, 2001).

En la **figura 20** se muestran los resultados de un experimento típico para la determinación de la producción intracelular *in vitro* de IFN- γ en linfocitos TCD4⁺. Podemos observar en la **figura 20A** que muy pocas células producen IFN- γ en ausencia de estímulo (0,55%), sin embargo, en presencia del mitógeno (**Figura 20B**), un gran porcentaje de estas células producen esta citocina (71,80%). Al contrario, en presencia de la vacuna BCG y de la proteína viral gag, no hubo cambios significativos en la producción de esta molécula (**Figura 20C y 20D**, respectivamente).

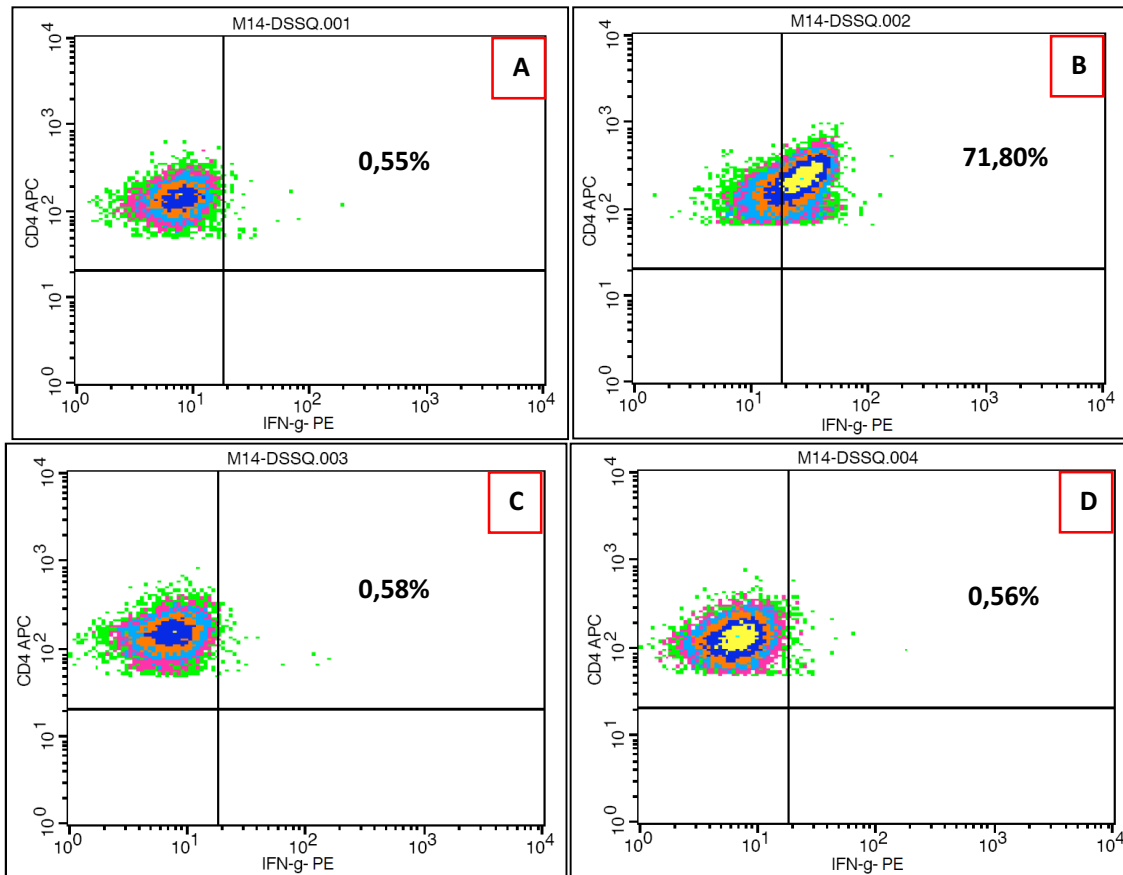


Figura 20: Determinación de la producción intracelular *in vitro* de IFN- γ en linfocitos TCD4⁺. La determinación de la producción intracelular *in vitro* de IFN- γ se realizó mediante la permeabilización de estas células y el uso de anticuerpos monoclonales anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC y anti-BrdU-PE. Los porcentajes representan la cantidad de linfocitos TCD4⁺ que produjeron IFN- γ en ausencia o presencia de diferentes estímulos antigénicos. **(A)** Producción intracelular de IFN- γ de células TCD4⁺ en ausencia de estímulo. **(B)** Producción intracelular de IFN- γ de células TCD4⁺ en presencia de PHA. **(C)** Producción intracelular de IFN- γ de células TCD4⁺ en presencia de la vacuna BCG. **(D)** Producción intracelular de IFN- γ de células TCD4⁺ en presencia de la proteína viral gag.

Los resultados obtenidos y presentados en la **figura 21**, indican que la producción *in vitro* de IFN- γ contra BCG no cambia a medida que avanza el tiempo de la triterapia, incluso manteniéndose en niveles basales. Lo mismo sucede en presencia de proteínas virales Gag. La presencia de PHA indujo una mayor producción de esta citocina con diferencias significativas con respecto a los cultivos de CMSP en las diferentes condiciones (sin estímulo, en presencia de BCG y Gag). Por

último, cuando analizamos los resultados obtenidos con los linfocitos Treg, no se observa ninguna diferencia en la producción de esta citocina en ausencia o presencia de estas células.

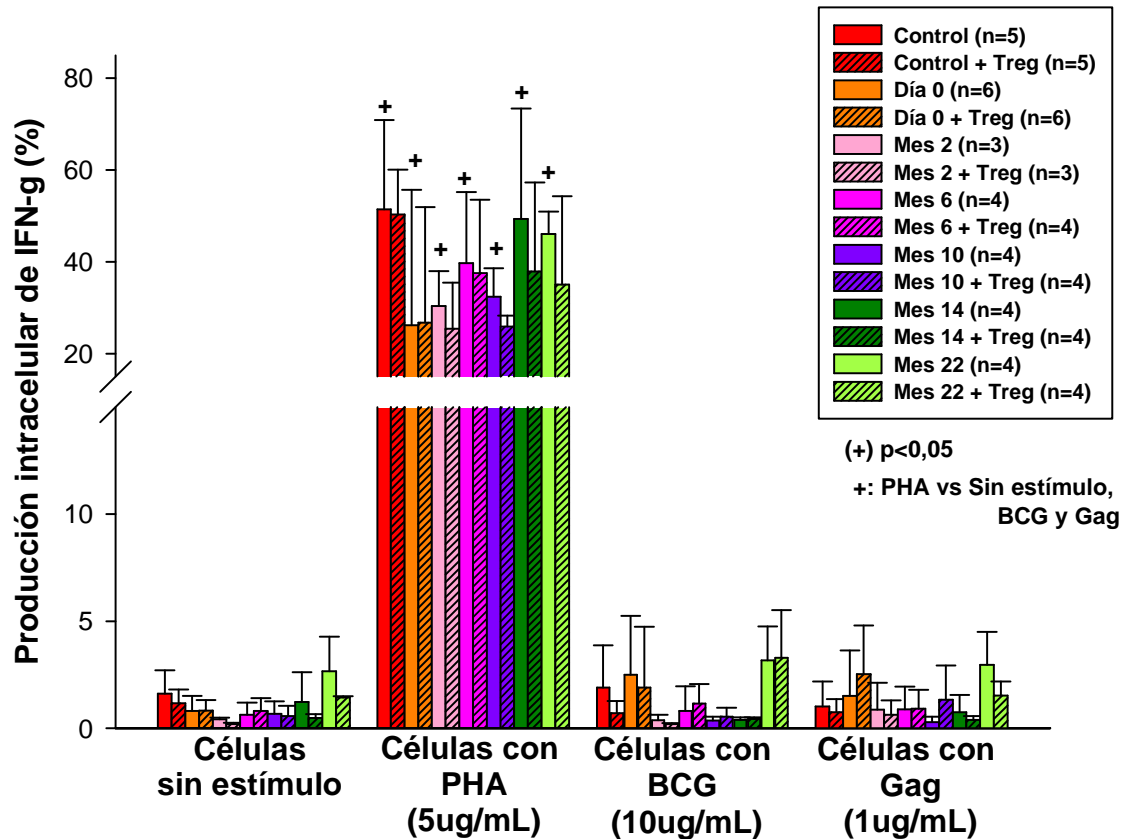


Figura 21: Cuantificación de la producción intracelular *in vitro* de IFN- γ de linfocitos TCD4⁺ de pacientes pediátricos VIH⁺ e infantes sanos. Se determinaron los porcentajes de producción *in vitro* de IFN- γ intracelular en linfocitos TCD4⁺ totales, a las 72 horas de cultivo de PBMC con diferentes estímulos (PHA, BCG y Gag), mediante la medición de la unión de anti-IFN- γ -FITC a linfocitos TCD4⁺ debidamente permeabilizados. Los análisis se realizaron con un citómetro de flujo FACScalibur de cuatro detectores, con una adquisición de 20.000 eventos totales. Los linfocitos que incorporaron este anticuerpo fueron marcados además con un anti-CD3 PerCp, y anti-CD4-APC. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos.

5.12. Determinación de la producción in vitro de citocinas Th1 y Th2 de plasma y sobrenadantes de CMSP en cultivo.

Las citocinas Th1 y Th2 son moléculas producidas por las células TCD4⁺ efectoras y son las encargadas de activar procesos que forman parte de la inmunidad celular y la defensa del organismo contra patógenos intracelulares, en el caso de las Th1, o de activar procesos propios de inmunidad mediada por anticuerpos y la defensa contra patógenos extracelulares, para el caso de las Th2 (Mossmann y Sad, 1996; Romagnani, 1997). Se ha demostrado que la infección por VIH ocasiona alteraciones en la producción y en la regulación que ejercen estas citocinas, lo que contribuye con la inmunopatogénesis del virus acelerando la progresión de la enfermedad, en pacientes seropositivos adultos y pediátricos (Romagnini y col., 1994; Than y col., 1996). A través de la utilización de la técnica CBA (véase apartado **4.12 de materiales y métodos**), medimos la producción de citocinas Th1/Th2 en plasma y sobrenadantes de células en cultivo de niños infectados con VIH. En la **figura 22** podemos observar los resultados típicos de un paciente VIH⁺ después de 22 meses de tratamiento, para la determinación de estas citocinas en plasma y sobrenadantes. La identificación de la población de perlas se realizó mediante los parámetros de dispersión frontal y lateral como se muestran en la **figura 22A y 22B** correspondientes a muestras de plasma y sobrenadantes respectivamente. En la **figura 22C** podemos observar la identificación de las 6 subpoblaciones de perlas correspondientes a cada una de las citocinas de interés, y se destaca que en plasma, hay una baja concentración de estas citocinas, sin embargo, en sobrenadante se observa una mayor producción de citocinas como la IL-6, IL-10 y TNF- α . Estos análisis nos permitieron obtener valores Promedio de la Intensidad de Fluorescencia (MFI por sus siglas en inglés), que luego con la construcción de curvas de calibración nos permitió determinar la concentración de estas moléculas (pg/mL).

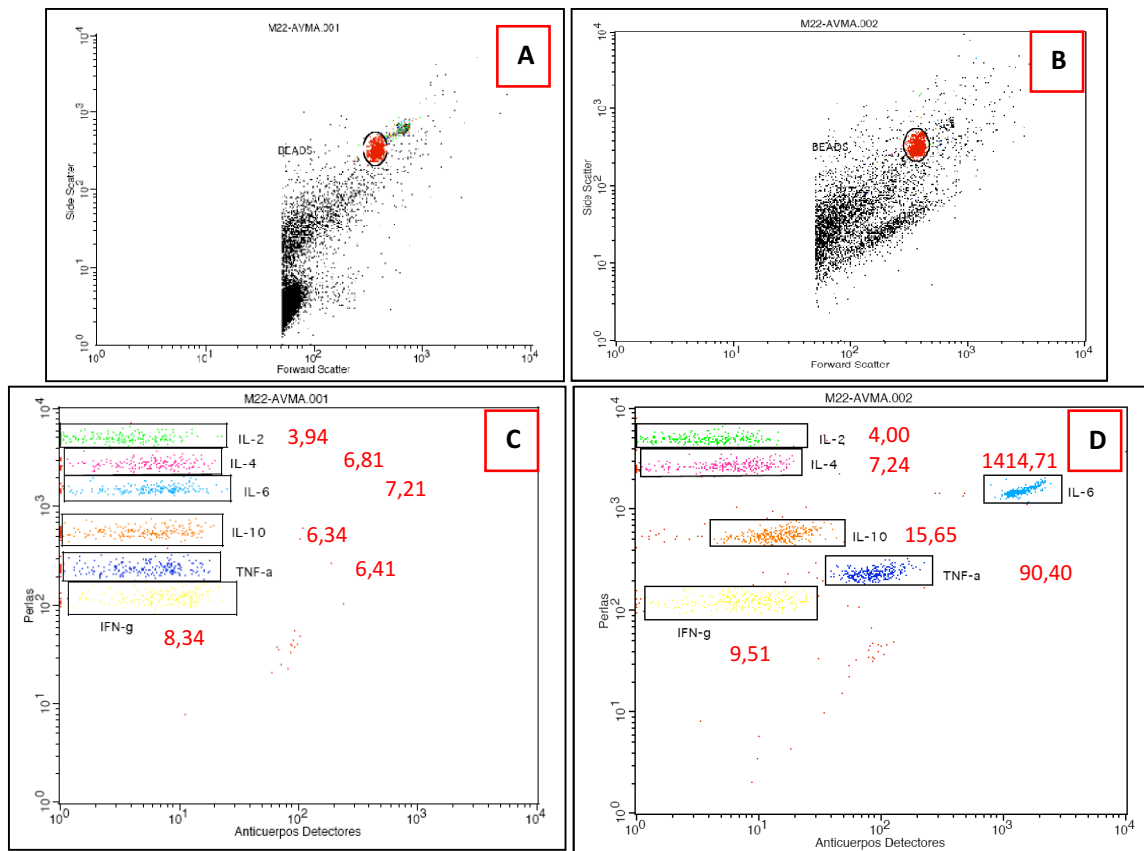


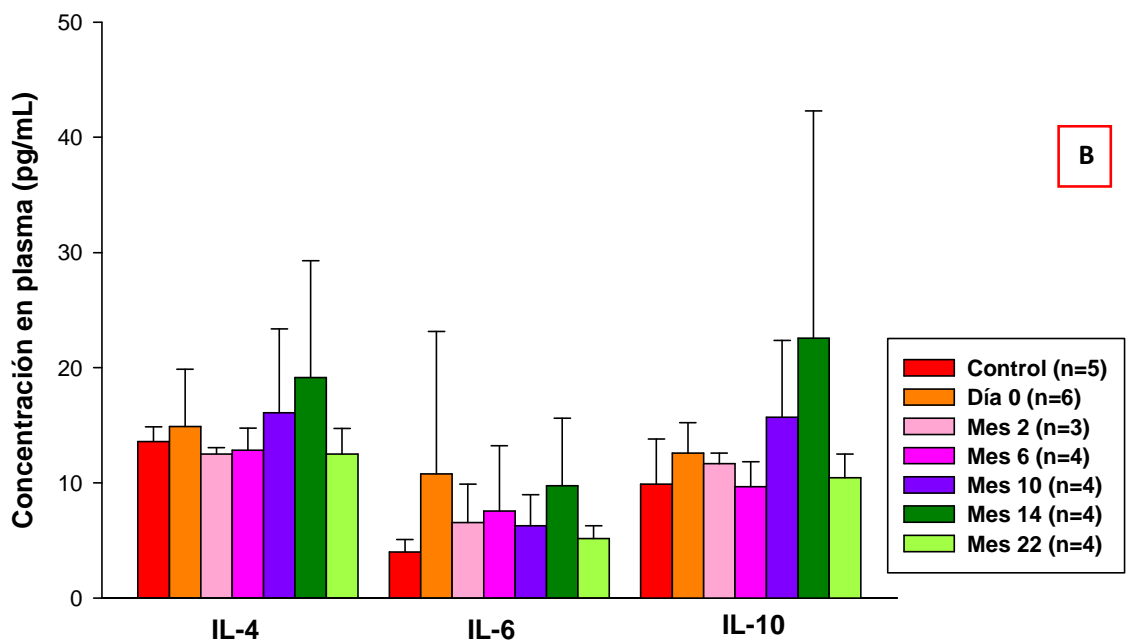
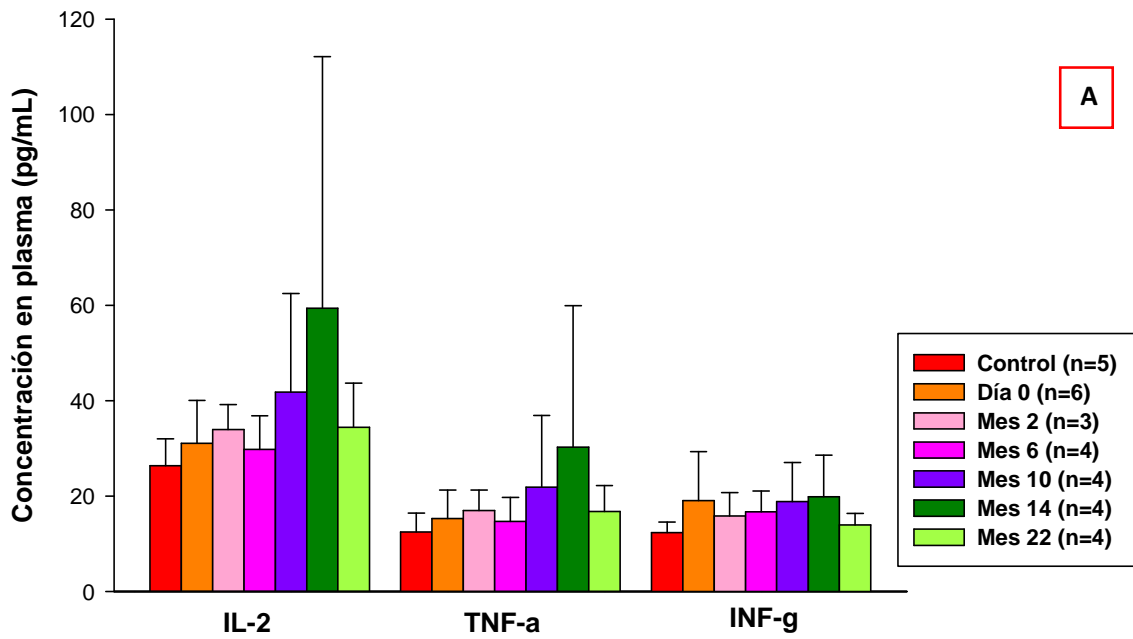
Figura 22: Determinación de la producción de citocinas en CMSP. La determinación de la producción *in vitro* de citocinas Th1/Th2 se realizó mediante la técnica CBA. Se observa la identificación de las 6 subpoblaciones de perlas correspondientes a las citocinas de interés. Los valores que se muestran son los promedios de intensidad de fluorescencia (MFI) (A) Población de citocinas en plasma. (B) Población de citocinas en sobrenadante. (C) Subpoblaciones de citocinas en plasma. (D) Subpoblaciones de citocinas en sobrenadante.

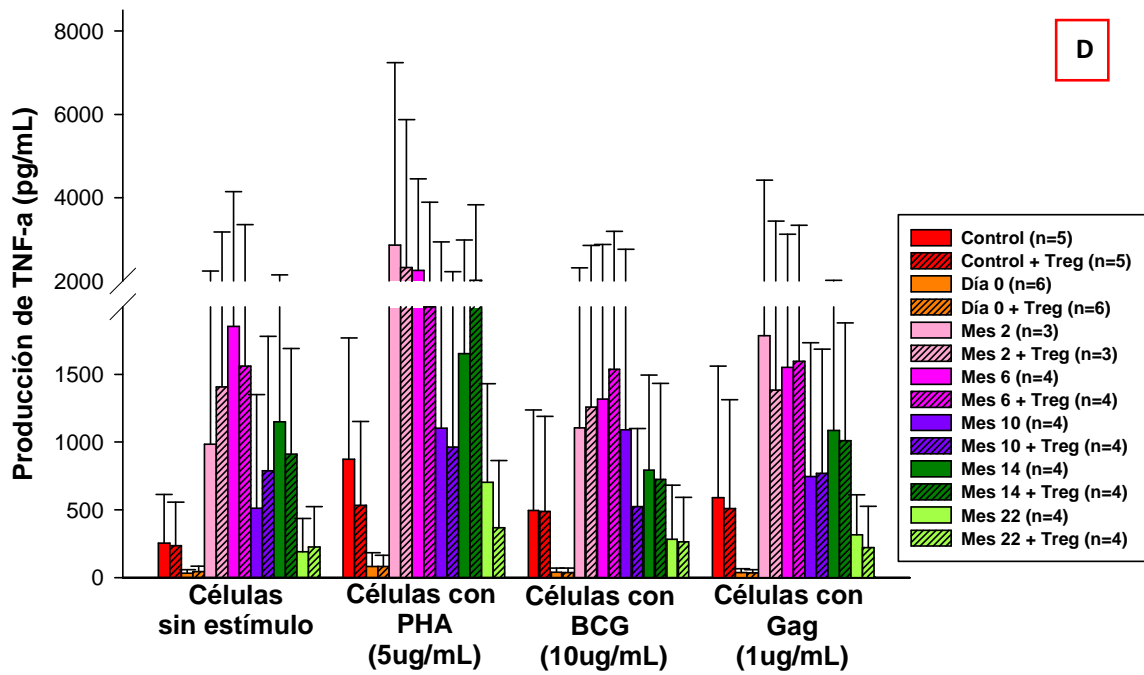
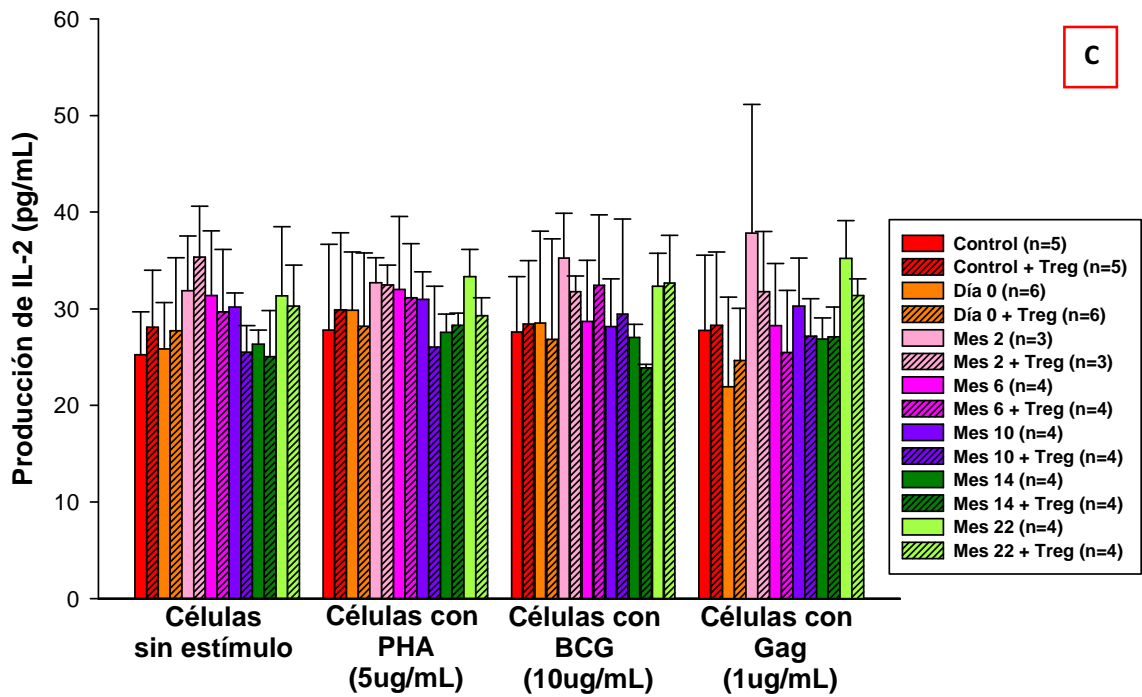
Los resultados de la producción *in vitro* de citocinas Th1/Th2 en plasma y sobrenadantes se muestran en la **figura 23**. Encontramos que en plasma no existen diferencias en la producción de citocinas Th1 (IL-2, TNF- α e IFN- γ) (**Figura 23A**) ni en las citocinas Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10) (**Figura 23B**), entre los grupos de pacientes infectados antes y durante el TAAE y el grupo control.

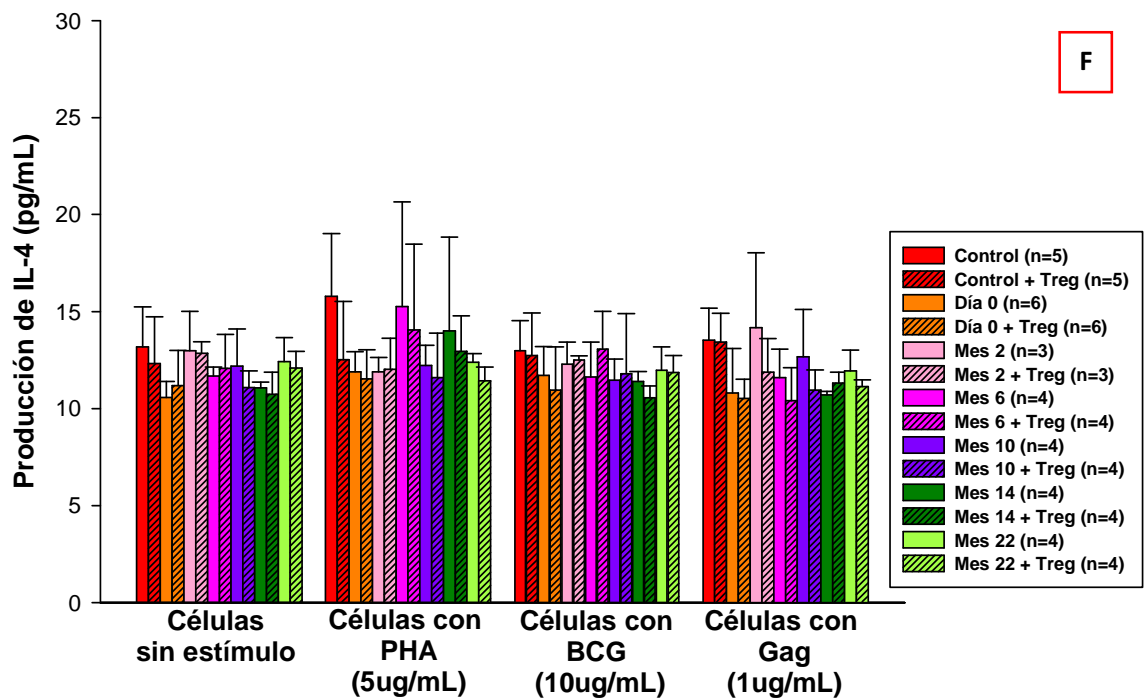
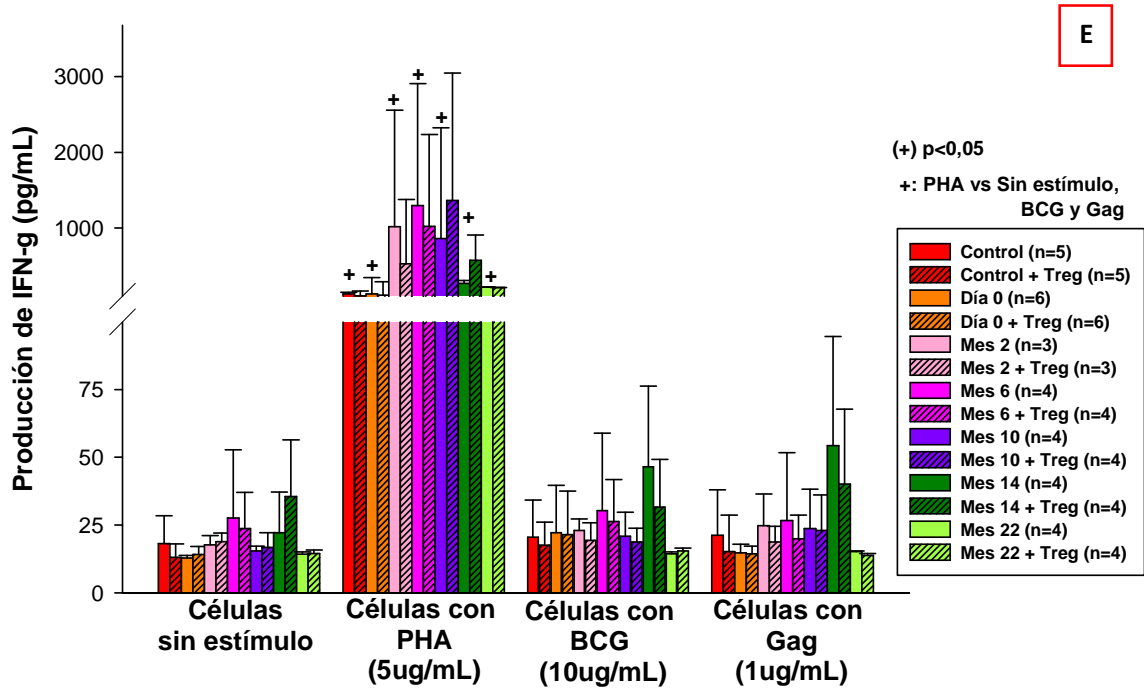
Al medir las citocinas Th1 en los sobrenadantes de cultivo, encontramos una producción similar de IL-2 entre los niños sanos y los pacientes pediátricos antes y durante el TAAE. Podemos destacar que la producción de esta citocina es mucho menor a las demás citocinas Th1 y la misma es similar en todas las condiciones de cultivo (sin estímulo, en presencia de PHA, BCG y Gag) (**figura 23C**). Al contrario, se observa que la producción de TNF- α es mayor en niños sanos cuando se compara con niños VIH+ antes del tratamiento, sin embargo, la producción de esta citocina aumenta al segundo mes de tratamiento a medida que disminuye con el tiempo del TAAE (**Figura 23D**). Este comportamiento se repite en todas las condiciones de cultivo. Por último, podemos observar que la producción de IFN- γ es similar entre los niños sanos y los pacientes antes y durante el tiempo de administración del tratamiento (**Figura 23E**), sin embargo, en comparación a los casos anteriores, hay una mayor producción de esta citocina en presencia de PHA. En ninguna de las condiciones de cultivo se observó diferencia significativa en la producción de estas citocinas en presencia de células Treg.

Analizando las citocinas Th2 en sobrenadantes, pudimos observar que la producción de IL-4 es similar en todas las condiciones antes y durante el TAAE, incluso, los valores son similares a lo encontrado en niños sanos (**Figura 23F**). En presencia de PHA no se observó estimulación en la producción de esta citocina. Con respecto a la producción de IL-6, pudimos observar que la producción de la misma es mayor en los cultivos de CMSP de niños sanos cuando lo comparamos con los niños VIH+ antes del TAAE, sin embargo, aumenta la producción al segundo mes de tratamiento y tiende a disminuir en el tiempo de la triterapia (**Figura 23G**). Por último, la producción de IL-10 es menor en niños infectados por el VIH que en niños sanos, y aumenta a partir del segundo mes de tratamiento. Asimismo, bajo estimulación PHA hay una mayor producción de esta citocina en las CMSP de niños sanos, con respecto a las demás condiciones ($p < 0,05$), al contrario,

no se observan diferencias estadísticamente significativas con los cultivos de células de pacientes pediátricos. Por otra parte, cuando analizamos los cultivos en presencia de BCG se observa una tendencia en disminuir la producción de esta citocina a partir del segundo mes del TAAE (sin diferencias estadísticamente significativa), asimismo, se observó un incremento al segundo mes del TAAE en presencia de Gag, y se mantuvo constante en el tiempo (**Figura 23H**).







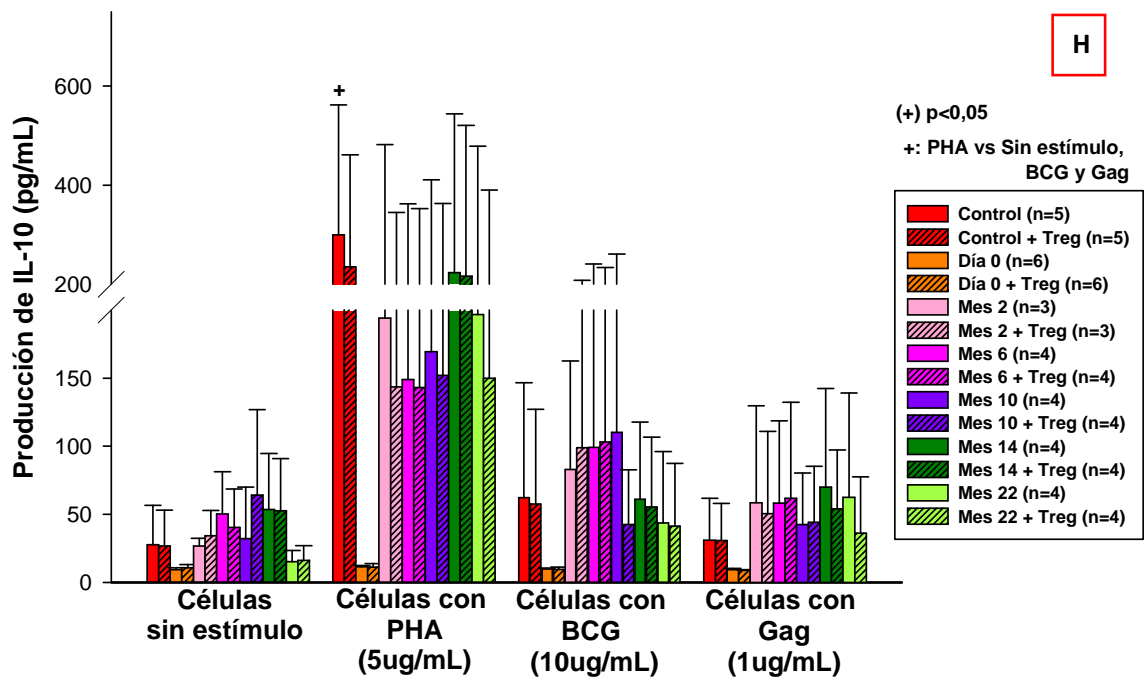
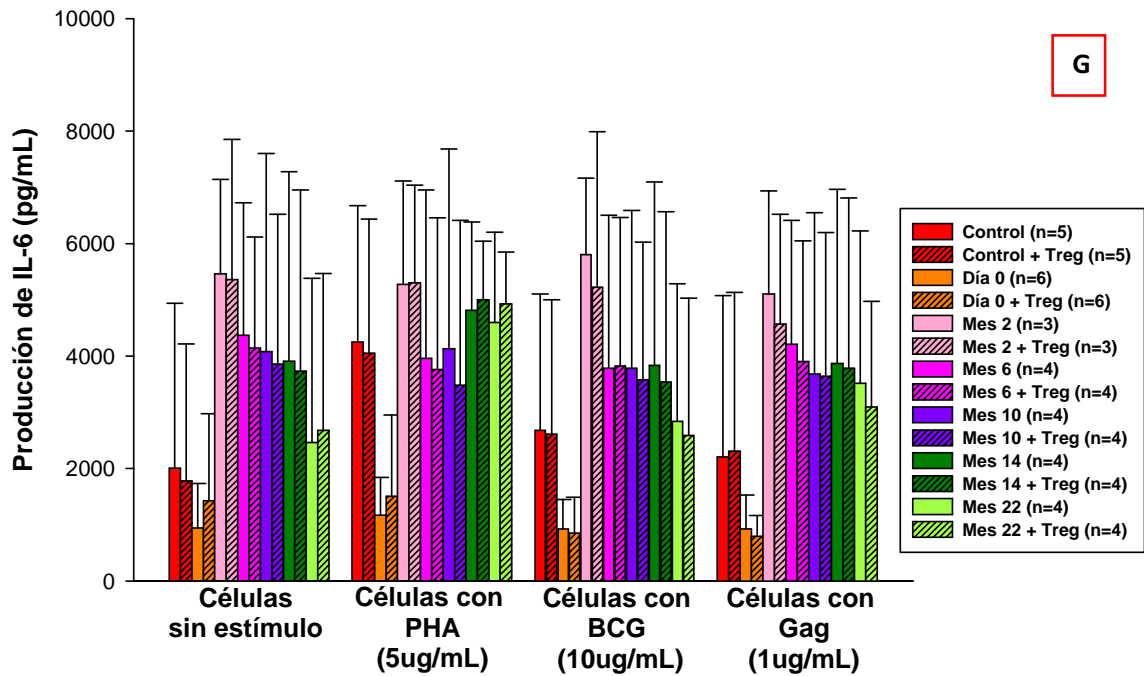


Figura 23: Cuantificación de la producción de citocinas Th1/Th2 en plasma y sobrenadantes de CMSP de cultivo de pacientes pediátricos VIH+ y niños sanos. Se determinaron los porcentajes de producción de citocinas Th1/Th2 en plasma y sobrenadantes de CSMP de cultivo; a través de la utilización de una técnica con perlas magnéticas (CBA-BD) para seis citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e INF- γ . **(A)** Citocinas Th1 en plasma, **(B)** Citocinas Th2 en plasma, **(C)** Producción de IL-2 en sobrenadantes, **(D)** Producción de TNF- α , **(E)** Producción de INF- γ en sobrenadantes, **(F)** Producción de IL-4 en sobrenadantes, **(G)** Producción de IL-6 en sobrenadantes, **(H)** Producción de IL-10 en sobrenadantes. Los análisis se realizaron con un citómetro de flujo FACScalibur, con una adquisición de 20.000 eventos totales. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método estadístico ANOVA para datos paramétricos y Kruskal-Wallis para los no paramétricos.

6. DISCUSIÓN

La infección por el VIH se caracteriza por una pérdida progresiva de linfocitos TCD4⁺, alteraciones fenotípicas de las células T y un declive en las funciones tímicas, que conllevan a una profunda disfunción generalizada en el sistema inmune de los pacientes infectados (Resino y col., 2004; Freguja y col., 2011). Una respuesta no efectiva contra el VIH resulta en una activación crónica del sistema inmune que juega un papel fundamental en la progresión de la enfermedad (Kinter y col., 2004; Freguja y col., 2011). Esto resulta en la generación de células T activadas que son blanco para el virus, promoviendo la replicación viral y la eliminación de células TCD4⁺ (Douek y col., 2003).

Como consecuencia de la alteración en el sistema inmune, estos pacientes son más susceptibles a enfermedades oportunistas, entre ellas la Tuberculosis. Aunque la vacuna BCG ha demostrado cierta eficacia para proteger contra la forma diseminada de la enfermedad, ésta es disminuida en pacientes con el VIH (Andersen y Doherty, 2005; Trunz y col., 2006), e incluso, se ha observado mayores complicaciones asociadas a la vacunación, produciendo una alta tasa de morbilidad en adultos y niños (Hesseling y col., 2007).

No obstante, el uso de antirretrovirales ha mejorado enormemente la calidad de vida de estos pacientes. Estudios epidemiológicos indican que el uso de estos medicamentos influye sobre la respuesta no sólo contra el VIH sino también contra BCG. Algunas evidencias sugieren que el aumento en el número y en las funciones de los linfocitos T pueden ser los responsables en la disminución de enfermedades oportunistas en estos pacientes (Kirk y col., 2002; Resino y col., 2004).

Por otra parte, los linfocitos T reguladores (Treg) juegan un papel importante en regular la respuesta inmune. Las Treg previenen una respuesta a antígenos propios y están especializadas en suprimir la respuesta contra una variedad de patógenos. Sin embargo, el papel de estas células en la infección por el VIH se encuentra en debate. Algunos estudios (Andersson y col., 2005; Nilsson y col., 2006; Li y col., 2008) sugieren un papel perjudicial ya que suprime la respuesta inmune específica contra el VIH, mientras que otros (Kinter y col., 2004; Card y col., 2009; Moreno-Fernández y col., 2011) proponen un papel beneficioso al disminuir la hiperactivación del sistema inmune.

Es por ello nuestro interés en el laboratorio, el de estudiar algunos parámetros inmunológicos de los linfocitos TCD4⁺, como también el posible papel de los linfocitos Treg en el establecimiento de la respuesta inmune contra la vacuna BCG antes y durante 22 meses del TAAE en niños infectados con el VIH.

Cuando medimos las subpoblaciones linfocitarias en sangre de los niños infectados con VIH, los resultados mostraron una disminución importante, tanto en porcentajes como en valores absolutos de linfocitos TCD4⁺ (**Figura 4A y Figura 4B respectivamente**). Se han desarrollado dos hipótesis para explicar la eliminación de estos linfocitos TCD4⁺ inducida por el VIH, principal característica de esta infección viral. Una de ellas basada en que el VIH infecta directamente a estas

células, por lo tanto, la eliminación de las mismas es consecuencia de efectos citopáticos mediados por la replicación viral (Pantaleo y Fauci, 1995; Pantaleo y Fauci, 1996). Los estudios pioneros en VIH demostraron mediante experimentos “*in vitro*” que el VIH infectaba preferencialmente a estas células, uniéndose al receptor CD4, a través de las glicoproteínas gp120 y gp41 (Poranen y col., 2002). Sin embargo, la segunda hipótesis describe la eliminación de los linfocitos TCD4⁺ de manera indirecta. Se demostró que el VIH tenía mecanismos para afectar al sistema inmunitario de manera independiente a los efectos citopáticos directos, por ejemplo, la infección *in vivo* de tejidos linfoides con VIH resulta en un incremento de la apoptosis de células del sistema inmunitario (Pantaleo y Fauci, 1995; Pantaleo y Fauci, 1996). Otros estudios apuntaron que probablemente cuando el VIH ingresa al organismo, estos se concentran en los órganos linfoides, promoviendo el reclutamiento de células T circulantes (McCune, 2001) y una vigorosa proliferación de estas células (Wang y col., 1999), conllevando a una activación exacerbada del sistema inmune. La activación del sistema inmune ha sido asociada con la destrucción acelerada de linfocitos T y con ello, a la progresión de la enfermedad (Grossman y Herberman, 1997; Hazenberg y col., 2000); la cual puede ser llevada de forma directa, ya que el virus infecta “preferencialmente” a los linfocitos TCD4⁺ activados (Douek y col., 2002), o indirecta, mediante la expresión de moléculas inductoras de apoptosis (Benedict y col., 2002).

El uso de antirretrovirales en pacientes adultos y pediátricos infectados por el VIH ha conllevado a una disminución en la morbilidad y mortalidad asociada al virus. La principal característica del uso de antirretrovirales en estos pacientes está asociada a una disminución en la carga viral y un incremento en el número de células TCD4⁺ en sangre y nódulos linfáticos (Carcelain y col., 2001; Resino y col., 2004; Resino y col., 2006a; Violari y col., 2008). Podemos observar la confirmación de estos trabajos con nuestros resultados que ya al segundo mes de tratamiento hay

un aumento significativo de linfocitos TCD4⁺ en sangre tanto en porcentaje (**Figura 4A**) como en valor absoluto (**Figura 4B**). La reconstitución del número de células T ha sido caracterizado como un proceso bifásico: una primera fase de corta duración, donde se observa un rápido incremento de linfocitos T en sangre, y una segunda fase de mayor duración donde el incremento de estas células es menor pero estable en el tiempo (Lederman, 2001). El rápido incremento del número de células TCD4⁺ observado en los primeros dos meses de tratamiento, con una reducción en la carga viral (**Figura 5**), ha sido propuesto como el inicio de la reconstitución del sistema inmune en estos pacientes, y refleja una recirculación de células T desde los tejidos linfoides. La infección por el VIH promueve un reclutamiento de células TCD4⁺, sin embargo, la disminución en la carga viral, origina la redistribución de estas células desde los tejidos linfáticos hacia la periferia (Carcelain y col., 2001; McCune, 2001).

Se ha descrito que la tasa de expansión de células TCD4⁺ comienza a decaer a partir del tercer mes de tratamiento, pero persiste durante años (Autran y col., 1997; Carcelain y col., 2001; Lederman, 2001). Esta segunda fase está fuertemente correlacionada con la reducción en la carga viral y su estabilidad en el tiempo (Renaud y col., 1999; Connick y col., 2000). Nuestros resultados concuerdan con lo antes descrito, podemos observar que sigue aumentando el número de células TCD4⁺ (**Figura 4A y Figura 4B**), a medida que disminuye la carga viral en estos pacientes (**Figura 5**). Como se discutirá más adelante, el aumento del número de células TCD4⁺ totales podría explicarse por un incremento en la producción de nuevas células en el timo, en conjunto con la proliferación de células ya existentes.

Cuando analizamos las subpoblaciones de linfocitos TCD4⁺ vírgenes, se evidenció una disminución en los linfocitos TCD4⁺ vírgenes en niños VIH⁺ antes del tratamiento con respecto a los niños sanos (**Figura 4C y figura 4D**). Una de las posibles explicaciones es que el timo posee una

gran cantidad de linfocitos TCD4⁺ en diferentes niveles de maduración (McCune, 1991). El análisis del timo en niños y adultos VIH⁺ ha revelado una reducción del mismo, lo que sugiere un daño directo por el virus. Al respecto, se ha documentado que el VIH induce una supresión de la proliferación de timocitos (Dion y col., 2004), mientras que por otra parte, el VIH es capaz de infectar y destruir timocitos (Burke y col., 1995; Su y col., 1995). Además la infección del epitelio tímico ocasiona un daño en el tejido parénquimal y la consecuente involución de este órgano que es independiente de la típica involución asociada a la edad (Gaulton y col., 1997). Basándonos en estas evidencias, podemos decir que la pérdida de células TCD4⁺ vírgenes que encontramos en estos pacientes pediátricos se podría explicar no solo por una infección directa del virus, sino posiblemente por una disfuncionalidad en el timo que es característica de la infección del VIH en niños y que ha sido propuesta como una de las posibles causas de la progresión rápida de la enfermedad (Resino y col., 2006b).

Sin embargo, en nuestros resultados podemos observar un aumento en el número de células TCD4⁺ vírgenes a medida que avanza el tratamiento (**Figura 4C y figura 4D**). La TAAE ha probado inducir una parcial restauración del sistema inmune que se correlaciona con un incremento en el volumen del timo (Vigano y col., 2000). La recuperación de los niveles de células TCD4⁺ totales en niños se debe principalmente a un aumento en la producción de células T vírgenes en el timo. Esto se ha evidenciado mediante numerosos estudios, donde se demostraron que existe un aumento importante en el número de células que migran desde el timo, y que poseen el fenotipo de linfocitos vírgenes (Douek y col., 2000; Carcelain y col., 2001; McCune, 2001; Resino y col., 2004; Resino y col., 2006b). Douek y col. (2000) describieron que en niños con una carga viral elevada, que no respondían a los antirretrovirales, el daño en el timo era mayor que los demás pacientes, incluso, el uso de antirretrovirales no ayudó a recuperar la función tímica de estos niños. Esto nos

indica que posiblemente, los pacientes pediátricos involucrados en este estudio respondieron a los antirretrovirales, mejorando la producción tímica de nuevas células TCD4⁺ y con ello recuperando parcialmente los niveles de estas células en sangre periférica.

Por otra parte vemos una disminución de linfocitos TCD4⁺ memoria en estos pacientes antes del TAAE en comparación a lo observado en niños sanos, se ha comprobado que en la infección pediátrica por el VIH, los linfocitos TCD4⁺ memoria se encuentran muy comprometidos, ya que el VIH infecta preferencialmente a estas células (Resino y col. 2001a). También es interesante observar en nuestros resultados que el número de células TCD4⁺ memoria también aumenta con el TAAE (**Figura 4D**). Posiblemente el incremento de esta subpoblación viene dada por el aumento en la proliferación de estas células, la cual ha sido comprobada en estudios previos (Lederman, 2001). De igual manera, el incremento de esta subpoblación pudiera ser atribuido a una disminución de la expresión de moléculas pro-apoptóticas, como lo demostramos con nuestros resultados de Fas (**Figura 7**) y PD-1 (**Figura 9**) en conjunto con un aumento de moléculas que inducen sobrevivencia celular (**Figura 11**), resultando en una disminución de la apoptosis de esta células.

En otro orden de ideas, numerosos reportes han descritos cambios en las células TCD8⁺ de pacientes infectados por el VIH. Se ha demostrado que el número total de linfocitos TCD8⁺ en sangre se encuentra elevado en niños VIH⁺ (Rabin y col., 1995). Lo antes expuesto concuerda con nuestros resultados, donde se ve que hay una mayor cantidad de estas células con respecto a los niños sanos (**Figura 4A y 4B**). Diversos estudios han evidenciado que la respuesta citotóxica es eficiente en eliminar el virus, a través de la producción de Perforina y granzimas que destruyen las células infectadas por el virus (Prendergast y col., 2012). El sistema inmune al reconocer el virus, establece diversos mecanismos para su eliminación, entre ellos, la proliferación y activación de linfocitos TCD8⁺; dando como resultado, un aumento en esta población con respecto a los niños

sanos. Además se ha sugerido que durante la infección por el VIH en pacientes sin tratamiento, los linfocitos TCD8⁺ activados se mantienen en circulación periférica, conllevando a un incremento de estas células con respecto a los linfocitos TCD4⁺ (Bujdoso y col., 1989; Bishop y col., 1990).

Igualmente, pudimos observar que a medida que avanza el tiempo del TAAE, hay un aumento en el porcentaje (**Figura 4A**) y valor absoluto (**Figura 4B**) de linfocitos TCD8⁺. Como sucede con las células TCD4⁺, el incremento de la población de células TCD8⁺ podría deberse a un aumento en la producción de células vírgenes como indican nuestros resultados (**Figura 4E y Figura 4F**), esto debido a la disminución en la carga viral (**Figura 5**) y a una posible mejora en las funciones tímicas, como demuestran trabajos previos (Vigano y col., 2000; Douek y col., 2000; Carcelain y col., 2001; McCune, 2001; Resino y col., 2004; Resino y col., 2006b). Asimismo, como sucede en el caso de las células TCD4⁺ memoria, nuestros resultados de células TCD8⁺ memoria (**Figura 4E y figura 4F**) indican que esta subpoblación también contribuye con el aumento generalizado de células TCD8⁺.

Como se describió previamente, una de las posibles causas de la destrucción de linfocitos TCD4⁺ es a través de mecanismos indirectos, donde se genera una mayor expresión de moléculas inductoras de apoptosis a medida que disminuyen moléculas asociadas a la sobrevivencia celular (Pantaleo y Fauci, 1995; Westendorp, 1995; Pantaleo y Fauci, 1996; McCune, 2001; Petrovas y col., 2006; Sharma y col., 2008). Es por ello que en este trabajo especial de grado quisimos estudiar la expresión de moléculas pro-apoptóticas: CD95 (Fas) y CD279 (PD-1), como también la molécula CD127 (IL-7R α), asociada a la sobrevivencia de linfocitos T.

La molécula Fas, también conocida como CD95 o APO-1, fue originalmente descrita como una molécula de superficie que podía mediar el proceso de muerte celular o Apoptosis en células malignas y benignas (Lynch y col., 1995). Esta molécula es un glicoproteína de membrana de 319

aminoácidos, cuya interacción con su ligando (Fas-L) induce activación de caspasas y condensación nuclear, lo que conduce finalmente a la célula a apoptosis (Itoh y col., 1991). El aumento en la expresión de CD95 que ocurre en las células T durante la infección por el VIH-1, fue uno de los primeros mecanismos descritos causales de la alta frecuencia de apoptosis en adultos (Katsikis y col., 1995; Mitra y col., 1996) y en niños VIH+ (Baumler y col., 1996). Cuando analizamos nuestros resultados de expresión *ex vivo* de CD95 (Fas) (**Figura 7**), evidenciamos que la misma se encuentra aumentada en los linfocitos TCD4+ de pacientes pediátricos VIH+ antes del tratamiento, con respecto a lo encontrado en niños sanos. Asimismo, demostramos que hay una alta expresión de esta molécula en la subpoblación de células TCD4+ memoria de niños sanos y niños VIH+ (antes del tratamiento).

Existen dos vías para explicar la sobreexpresión de CD95 en las células T; la primera de ellas, atribuye que la misma se da en respuesta a la activación linfocitaria, como un proceso fisiológico que contribuye a eliminar el exceso de células T efectoras durante la respuesta inmune (Lynch y col., 1995). En éste sentido, se ha propuesto que en infecciones crónicas como el VIH, donde existe una constante activación de células T y re-estimulación de las mismas (vía RCT), el mecanismo favorece la eliminación de las células específicas a VIH (Baumler y col., 1996). Asimismo, se demostró que las células T vírgenes expresan en bajas cantidades esta molécula, contrario a las células T memoria, las cuales fueron previamente activadas y que expresan una cantidad relativamente elevada de Fas (Miyawaki y col., 1992). La segunda vía es mediante la inducción directa a través de proteínas del VIH, que tienen el efecto de incrementar la expresión de CD95 en las células T no infectadas (Westendorp y col., 1995). Se ha demostrado que el gen Nef del VIH es esencial para la patogenicidad de este virus ya que induce la apoptosis (Xu y col., 1999).

Asimismo, la expresión del gen Tat del VIH y la glicoproteína viral gp120 sensibiliza a las células T al proceso de apoptosis a través de la CD95 (Westendorp y col., 1995).

Sin embargo, pudimos observar que existe una tendencia muy marcada en disminuir la expresión de CD95 en las células TCD4⁺ (totales, vírgenes y memoria), a medida que avanza el TAAE (**Figura 7**), confirmando resultados previos (Badley y col., 1998; Nasi y col., 2005). Si estos resultados son aplicados en nuestras observaciones, implicaría que la disminución en la carga viral de estos pacientes (**Figura 5**), promueve un decremento en la expresión de CD95 en estas células TCD4⁺, evidenciando que procesos directos e indirectos del virus están interviniendo de manera simultánea en este fenómeno.

Por otra parte, la molécula PD-1 también conocida como CD279, es un receptor transmembrana que posee 288 aminoácidos y su expresión puede ser inducida en células T, células B, células NK, monocitos activados y en células dendríticas. Este receptor fue originalmente purificado desde una línea de células T que exhibían alta sensibilidad a apoptosis y la interacción del mismo en conjunto con sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) produce señales inhibitorias que regulan el balance entre la activación de células T, tolerancia e inmunopatología (Keir y col., 2008). Actualmente el papel de esta molécula en la inmunopatología del VIH se encuentra en un intenso estudio, los cuales la mayoría de estos se han realizado en las células TCD8⁺ de adultos infectados (Day y col., 2006; Keir y col., 2008; Kaufman y col., 2009). Sin embargo, la relación entre la expresión de PD-1 en células TCD4⁺ y la infección por el VIH es importante de entender, porque el mal funcionamiento de estas células durante la infección crónica ha sido estrechamente relacionado con la replicación viral y la progresión de la enfermedad (D'Souza y col., 2007). Es por esto que quisimos estudiar el posible papel de esta molécula en pacientes pediátricos VIH+ antes y durante 22 meses del TAAE.

Analizando nuestros resultados de la expresión *ex vivo* de PD-1, pudimos observar que hay una alta expresión del receptor en las células TCD4⁺ total, virgen y memoria en los niños infectados (**Figura 9**). Se ha encontrado que en adultos infectados por el VIH hay una mayor expresión de PD-1 en las células TCD8⁺ específicas contra el VIH, la cual se correlaciona positivamente con la carga viral, resultando en una mayor deficiencia de estas células en controlar la replicación del virus (Day y col., 2006; Petrovas y col., 2006; Trauttman y col., 2006, Zhang y col., 2007). Asimismo, se ha descrito un aumento de esta molécula en células TCD4⁺ en pacientes adultos infectados por el VIH (D'Souza y col., 2007). Una de las principales características de la infección por el VIH, es la activación generalizada de células del sistema inmune, entre ellas, células T (Pantaleo y Fauci, 1995; Pantaleo y Fauci, 1996). Esto conlleva a la activación de mecanismos reguladores, entre ellos la expresión de moléculas como la PD-1 (Keir y col., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que en la infección por el VIH, la expresión de este receptor es mucho mayor a la encontrada en otras infecciones crónicas virales (Trauttman y col., 2006). Recientemente, se ha descrito que el VIH además podría inducir la expresión de PD-1 a través de proteínas virales Nef, indicando que el virus podría promover mecanismos inmunosupresores, aumentando la replicación viral y con ello a la progresión en la enfermedad (Muthumani y col., 2008).

Igualmente, nuestros resultados evidencian que el VIH posee un papel importante en la sobreexpresión de PD-1 en las células TCD4⁺ (Totales, vírgenes y memoria) de estos pacientes pediátricos. Pudimos observar una disminución importante en la expresión *ex vivo* de este receptor en los pacientes pediátricos bajo el TAAE hasta alcanzar niveles similares a lo encontrado en niños sanos (**Figura 9**), a medida que disminuye la carga viral (**Figura 5**). Trabajos previos demostraron que el uso de la TAAE en pacientes pediátricos y adultos infectados por el VIH, disminuye la expresión de PD-1 en linfocitos TCD8⁺ y TCD4⁺ (Trauttman y col., 2006; Day y col., 2006). Sin

embargo, Prendergast y col. (2012), demostraron que el aumento en la expresión de PD-1 en niños viene dado principalmente por la activación crónica producto de la infección por el VIH y no por la carga viral, como se observa en adultos. Aunque se han reportado numerosas disyuntivas en los valores de carga viral en niños progresores lentos y progresores rápidos (Shearer y col., 1997), todavía la carga viral en conjunto con los valores de células TCD4⁺ siguen siendo los parámetros utilizados para describir la progresión de la enfermedad en los pacientes VIH⁺ (Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children, 2012). Por último, nuestros resultados en conjunto con trabajos previos, indican que el uso de la expresión *ex vivo* de PD-1, podría ser usado como un posible marcador para predecir la recuperación de los niños infectados por el VIH.

Siguiendo este mismo orden de ideas, quisimos evaluar la expresión de la molécula CD127 (IL-7R α) durante este estudio, ya que puede jugar un papel importante en la inmunopatología del VIH en niños. El sistema inmune posee un control muy estrecho para el desarrollo y mantenimiento de las subpoblaciones de células T, el cual es esencial para la defensa del organismo. Desde su descubrimiento en 1988, muchas de las investigaciones han dado con dilucidar, casi por completo, el papel que ejerce la citocina IL-7, y su función clave para el desarrollo de los linfocitos T (Fry y col., 2005). El efecto de la IL-7 es controlado mediante la expresión de la subunidad alfa de su receptor (IL-7R α), ubicada en la superficie de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺. La unión de estos desencadena una serie de cascadas de señalizaciones que promueve la división celular (Bradley y col., 2005); por lo que su expresión durante la respuesta inmune está finamente regulada con cambios que dependerán de la madurez de la célula y de su estado de activación (Fry y col., 2005). El hecho que la señalización de la IL-7 sea críticamente dependiente de la expresión de CD127, nos sugiere que la regulación de la expresión del mismo juega un papel importante en la sobrevivencia celular y

funcionalidad de células T. Según nuestros resultados, los pacientes pediátricos presentaron niveles disminuidos y generalizados de expresión *ex vivo* de CD127 para todas las subpoblaciones de linfocitos TCD4⁺ (totales, vírgenes y memoria), en comparación con el grupo control (**Figura 11**). La pérdida en la expresión de este receptor, implica una disminución en la sobrevivencia, ya que se ha descrito la existencia de una relación entre el incremento de apoptosis y la disminución en la expresión de CD127 (Rethi y col., 2005; Dunham y col., 2008; Zhang y col., 2009). Además, la disminución de este receptor en pacientes VIH⁺ ha sido asociado con el grado de disminución de células TCD4⁺ en el organismos, incremento elevado de IL-7 en suero y disminución en la expresión de la molécula antiapoptótica BcL-2 (Fry y col., 2005; Rethi y col., 2005; Dunham y col., 2008; Zhang y col., 2009). Por último, se ha demostrado que la proteína Tat puede disminuir la expresión de este receptor (Faller y col., 2009)

Asimismo, en nuestro trabajo encontramos un aumento en la expresión *ex vivo* de CD127 en células TCD4⁺ (totales, vírgenes y memoria) de niños infectados por el VIH bajo el TAAE, lo que indica claramente que la disminución de la carga viral (**Figura 5**), normaliza los niveles de estos receptores, conllevando a una mayor sobrevivencia de células T. La disminución de la carga viral por efecto del TAAE, promueve una reducción en la activación crónica del sistema inmune, contribuyendo a la normalización en la expresión de este receptor el cual ha sido confirmado en trabajos previos realizados en adultos (MacPherson y col., 2001; Mojumdar y col., 2011). Por otra parte, el aumento de este receptor en las células TCD4⁺ memoria, le conferirá a estos pacientes una mayor probabilidad de sobrevivencia, pudiendo restituir, por la vía no dependiente del timo, la cantidad de linfocitos TCD4⁺ sanguíneo, manteniendo la homeostasis de su inmunidad celular (Resino y col., 2004).

Por último, nuestros resultados demuestran que hay un incremento en la frecuencia de apoptosis en las células TCD4⁺ de pacientes pediátricos antes del TAAE (**Figura 13**). El VIH promueve la destrucción de células T mediante apoptosis por mecanismos directos (a través de proteínas virales) o mecanismos indirectos (activación crónica del sistema inmune) (Badley y col., 2000; Bell y Dockrell; 2003; Février y col., 2011). Como hemos visto, las células de estos niños presentan un aumento en la expresión *ex vivo* de moléculas inductoras de apoptosis (Fas y PD-1) en conjunto con una disminución de moléculas asociadas a la sobrevivencia de células T (CD127), lo que podría explicar la alta frecuencia de apoptosis en estos niños antes del TAAE. Es interesante observar que al segundo mes de tratamiento, los niveles de apoptosis alcanzan valores similares a los niños sanos, lo que nos permite confirmar que efectivamente, el TAAE juega un papel muy importante durante la inmunopatología, al disminuir la carga viral y normalizando la expresión *ex vivo* de moléculas asociadas a la apoptosis. Asimismo, se ha demostrado que los inhibidores de la proteasa inhibe la apoptosis linfocitaria mediada por Fas, a través de la inhibición de los mecanismos apoptóticos mitocondriales (Sloand y col., 1999), ratificando la importancia del uso de estos antirretrovirales en la reconstitución del sistema inmune en estos pacientes. Finalmente, nuestro trabajo confirma que la apoptosis en esta infección viral es un proceso complejo, donde se involucran numerosos mecanismos que pueden estar actuando de manera simultánea, y que nos permite comprender de mejor manera la inmunopatología de la infección pediátrica por el VIH.

El otro enfoque que tiene nuestro trabajo es el estudio de los linfocitos Treg en el establecimiento de la respuesta inmune contra la vacuna BCG. Conocer los niveles de estas células en sangre periférica es por lo tanto necesario para tratar de dar respuesta a esta interrogante. En nuestro trabajo no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de Treg en niños VIH⁺ antes del tratamiento y niños sanos, posiblemente por la alta variabilidad en los datos

a consecuencia del bajo número de muestras; sin embargo, en promedio se observa una mayor cantidad de estas células en los pacientes pediátricos (**Figura 15**). Conociendo que esta subpoblación celular presenta funciones supresoras de la respuesta inmune, estos niveles elevados de Treg podrían darse como respuesta a la activación linfocitaria exacerbada en los pacientes VIH+, confirmando resultados previos (Caro y col., 2009; Bi y col., 2009; Freguja y col., 2011). Asimismo, se ha descrito que el VIH puede promover la activación de células Treg en estos pacientes, siendo estos susceptibles a la infección por el virus ya que también expresan el receptor CD4 y correceptores CCR5 y CXCR4 (Antons y col., 2008; Moreno-Fernández y col., 2009). En este mismo orden de ideas, numerosos autores han demostrado que la administración del TAAE normaliza los niveles de linfocitos Treg en los pacientes infectados por el VIH (Bi y col., 2009; Montes y col., 2011), lo que nos indica que los niveles de células Treg se correlacionan estrechamente con la carga viral y con el nivel de activación en el sistema inmune.

Para conocer si las células Treg generan algún impacto sobre el establecimiento de la respuesta inmune contra BCG, se procedió a realizar diferentes ensayos *in vitro* con el fin de evaluar algunos mecanismos efectores de linfocitos TCD4. La infección por el VIH como hemos descrito, genera numerosos cambios fenotípicos en las células T de estos pacientes, pudiendo entonces modificar la eficiencia en la purificación de estas células. Como se observa en la **figura 17**, el protocolo planteado nos permitió purificar las Treg. Asimismo, cuando analizamos la fracción enriquecida con células Treg, encontramos que la mayor parte de la misma expresaba el factor de transcripción FoxP3 (**resultados no mostrados**). De acuerdo con nuestros resultados, un creciente número de trabajos han demostrado que el uso del fenotipo CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} permite la purificación e identificación de células Treg en pacientes VIH+, en diferentes estados de la enfermedad (Seddiki y col., 2009; Venet y col., 2010; Hunt y col., 2011; Saison y col., 2012). Esto

último es importante, ya que nos permite confirmar que el uso de este fenotipo puede ser utilizado para el estudio de estas células en la inmunopatología del VIH, tomando en cuenta que es una técnica estandarizable y reproducible.

Cuando analizamos nuestros resultados de proliferación celular, encontramos que los linfocitos TCD4⁺ de los pacientes pediátricos VIH⁺ antes del tratamiento presentan una capacidad parcialmente disminuida de proliferar en presencia de la vacuna BCG y la proteína viral Gag (**Figura 19**). Se ha observado que la infección por el VIH produce alteraciones funcionales en las células T de los pacientes infectados (Appay y col., 2000; Palmer y col., 2004). Numerosos estudios afirman que la pérdida en la capacidad proliferativa se debe principalmente a los efectos citopáticos del virus *in vivo*, ya que las células TCD4⁺ específicas contra el VIH son infectadas “preferencialmente”, asimismo, la replicación viral en los cultivos pueden promover la destrucción de estas células (Palmer y col., 2002). Sin embargo, recientes trabajos sugieren que mecanismos directos e indirectos están involucrados en este fenómeno.

Numerosos autores han reportado que las células T de pacientes en fase crónica del VIH exhiben una pobre capacidad proliferativa *in vitro* contra antígenos del VIH (Lyasere y col., 2003; Palmer y col., 2004). En este mismo orden de ideas, el grupo de Arrode y col. (2005) demostraron que células TCD8⁺ exhiben una vigorosa proliferación contra antígenos de otros virus como el CMV, EBV y FLU, mas no contra antígenos del VIH, indicando una posible pérdida clonal durante la infección. El mecanismo exacto por el cual el VIH inhibe la replicación de células TCD4⁺ se desconoce y se cree que es multifactorial, algunos de estos incluyen: (1) Reducción de moléculas coestimuladoras como CD28, debido a la hiperactivación producto de la alta carga viral, (2) Proteínas virales como Nef, los cuales se han encontrado en mayores cantidades en pacientes con alta carga viral, la cual ha demostrado inhibir la producción de la IL-2 en células TCD4⁺ y (3)

Aumento en la expresión de moléculas CTLA-4 (Palmer y col., 2002; Kaufmann y col., 2007). En relación a este punto, nuestros resultados comprueban que las células de estos niños presentan una sobreexpresión de moléculas PD-1, que podría resultar en una pobre producción *in vitro* de IL-2, como lo demostró Trauttman y col. (2006).

La disminución en la carga viral en los pacientes VIH+ debería mejorar la capacidad de proliferación de las células T. Como se muestran en nuestros resultados la administración del TAAE en estos pacientes pediátricos VIH+ aumenta la respuesta proliferativa contra la vacuna BCG y la proteína viral Gag (**Figura19**). La supresión de la replicación viral producto del TAAE, ha demostrado aumentar este mecanismo efector de las células TCD4+ de pacientes VIH+ (Palmer y col., 2002; Palmer y col., 2004). Aunado a esto, nuestros resultados demuestran una disminución en la expresión *ex vivo* de PD-1 con el TAAE, lo que podría explicar parcialmente el incremento exacerbado en la proliferación de células TCD4+ contra estos antígenos.

Para caracterizar de mejor manera el establecimiento de la respuesta inmune contra la vacuna BCG, se procedió a medir las citocinas Th1 y Th2 en plasma y cultivos de células. En plasma no encontramos diferencias significativas en la producción de las mismas, posiblemente debido a que en el plasma hay una mayor dilución de las citocinas producidas localmente en los sitios de infección viral del organismo. Sin embargo, en cultivos de CMSP encontramos cambios en la producción de ciertas citocinas entre los grupos de estudios.

Se ha descrito que la pérdida en la funcionalidad de células TCD4+ que se observa en pacientes con VIH, ocurre de manera relativamente rápida después de la infección del virus. La infección por el VIH está asociada con una alteración en la producción *in vivo* de citocinas. Disminución en la secreción de citocinas específicas e incremento de otras, contribuyen a la progresión de la inmunodeficiencia asociada al VIH (Clerici y Shearer, 1993), indicando que la

infección viral y la replicación *in vivo* e *in vitro* se encuentra bajo una continua regulación de una compleja red de citocinas producidas por numerosas células (Kedzierska y Crowe, 2001). En este mismo orden de ideas, se ha demostrado que un perfil dominante de citocinas Th1 genera una mayor protección contra el VIH, cuando se compara con la respuesta Th2, por lo que ha sido descrito como un elemento crítico en la progresión de la enfermedad. Se ha descrito que en adultos VIH+ hay un cambio en el perfil de citocinas que producen, desde un perfil Th1 a Th2 (Clerici y Shearer, 1994). No obstante, otros trabajos han demostrado que aunque existen alteraciones en la producción de citocinas en pacientes VIH+, poca es la evidencia que sugiere un cambio de perfil de citocinas Th1 a Th2 (Graziosi y col., 1994), indicando alteraciones en la producción de ambos grupos de citocinas.

La IL-2 se ha identificado como un potente factor de crecimiento de las células T y ha sido considerada ampliamente como la citocina clave en las respuestas inmunes dependientes de los linfocitos T. Tanto las células T activadas como las células T reguladoras, expresan niveles elevados del receptor de la IL-2, el IL-2R, y la interacción con su ligando natural es responsable de la proliferación de las células T que se han activado por un antígeno (Mallek y Bayer, 2004). Como podemos observar en la **figura 23C**, la producción de esta citocina fue similar entre los pacientes pediátricos (antes y durante el TAAE) y el grupo control, bajo todas las condiciones de cultivo. Esto 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 han 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 sea el factor que determina la diferencia en la producción de la misma comparada con la obtenida de esos trabajos. 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). Asimismo, se ha demostrado que en niños VIH⁺ bajo el TAAE, hay un incremento en la producción de esta citocina, conllevando a una mejora en la proliferación celular y una disminución en la frecuencia de apoptosis. De igual manera, se ha observado una correlación positiva entre el número de células TCD4⁺ y la producción de IL-2 (Fan y col., 1997; Resino y col., 2001b). Esto último podemos comprobarlo con nuestros resultados de proliferación, donde se observa un aumento en la proliferación de células TCD4⁺ específicas contra la vacuna BCG y Gag, a medida que incrementa el número de células TCD4⁺ (totales, vírgenes y memoria) y disminuye la frecuencia de apoptosis, indicando que el TAAE podría aumentar la producción *in vitro* de esta citocina en pacientes pediátricos VIH⁺.

EL TNF- α es una de las moléculas más estudiadas en la infección por el VIH. Esta citocina con actividad proinflamatoria se ha encontrado en niveles muy altos, en cultivos *in vitro* de 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). Se ha encontrado que esta citocina induce fuertemente la transcripción de genes virales, a través de la activación y subsiguiente unión de factores de transcripción celulares, específicamente NF- κ B, a secuencias consenso presentes en la región promotora de la repetición terminal larga del genoma del VIH (Duh y col., 1989; Griffin y col., 1991; Muñoz-Fernandez y col., 1997). Sin embargo nuestros resultados muestran una menor producción (pero no significativa) de esta citocina en los pacientes antes del TAAE, en todas las condiciones de cultivo (**Figura 23D**). Esto pudiera ser contradictorio con lo antes expuesto, sin embargo, las funciones citotóxicas de los linfocitos TCD8⁺ dependen en parte de la producción de TNF- α . Se ha observado que la TNF- α promueve una mayor producción de perforina en células TCD8⁺ específicas

contra el VIH, por lo que su alta producción puede aportar una mayor protección a través de estos linfocitos (Appay y col., 2000; Badovinac y Harty, 2000). Asimismo, esta citocina promueve la activación y reclutamiento de la quimiocina RANTES que bloquea la infección de células TCD4⁺ por el VIH (Moriuchi y col., 1996). Esta contradicción obliga a realizar mayores estudios al respecto, aumentando el número de individuos a estudiar.

Asimismo, pudimos observar que al segundo mes del TAAE, aumentó la producción de esta citocina, pero seguidamente disminuye con el tiempo de administración del TAAE (**Figura 23D**). Una de las posibles explicaciones para estos resultados consiste en que la infección por el VIH genera alteraciones en la capacidad cooperadora de células TCD4⁺, conllevando a una disfunción en el establecimiento de los mecanismos citotóxicos de células TCD8⁺ (Pantaleo y Fauci, 1996). Por lo tanto el incremento en la producción de esta citocina durante los primeros meses del TAAE, posiblemente se debe a una mejor activación de estos mecanismos citotóxicos. Sin embargo, la disminución de 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 otra parte, se ha demostrado que el TNF- α es una citocina importante para el control de *M. tuberculosis*, a través de la activación de células T mediada por esta citocina (Nicod, 2007). Al analizar nuestros resultados de producción de TNF- α en presencia de la vacuna BCG, pudimos percatarnos que posee la misma tendencia observada en las demás condiciones de cultivo. Se han reportado la producción impar de esta citocina contra BCG en niños VIH⁺ (Mansoor y col., 2009), sin embargo, hasta ahora no existe ningún trabajo que haya estudiado la producción de esta citocina en niños VIH⁺ bajo el TAAE. Nuestros resultados podrían indicar que la producción de esta citocina se normaliza con lo observado en niños sanos, no obstante, sería interesante seguir estudiando este

fenómeno, aumentando el número de pacientes y el tiempo de estudio, para así confirmar lo antes descrito.

El IFN- γ es producido principalmente por las células TCD4⁺, TCD8⁺ y por las NK (Alfano y Poli, 2005). La literatura provee de evidencias contradictorias acerca de los efectos de la infección por el VIH sobre la producción de IFN- γ . Por un lado se ha visto que esta citocina puede promover la replicación del VIH (Biswas y col., 1992; Vitale y col., 2003), sin embargo, hay un mayor número de evidencias que sugieren que esta citocina posee efectos inhibitorios sobre el virus (Clerici y Shearer, 1993; Fan y col., 1997; Bailer y col., 1999). Pudimos observar que la producción *in vitro* de esta citocina en CMSP (**Figura 23E**) y células TCD4⁺ (**Figura 21**) en presencia de Gag es similar a lo encontrado en cultivos sin estímulo, pudiendo indicar que el establecimiento de este mecanismo efector contra este antígeno es deficiente en los pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante 22 meses del TAAE. En este mismo orden de ideas, se ha demostrado que en niños hay una menor producción de IFN- γ en comparación con los adultos, asimismo, la respuesta específica contra la proteína viral Gag incrementa en magnitud con la edad (Huang y col., 2008). Igualmente, se ha demostrado que las células TCD8⁺ son la subpoblación linfocitaria que posee una mayor capacidad de producción de IFN- γ , mucho más que la subpoblación de linfocitos TCD4⁺ (Prendergast y col., 2012), por lo que sería interesante estudiar cómo se encuentra la producción de esta citocina en linfocitos TCD8⁺ de pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante el TAAE, y comprobar si la misma se encuentra afectada en los niños VIH⁺ y si se recupera con la administración del TAAE.

Asimismo, pudimos observar que la producción de esta citocina en presencia de la vacuna BCG es similar entre los pacientes VIH⁺ (antes del tratamiento) y el grupo control. Una respuesta inmune contra micobacterias que protege eficazmente involucra principalmente a los linfocitos T que activan a macrófagos y sus funciones microbicidas, a través de la producción de IFN- γ (Flynn y Chan,

2001), por lo tanto, esta citocina juega un papel importante en la respuesta inmune contra la tuberculosis. Nuestros resultados evidenciaron una pobre producción de esta citocina en las CMSP (**Figura 23E**) y en células TCD4⁺ (**Figura21**) de niños VIH⁺ antes y durante el TAAE, como también en niños sanos. Una posible explicación es que es bien conocido que la 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 col. (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 más edad.

En cuanto a la producción de citocinas Th2, algunos investigadores, a diferencia de lo encontrado en nuestro estudio, han reportado un aumento de estas citocinas producidas por las CMSP de cultivo de pacientes infectados por el VIH (Clerici y Shearer, 1994). En relación a la IL-4, se ha demostrado que es sintetizada predominantemente por células TCD4⁺ activadas, pero también por células NK y basófilos. Estimula la activación y diferenciación de células B, secreción de IgG1 e IgGE, y expresión del CMH-II en células B y macrófagos (Kedzierska y Crowe, 2001). Numerosos estudios han demostrado un aumento en la producción de esta citocina en pacientes que viven con el VIH (Barcellini y col., 1994; Maggi y col., 1994). Asimismo, se ha descrito que la administración del TAAE, disminuye la expresión del ARNm de la IL-4 (Imami y col., 1999). Sin embargo, nuestros resultados muestran una producción basal de esta citocina en todas las condiciones de cultivos de CMSP de niños sanos y en pacientes pediátricos VIH⁺ antes y durante el TAAE (**Figura 23F**). En

este mismo orden de ideas, Ordway y col. (2004), lograron medir la producción de IL-4 después de 6 días de cultivo, lo que nos podría indicar que nuestro planteamiento metodológico no es el más apropiado para el estudio de esta citocina en las condiciones planteadas. Tomando los resultados previos en conjunto, podemos suponer que estos pacientes pediátricos antes del tratamiento presentaron mayores niveles de IL-4 que en niños sanos, y posiblemente se normalizó con la administración del TAAE, sin embargo, es necesario replantear el protocolo establecido en este trabajo, realizando ensayos de mayor tiempo de cultivo para lograr estudiar de manera correcta la producción de esta citocina en estos niños.

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria producida por una variedad de células, incluyendo células T, células B, macrófagos, fibroblastos y células endoteliales, en respuesta a infecciones bacterianas o virales. Posee un gran espectro de funciones incluyendo la estimulación de células B, diferenciación de monocitos e inducción de células productoras de IL-4 (Rincón y col., 1997). Se ha observado que el VIH puede promover el incremento en la producción de IL-6 en pacientes adultos VIH+ (Birn y col., 1990), asimismo, la estimulación con glicoproteínas virales gp120 y gp40 incrementa la producción *in vitro* de esta citocina (Takeshita y col., 1995; Capobianchi, 1996). Nuestros resultados muestran incongruencia con lo antes expuesto; pudimos observar que hay una menor producción *in vitro* en las CMSP de los niños VIH+ antes del TAAE en comparación a lo encontrado en el grupo control (**Figura 23G**). Numerosos autores han encontrado que la función de esta citocina depende casi exclusivamente de la TNF- α (Poli y col., 1990; Poli y col., 1994), lo que podría explicar la baja producción de esta citocina en estos pacientes, tomando en cuenta nuestros resultados de TNF- α (**Figura 23D**). Asimismo, observamos que incrementa al segundo mes del TAAE y tiende a disminuir en el tiempo, siguiendo un comportamiento similar a la producción de TNF- α . Es necesario reconocer que el incremento de esta citocina también se ha asociado a una

respuesta exacerbada en pacientes VIH⁺ debido a la presencia de patógenos oportunistas como el Citomegalovirus (CMV) (Humar y col., 1999) y *Mycobacterium avium* (Haas y col., 1998). Aunado a esto, se ha visto un aumento de esta citocina en individuos bajo el TAAE y con el Síndrome de Reconstitución Inmune (Stone y col., 2002), indicando que estos pacientes posiblemente producen grandes cantidades de esta citocina debido a la infección primaria del virus y las diferentes alteraciones en el sistema inmune que esto acarrea, entre ellos, poca capacidad inmunoregulatoria (Freguja y col., 2011). Por lo pudiéramos decir que los pacientes incluidos en este estudio no desarrollaron tal síndrome, reflejado por las bajas cantidades de IL-6.

La IL-10 es una citocina producida por células T y B activadas, monocitos y macrófagos. Inhibe la proliferación de células T, predominantemente mediante la supresión de la síntesis de citocinas Th1 e inhibe la activación de macrófagos (Moore y col., 2001). La producción de IL-10 es inducida *in vivo* e *in vitro* durante la infección por el VIH (Clerici y Shearer, 1993; Clerici y col., 1994). Asimismo, la gp120 y gp41 estimula el incremento en la secreción de IL-10 en macrófagos y monocitos, pero no en células T (Borghy y col., 1995; Schols y De Clerq, 1996; Barcova y col., 1998). Nuestros resultados indican que los pacientes pediátricos poseen una menor capacidad de producción de esta citocina (**Figura 23H**) en comparación al grupo control, sin embargo, aumenta su producción con el TAAE. Pantaleo y Fauci en su revisión del año 1996, la clasifican como una citocina que suprime la expresión del virus; porque si bien la IL-10 usualmente limita la producción de citocinas Th1, su actividad realiza un balance entre la protección y el daño en el sistema inmunológico, ya que regula la respuesta que se activa en la infección crónica del VIH. Aunado a esto, la IL-10 inhibe la apoptosis (Taga y col., 1993), un beneficio potencial en estos pacientes, por lo que su incremento con el TAAE puede inducir una mejora generalizada en estos pacientes. Por último, el aumento en la producción de esta citocina en presencia de la vacuna BCG, podría indicar

que el TAAE ayuda a normalizar la producción frente a este antígeno, beneficiando a estos pacientes con una mejor protección contra a la tuberculosis.

Finalmente, en ninguno de nuestros ensayos *in vitro* pudimos observar diferencias en los cultivos de CMSP sin Treg y con Treg de niños VIH+ y niños sanos. Numerosas evidencias sugieren que las células Treg de niños sanos promueven la disminución en la activación de la respuesta inmune frente a diversos antígenos (Karlson y col., 2004; Lee y col., 2007; Harris y col., 2008), lo que nos podría indicar que nuestros resultados se deben principalmente al bajo número de niños sanos incluidos en nuestro trabajo. Sin embargo, la infección por el VIH ha demostrado generar alteraciones en las funciones inmunorreguladoras de los linfocitos Treg. Como hemos descrito previamente, la infección en niños por el VIH genera una mayor disfunción del sistema inmune en comparación a lo observado en adultos, inclusive, se ha determinado que en niños infectados por transmisión vertical hay un mas rápido desarrollo de la enfermedad, en comparación a niños con infección post-natal, indicando que el desarrollo del sistema inmune después del nacimiento podría jugar un papel importante en mejorar el control viral y retardar la progresión de la enfermedad (Prendergast y col., 2012). Asimismo, las células Treg expresan el receptor CD4 y los co-receptores virales CCR5 y CXCR4 (Oswald-Richter y col., 2004; Antons y col., 2008), por lo tanto su actividad podría verse comprometida por esta infección, resultando en una reducción en la función supresora con negativas consecuencias en el paciente pediátrico. Aunado a esto, nuestros resultados han demostrado que el TAAE normaliza algunos mecanismos efectores en estos pacientes, sin embargo, la función supresora de las células Treg contra PHA, BCG y Gag aparentemente no se recuperan totalmente. Esto nos indica que el aumento en la probabilidad de desarrollar el Síndrome de Reconstitución Inmune, observada en pacientes VIH+ debido a la administración del TAAE, podría

deberse en parte a una pobre función supresora de estas células, conllevando a un incremento en la morbilidad producto a la vacunación por BCG.

Nuestros resultados en conjunto con trabajos previos demuestran que la infección por el VIH induce fuertes cambios en el número, fenotipo y funcionalidad de células TCD4⁺ de niños infectados, haciéndolos más susceptibles a enfermedades oportunistas. Sin embargo, la administración del TAAE normaliza algunos de estos factores, conllevando a una mejora cualitativa y cuantitativa del sistema inmune. Asimismo, la recuperación de los linfocitos TCD4⁺ que observamos en nuestro estudio nos permite deducir que la vacunación junto con el TAAE permite conferirle una mayor protección contra *M. tuberculosis* a través de una mejor respuesta inmune contra la vacuna BCG que observamos en los ensayos *in vitro*. No obstante, es necesario establecer protocolos estrictos sobre el seguimiento clínico de estos pacientes pediátricos, ya que la infección por el VIH podría inducir alteraciones en la función supresora de células Treg, con posibles consecuencias negativas en la salud de estos niños.

7. CONCLUSIONES

Nuestros resultados han demostrado que la administración del TAAE genera profundos cambios en la cantidad, fenotipo y funcionalidad de las células TCD4⁺ de niños infectados por el VIH. En este mismo orden de ideas, la infección pediátrica por el VIH produce una disminución importante tanto en valores absolutos como en porcentajes, de los linfocitos TCD4⁺ (totales, vírgenes y memoria) con respecto al grupo de niños sanos. Sin embargo, la administración del TAAE induce un incremento de estas subpoblaciones celulares a partir de los 2 meses del tratamiento antirretroviral. Asimismo, nuestros resultados confirman un aumento en las células TCD8⁺ (totales, vírgenes y memoria) de niños VIH⁺ antes del TAAE en comparación al grupo control e incrementa con la administración del TAAE en el tiempo.

En conjunto, se observó una mayor frecuencia de apoptosis en células TCD4⁺ de niños VIH⁺ antes del TAAE, posiblemente debido al incremento de moléculas pro-apotóticas (Fas y PD-1) en conjunto con una disminución de CD127. Sin embargo, pudimos comprobar que la administración del TAAE, induce un rápido decremento en la apoptosis de células TCD4⁺, posiblemente debido a la disminución que se observó en nuestros resultados en la expresión *ex vivo* de Fas y PD-1, y la normalización en la expresión de CD127.

Asimismo, encontramos alteraciones en algunas funciones efectoras de las células TCD4⁺. Los niños VIH⁺ poseen una disminuida capacidad proliferativa en las células TCD4⁺ en presencia de la vacuna BCG y la proteína viral Gag. No obstante, la administración del TAAE promueve un incremento en la capacidad de proliferar de estas células, indicando fuertemente que la infección por el VIH genera alteraciones importantes en este mecanismo efector y que la terapia antirretroviral mejora algunos parámetros inmunológicos específicos contra el antígeno BCG en estos pacientes.

En este mismo orden de ideas, encontramos una reducción generalizada en la producción basal de citocinas Th1 y Th2 en los sobrenadantes de CMSP en cultivo. La producción deficiente de estas citocinas podría ser una de las causas en el aumento de morbilidad ocasionada por la vacunación con BCG. No obstante, la administración del TAAE normaliza la producción de IL-6, IL-10 y TNF- α en el tiempo, lo que podría conferirles a estos pacientes mayor protección contra la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Por otra parte, no se observó cambios en la producción intracelular de IFN- γ en linfocitos TCD4⁺ y en sobrenadantes de CMSP, indicando que la recuperación de este mecanismo en estos pacientes pediátricos es mucho más complejo, lo que hace necesario mas estudios para determinar el papel de esta citocina en la vacunación por BCG en niños VIH⁺.

Nuestros resultados indican que la infección pediátrica por el VIH induce un aumento en la cantidad de células Treg en sangre periférica, posiblemente debido a la hiperactivación del sistema inmune gracias a la infección viral. Sin embargo, la disminución en la carga viral producto del TAAE induce un decremento en la cantidad de estas células, alcanzando valores similares a lo observado en niños sanos. Asimismo, el protocolo utilizado para la purificación de estas células en niños VIH⁺ y niños sanos, nos permitió realizar diferentes ensayos *in vitro* con el fin de estudiar estas células en la infección pediátrica por el VIH. Sin embargo, nuestros resultados indican que la infección vertical del virus genera una profunda disfunción en esta subpoblación celular, incluso después de 22 meses del TAAE. Asimismo, podría influenciar a largo plazo en la respuesta inmune contra BCG, aumentando la probabilidad de morbilidad asociada a esta vacunación.

Por último, nuestros resultados sugieren que la vacunación por BCG puede ser contraproducente en niños VIH⁺ debido a una pobre respuesta inmune contra la vacuna producto de la infección viral. Sin embargo, la administración del TAAE en estos pacientes puede normalizar

algunas funciones efectoras de células TCD4⁺, con la posibilidad de cierta protección a largo plazo contra *M. tuberculosis* en estos pacientes. Confirmamos junto con trabajos previos la necesidad de seguir vacunando a los niños VIH⁺, siempre y cuando tengan acceso temprano a los antirretrovirales, manteniendo protocolos estrictos en el seguimiento clínico de estos pacientes. Asimismo, la disfunción constante de las células Treg encontradas en nuestro trabajo incentiva a la investigación en pro de desarrollar terapias que busquen mejorar la función de esta importante subpoblación celular para la regulación de aquellos mecanismos inmunológicos alterados por la infección viral , lo que aumentaría la calidad de vida de los niños infectados por el VIH.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfano, M., y Poli, G. 2005. Role of Cytokines and Chemokines in the Regulation of Innate Immunity and HIV Infection. *Mol Immunol* **42**: 161-182.
2. Alfonzo, M.A., Blanc, D., Troadec, C., Eliasiewicz, M., Gonzales, G., Scott-Algara, D. 2003. Partial Restoration of Cytokine Profile Despite Reconstitution of Cytomegalovirus-Specific Cell-Mediated Immunity in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients During Highly Active Antiretroviral Treatment. *Scand J Immunol* **57**: 375-83.
3. Alfonzo, M.A. 2004. Beneficios y Desventajas de la Terapia Antirretroviral Altamente Activa (HAART): Otras Alternativas. *VITAE* **19**.
4. Altman, S.A., Randers, L. y Rao, G. 1993. Comparison of Trypan Blue Dye Exclusion and Fluorometric Assays for Mammalian Cell Viability Determinations. *Biotechnol* **9**: 671-674.
5. Amendola, A., Gougeon, M.L., Poccia, A., Bondurand, A., Fesus, L. y Piacentini, M. 1996. Induction of "Tissue" Transglutaminase in HIV Pathogenesis: Evidence of High Rate of Apoptosis of CD4+ Lymphocytes and Accessory Cells in Lymphoid Tissues. *Pro Natl Acad Sci USA* **93**: 11057-11062.
6. Andersson, J., Boasso, A., Nilsson, J., Zhang, R., Shire, N.J., Lindback, S., Shearer, G.M. y Chougner, C.A. 2005. Cutting Edge: The Prevalence of Regulatory T Cells in Lymphoid Tissue Correlated with Viral Load in HIV-infected Patients. *J Immunol* **174**: 3143-3147.
7. Andersen, P. y Doherty, T.M. 2005. The Success and Failure of BCG- Implications for a Novel Tuberculosis Vaccine. *Nature* **3**: 656-662.
8. Antons, A.K., Wang, R., Oswald-Richter, K., Tseng, M., Arendt, C.W., Kalams, S.A. y Unutmaz, D. 2008. Naïve Precursors of Human Regulatory T Cells Require FoxP3 for Suppression and Are Susceptible to HIV Infection. *J Immunol* **180**: 764-773.
9. Appay, V., Nixon, D.F., Donahose, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S. y colaboradores. 2000. HIV-Specific CD8+ T Cells Produce Antiviral Cytokines but Are Impaired in Cytolytic Function. *J Exp Med* **192**: 63-76.

10. Apoil, P.A., Puissant, B., Roubinet, F., Abbal, M., Massip, P., y Blancher, A. 2005. FoxP3 mRNA Levels Decreased in Peripheral Blood CD4+ T Lymphocytes from HIV-Positive Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* **39**: 381-385.
11. Arrode, G., Finke, J.S., Zebroski, H., Siegal, F.P., Steinman, R.M. 2005. CD8+ T Cells from Most HIV-1-Infected Patients, Even When Challenged with Mature Dendritic Cells, Lack Functional Recall Memory to HIV gag But no Other Viruses. *Eur J Immunol* **35**: 159-170.
12. Autran, B., Carcelain, G., Li, T.S., Blanc, C., Mathez, D., Tubiana, R., Katlama, C., Debré, P. y Leibowitch, J. 1997. Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4+ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease. *Science* **277**: 112-116.
13. Alpdogan, O., van den Brink, M.R. 2005. IL-7 and IL-15: Therapeutic Cytokines for Immunodeficiency. *Trends Immunol* **26**: 56-64.
14. Badley, A.D., Dockrell, D.H., Algeciras, A., Ziesmer, S., Landay, A., Lederman, M.M., Paya, C.V. y colaboradores. 1998. In Vivo Analysis of Fas/FasL Interactions in HIV-Infected Patients. *J Clin Invest* **1**: 79-87.
15. Badley, A.D., Pilon, A.A., Landay, A. y Lynch, D.H. 2000. Mechanisms of HIV-Associated Lymphocyte Apoptosis. *Blood* **96**: 2951-2964.
16. Badovinac, V.P. y Harty, J.T. 2000. Intracellular Staining for TNF and INF- γ Detects Different Frequencies of Antigen-Specific CD8+ T Cells. *J Immunol Methods* **238**: 107-117.
17. Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J. y Hafler, D.A. 2001. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* **167**: 1245-1253.
18. Bailer, R., Holloway, A., Sun, J., Margolick, J., Martin, M., Kostman, J. y Montaner, L. 1999. IL-13 and IFN-gamma Secretion by Activated T Cells in HIV-1 Infection Associated with Viral Suppression on a Lack of Disease Progression. *J Immunol* **162**: 7534-7542.
19. Baker, C.A., Clark, R., Ventura, F., Jones, N.G., Guzman, D., Bangsberg, D.R. y colaboradores. 2007. Peripheral Blood CD4 Loss of Regulatory T Cells Is Associated with Persistent Viremia in Chronic HIV Infection. *Clin Exp Immunol* **147**: 533-539.

20. Barcellini, W., Rizzardì, G., Borghi, M., Fain, C., Lazzarin, A. y Meroni, P. 1994. Th1 and Th2 Cytokine Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells from HIV-Infected Patients. *AIDS* **8**: 757-762.
21. Barcova, M., Kacani, L., Speth C. y Dierich, M. 1998. Gp41 Envelope Protein of Human Immunodeficiency Virus Induces Interleukin (IL)-10 in Monocytes, but not in B, T or NK Cells, Leading to Induces IL-2 and Interferon-Gamma Production. *J Infect Dis* **177**: 905-913.
22. Barnes, P.F., Bloch, A.B., Davidson P.T., Snider, D.E. 1991. Tuberculosis in Patients With Human Immunodeficiency Virus Infection. *New Eng J Med* **324**: 1644–1650.
23. Baumler, C.B., Bohler, T., Herr, I., Banner, A., Krammer, P.H. y Debatin, K.M. 1996. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) System in T Cells from Human Immunodeficiency Virus Type-1-Infected Children. *Blood* **88**: 1741-1746.
24. Beissert, S., Schwarz, A. y Schwarz, T. 2006. Regulatory T Cells. *J Invest Dermatol* **126**: 15-24.
25. Bell, D.J. y Dockrell, D.H. 2003. Apoptosis in HIV-1 Infection. *J Eur Acad Dermatol* **17**: 178-183.
26. Benedict, C.A., Norris, P.S. y Ware, C.F. 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature* **11**: 1013-1018.
27. Benito, J.M., López, M., Lozano, S., González-Lahoz, J. y Soriano, V. 2008. Down-Regulation of Interleukin-7 Receptor (CD127) in HIV Infection Is Associated with T Cell Activation and Is a Main Factor Influencing Restoration of CD4+ Cells after Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* **198**: 1466-1473.
28. Betts, M., Nason, M.C., West, S.N., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Koup, R.A. y colaboradores. 2006. HIV Nonprogressors Preferentially Maintain Highly Functional HIV-Specific CD8+ T Cells. *Blood* **107**: 4781-4789.
29. Bi, X., Suzuki, Y., Gatanaga, H. y Oka, S. 2009. High Frequency and Proliferation of CD4+FoxP3+ Treg in HIV-1 Infected Patients with Low CD4+ Counts. *Eur J Immunol* **39**: 301-309.

30. Birx, D., Redfield, R., Tencer, K., Fowler, A., Burke, D. y Tosato, G. 1990. Induction of Interleukin-6 During Human Immunodeficiency Virus Infection. *Blood* **76**: 2303-2310.
31. Bishop, D.K., Ferguson, R.M. y Orosz, C.G. 1990. Differential Distribution of Antigen-Specific Helper T Cells and Cytotoxic T Cell After Antigenic Stimulation In Vivo. *J Immunol* **144**: 1153-1160.
32. Biswas, P., Poli, G., Kinter, A.L., Justement, J.S., Stanley, S.K., Maury, W.J., Fauci, A.S. y colaboradores. 1992. Interferon Gamma Induces Expression of Human Immunodeficiency Virus in Persistently Infected Promonocytic Cells (U1) and Redirects The Production of Virions to Intracytoplasmatic Vacuoles in Phorbol Myrivate Acetate-Differentiated U1 Cells. *J Exp Med* **176**: 739-750.
33. Bohler, T., Wintergerst, U., Linde, R., Belohradsky, B.H. y Debatin, K.M. 2001. CD95 (Apo-1/Fas) Expression on Naïve CD4+ T Cells Increases with Disease Progression in HIV-Infected Children and Adolescents: Effects of Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). *Pediatr Res* **49**: 101-110.
34. Borghi, P., Fantuzzi, L., Varano, B., Gessani, S., Puddu, P., Conti, L., Belardelli, F. y colaboradores. 1995. Induction of Interleukin-10 by Human Immunodeficiency Virus Type 1 and It's gp120 Protein in Human Monocyte/Macrophages. *J Virol* **69**: 1284-1287.
35. Bradley, L.M., Haynes, L. y Swain, S.L. 2005. IL-7: Maintaining T-Cell Memory and Achieving Homeostasis. *Trends Immunol* **3**: 172-176.
36. Brinchmann, J.E. 2000. Differential Responses of T Cell Subsets: Possible Role in the Immunopathogenesis of AIDS. *AIDS* **14**: 1689-1700.
37. Bujdoso, R., Young, P., Hopkins, J., Allen, D. y McConnell, I. 1989. Non-Random Migration of CD4 and CD8 T Cells: Changes in the CD4:CD8 Ratio and Interleukin 2 Responsiveness of Efferent Lymph Node Cells Following In Vivo Antigen Challenge. *Eur J Immunol* **19**: 1779-1784.

38. Burke, A.P., Anderson, D., Benson, W., Turnicky, R., Mannan, P., Liang, Y.H., Smialek, J. y Virmani, R. 1995. Localization of Human Immunodeficiency Virus I RNA in Thymic Tissues from Asymptomatic Drug Addicts. *Arch Pathol Lab Med* **119**: 36-41.
39. Cao, W., Jamieson, B.D., Hultin, L.E., Hultin, P.M. y Detels, R. 2009. Regulatory T Cell Expansion and Immune Activation During Untreated HIV type 1 Infection are Associated with Disease Progression. *AIDS Res Hum Retrov* **25**: 183-191.
40. Capobianchi, M. 1996. Induction of Lymphomonocyte Activation by HIV-1 Glycoprotein gp120: Possible Role in AIDS Pathogenesis. *J Biol Reg Homeos Ag* **10**: 83-91.
41. Carcelain, G., Debré, P. y Autran, B. 2001. Reconstitution of CD4+ T Lymphocytes in HIV-Infected Individuals Following Antiretroviral Therapy. *Curr Opin Immunol* **13**: 483-488.
42. Card, C.M., McLaren, P.J., Wachih, C., Kimani, J., Plummer, F.A. y Fowke, K.R. 2009. Decreased Immune Activation in Resistance to HIV-1 Infection is Associated with and Elevated Frequency of CD4+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells. *JID* **199**: 1318-1322.
43. Carpenter, C.C., Fischl, M.A., Hammer, S.M., Hirsch, M.S., Jacobsen, D.M., Katzenstein, D.A., Montaner, J.S. y colaboradores. 1998. Antiretroviral Therapy for HIV Infection in 1998: Updated Recommendations of the International AIDS Society-USA Panel. *JAMA* **1**: 78-86.
44. Chilson, O.P. y Kelly-Chilson, A.E. 1989. Mitogenic Lectins Bind to the Antigen Receptor on Human Lymphocytes. *Eur J Immunol* **19**: 389-396.
45. Clerici, M. y Shearer, G. 1993. A Th1-Th2 Switch Is a Critical Step in the Etiology of HIV Infection. *Immunol Today* **14**: 107-111.
46. Clerici, M., Wynn, T.A., Berzofsky, J.A., Blatt, S.P., Hendrix, C.W., Sher, A., Coffman, R.L. y Shearer, G.M. 1994. Role of Interleukin-10 in T Helper Cell Dysfunction in Asymptomatic Individuals Infected with the Human Immunodeficiency Virus. *J Clin Invest* **93**: 768-775.
47. Clerici, M., Saresella, M., Colombo, F., Fossati, S., Sala, N., Bricalli, D., Billa, M.L. y colaboradores. 2000. T-Lymphocyte Maturation Abnormalities in Uninfected Newborns and Children With Vertical Exposure to HIV. *Blood* **96**: 3866-3871.

48. Colle, J.H., Moreau, J.L., Fontanet, A., Lambotte, O., Jousset, M., Delfraissy, J.F. y Theze, J. 2006. CD127 Expression and Regulation are Altered in the Memory CD8 T Cells of HIV-Infected patients – Reversal by Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). *Clin Exp Immunol* **143**: 398-403.
49. Connick, E., Lederman, M.M., Kotzin, B.L., Spritzler, J., Kuritzkes, D.R., St Clair, M., Sevin, A.D. y colaboradores. 2000. Immune Reconstitution in the First Year of Potent Antiretroviral Therapy and It's Relationship to Virologic Response. *J Infect Dis* **181**: 358-363.
50. Cooper, A.M., Dalton, D.K., Stewart, T.A., Griffin, J.P., Russell, D.G. y Orme, I.M. 1993. Disseminated Tuberculosis in Interferon Gamma Gene-disrupted Mice. *J Exp Med* **6**: 2243.
51. Crum, N.F., Riffenburgh, R.H., Wegner, S., Agan, B.K., Tasker, S.A., Spooner, K.M., Armstrong, A.W. y colaboradores. 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 Acquir Immune Defic Syndr* **41**: 194-200.
52. Chase, A.J., Yang, H., Zhang, H., Blankson, J.N. y Siciliano, R.F. 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. *J Virol* **82**: 8307-8315.
53. Chinen, J. y Shearer, W.T. 2002. Molecular Virology and Immunology of HIV Infection. *J Allergy Clin Immunol* **110**: 189-198.
54. Day, C., Kaufmann, D.E., Kiepiela, P., Brown, J.A., Moodley, E.S., Reddy, S., Mackey, E.W. y colaboradores. 2006. PD-1 Expression on HIV-Specific T Cells is Associated with T-Cell Exhaustion and Disease Progression. *Nature* **443**: 350-354.
55. Diane, V., Havlir, M.D. y Barnes, P.F. 1999. Tuberculosis in Patients with Immunodeficiency Virus Infection. *New Engl J Med* **340**: 367-373.
56. Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T. y Schuler, G. 2001. Ex Vivo Isolation and Characterization of CD4+CD25+ T Cells with Regulatory Properties from Human Blood. *J Exp Med* **193**: 1303-1310.

57. Dion, M.L., Poulin, J.F., Bordi, R., Sylvestre, M., Corsini, R., Kettaf, N., Dalloul, A. y colaboradores. 2004. HIV Infection Rapidly Induces and Maintains a Substantial Suppression of Thymocytes Proliferation. *Immunity* **21**: 757-768.
58. Douek, D.C., Koup, R.A., McFarland, R.D., Sullivan, J.L. y Luzuriaga, K. 2000. Effect of HIV in Thymic Function Before and After Antiretroviral Therapy in Children. *J Infect Dis* **181**: 1479-1482.
59. Douek, D.C., Brenchley, J.M., Betts, M.R., Ambrozak, D.R., Hill, B.J., Grossman, Z., Koup, R.A. y colaboradores. 2002. HIV Preferentially Infects HIV-Specific CD4+ T Cells. *Nature* **417**: 95-98.
60. Douek, D.C., Picker, L.J. y Koup, R.A. 2003. T Cell Dynamics in Hiv-1 Infection. *Annu. Rev. Immunol.* **21**: 265-304.
61. Duh, E.J., Maury, W.J., Folks, T.M., Fauci, A.S. y Rabson, A.B. 1989. Tumor Necrosis Factor α Activates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Through Induction of Nuclear Factor Binding to the NF- κ B Sites in the Long terminal Repeat. *P Natl Acad Sci USA* **86**: 5974-5978.
62. Dunham, R.M., Cervasi, B., Brenchley, J.M., Albrecht, H., Weintrob, A., Sumpter, B., Douek, D.C. y colaboradores. 2008. CD127 and CD25 Expression Defines CD4+ T Cell Subsets That Are Differentially Depleted During HIV Infection. *J Immunol* **180**: 5582-5592.
63. D'Souza, M., Fontenot, A.P., Mack, D.G., Lozupone, C., Dillon, S., Meditz, A., Wilson, C.C. y colaboradores. 2007. Programmed Death 1 Expression on HIV-Specific CD4+ T Cells Is Driven by Viral Replication and Associated with T Cell Dysfunction. *J Immunol* **179**: 1979-1987.
64. Eggena, M.P., Barugahare, B., Jones, N., Okello, M., Mutalya, S., Kityo, C. y colaboradores. 2005. Depletion of Regulatory T Cells in HIV Infection Is Associated with Immune Activation. *J Immunol* **174**: 4407-4414.
65. Eppel, H.J., Loddenkemper, C., Kunkel, D., Troger, H., Maul, J., Moos, V. y colaboradores. 2006. Mucosal but not Peripheral FoxP3+ Regulatory T Cells are Highly Increased in Untreated HIV Infection and Normalized After Suppressive HAART. *Blood* **108**: 3072-3078.

66. Estes, J.D., Li, Q., Reynolds, M.R., Wietgreffe, S., Duan, L., Schacker, T., Picker, L.J. y colaboradores. 2006. Premature Induction of an Immunosuppressive Regulatory T Cell Response during Acute Simian Immunodeficiency Virus Infection. *J Infect Dis* **193**: 703-712.
67. Faller, E., McVey, M., Kakal, J., MacPherson, A. 2006. Interleukin-7 Receptor Expression Is Down-Regulated by the HIV Tat Protein. *J Acquir Immune Defic Syndr* **43**: 257– 269.
68. Fan, J., Li, P., Kok, T. y Burrelo, C. 1997. AZT Blocks Down-Regulation of IL-2 and IFN-Gamma Gene Expression in HIV Infected Cells. *Arch Virol* **142**: 1035-1043.
69. Février, M., Dorgham, K. y Rebollo, A. 2011. CD4+ T Cell Depletion in Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Role of Apoptosis. *Viruses* **3**: 586-612.
70. Fluor, C., De Milito, A. y Fry, T. 2007. Potential Role for IL7 in Fas-Mediated T Cell Apoptosis During HIV Infection. *J Immunol* **178**: 5340 –5350.
71. Flynn, J.L., Chan, J., Triebold, K.J., Dalton, D.K., Stewart, T.A. y Bloom, B.R. 1992. An Essential Role of Interferon Gamma in Resistance to Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Exp Med* **6**: 2249-2254.
72. Flynn, J.L. y Chan, J. 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**: 93-129.
73. Frankel, A.D. y Young, J.A. 1998. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**: 1-25.
74. Freguja, R., Gianesin, K., Mosconi, I., Zanchetta, M., Carmona, F., Rampon, O., Giaquinto C. y De Rossi, A. 2011. Regulatory T Cells and Chronic Immune Activation in Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1)-Infected Children. *Clin Exp Immunol* **164**: 373-380.
75. Fry, T.J. y Mackall, C.L. 2005. The Many Faces of IL-7: From Lymphopoiesis to Peripheral T Cell Maintenance. *J Immunol* **174**: 6571-6576.
76. Gaulton, G.N., Scobie, J.V. y Rosenzweig, M. 1997. HIV-1 and The Thymus. *AIDS* **11**: 403-414.
77. Gibb, D.M., Newberry, A., Klein, N., de Rossi, A., Grosch-Woerner, I. y Babiker, A. 2000. Immune repopulation after HAART in Previously Untrated HIV-1 Infected Children. *Lancet* **355**: 1331-1332.

78. Gortmaker, S.L., Hughes, M., Cervia, J., Brady, M., Jhonson, G.M., Seage, G.R., Song, L.Y., y col. 2001. Effect of Combination Therapy Including Protease Inhibitors on Mortality Among Children and Adolescents Infected with HIV-1. *New Engl J Med* **345**: 1522-1528.
79. Graziosi, C., Pantaleo, G., Gantt, K.R., Fortin, J.P., Demarest, J.F., Cohen, O.J., Sekaly, R.P. y Fauci, A.S. 1994. Lack of Evidence for the Dichotomy of Th1 and Th2 Predominance in HIV-Infected Individuals. *Science* **265**: 248-252.
80. Greene, W. 1990. Regulation of HIV-1 Gene Expression. *Annu Rev Immunol* **8**: 453-475.
81. Griffin, G., Leung, K., Folks, T., Kundel, S y Nabel, G. 1991. Induction of NF-Kappa B During Monocyte Differentiation Is Associated With Activation of HIV-Gene Expression. *Res Virology* **142**: 233-238.
82. Grossman, Z. y Herberman, R.B. 1997. T-Cell Homeostasis in HIV Infection is Neither Failing nor Blind: Modified Cell Counts Reflect and Adaptative Response of the Host. *Nature* **3**: 483-490.
83. Haas, D.W., Lederman, M.M., Clough, L.A. Wallis, R.S., Chernoff, D. y Champton, S.L. Proinflammatory Cytokine and Human Immunodeficiency Virus RNA Levels During Early *Mycobacterium avium* Complex Bacteremia in Advanced AIDS. *J Infec Dis* **177**: 1746-1749.
84. Hammer, S.M., Squires, K.E., Hughes, M.D., Grimes, J.M., Demeter, L.M., Currier, J.S., Eron, J.J. y colaboradores. 1997. A Controlled Trial of Two Nucleoside Analogues Plus Indinavir in Persons With Human Immunodeficiency Virus Infection and CD4 Cell Counts of 200 Per Cubic Millimeter or Less. *New Engl J Med* **11**: 725-733.
85. Harris, P.R., Wright, S.W., Serrano, C., Riera, F., Duarte, I., Torres, J., Peña, A. y colaboradores. 2008. *Helicobacter pylori* Gastritis in Children Is Associated With a Regulatory T-Cell Response. *Gastroenterology* **134**: 491-499.
86. Hartigan-O'Connor, D.J., Poon, C., Sinclair, E. y McCune, J.M. 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. *J Immunol Methods* **319**: 41-52.

87. Hazenberg, M.D., Hamman, D., Schuitemaker, H. y Miedema, F. 2000. T Cell Depletion in HIV-1 Infection: How CD4+ T Cells Go Out of Stock. *Nature Immunol* **1**: 285-289.
88. Herbeuval, J.P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A.W., Vaccari, M., Cecchinato, V., Shearer, G.M. y col. 2009. HAART Reduces Death Ligands but not Death Receptors in Lymphoid Tissue of HIV-Infected Patients and Simian Immunodeficiency Virus-Infected Macaques. *AIDS* **23**: 35-40.
89. Hesseling, A.C., Marais, B.J., Gie, R.P., Schaaf, S., Fine, P.E., Godfrey-Faussett, P. y Beyer, N. 2007. The Risk of Disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) Disease in HIV-Infected Children. *Vaccine* **25**: 14-18.
90. Hirsch, C.S., Toossi, Z. y Othieno, C. 1999. Depressed T-Cell Interferon-Gamma Responses in Pulmonary Tuberculosis: Analysis of Underlying Mechanisms and Modulation with Therapy. *J Infect Dis* **180**: 2069-2073.
91. Hirsch, C.S., Yoneda, T., Averill, L., Ellner, J.J., Toossi, Z. 1994. Enhancement of Intracellular Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Human Monocytes by Transforming Growth Factor-Beta. *J Infect Dis* **170**: 1229-1237.
92. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M. y Markowitz, M. 1995. Rapid Turnover of Plasma Virions and CD4 Lymphocytes in HIV-1 Infection. *Nature* **373**: 123-126.
93. Holmes, D., Jiang, Q., Zhang, L. y Su, L. 2008. FoxP3 and Treg Cells in HIV-1 Infection and Immuno-pathogenesis. *Immunol Res* **41**: 248-266.
94. Holt, P.G. 2000. Antigen Presentation in the Lung. *Am J Respir Crit Care Med* **162**: 151-156.
95. Hori, S., Nomura, T. y Sakaguchi, S. 2003. Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor FoxP3. *Science* **299**: 1057-1061.
96. Hosaka, N., Oyaizu, N., Kaplan, M.H., Yagita, H. y Pahwa, S. 1998. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* **187**: 1030-1039.

97. Hu, H., Fernando, K., Ni, Houping y Weissman, D. HIV Envelope Suppress CD4+ T Cell Activation Independent of T Regulatory T Cells. *J Immunol* **180**: 5593-5600.
98. Huang, S., Dunkley-Thompson, J., Tang, Y., Macklin, E.A., Steel-Duncan, J., Singh-Minott, I., Feeney, M.E. y colaboradores. 2008. Deficiency of HIV Gag-Specific T Cells in Early Childhood Correlates with Poor Viral Containment. *J Immunol* **181**: 8103-8111.
99. Hunt, P.W., Landay, A.L., Sinclair, E., Martinson, J.A., Hatano, H., Emu, B., Norris, P.J. y colaboradores. 2011. A Low T Regulatory Cell Response May Contribute to Both Viral Control and Generalized Immune Activation in HIV Controllers. *Plos One* **6**: 1-10.
100. Humar, A., St Louis, P., Mazzulli, T., McGeer, A., Lipton, J., Messner, H. y MacDonalds, K.S. 1999. Elevated Serum Cytokines Are Associated with Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. *J Infect Dis* **179**: 484-488.
101. Iyasere, C., Tilton, J.C., Johnson, A.J., Younes, S., Yassine-Diab, B., Sekaly, R.P., Kwok, W.W. y colaboradores. 2003. Diminished Proliferation of Human Immunodeficiency Virus-Specific CD4+ T Cells is Associated with Diminished Interleukin-2 (IL-2) Production and Is Recovered by Exogenous IL-2. *J Virol* **70**: 10900-10909.
102. Imami, N., Anotonopoulos, C., Hardy, G., Gazzard, B. y Gotch, F. 1999. Assesment of Type 1 and Type 2 Cytokines in HIV Type 1-Infected Individuals: Impacts of Highly Active Antiretroviral Therapy. *AIDS Res Hum Retrov* **15**: 1499-1508.
103. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Nagata, S. y colaboradores. 1991. The Polypeptide Encode by de cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis. *Cell* **2**: 233-243.
104. Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reindhardt, R.L., Itano, A. y Pape, K.A. 2001. In Vivo Activation of An tigen-Specific CD4 T Cells. *Annu Rev Immunol* **19**: 23-45.
105. Jiang, H. y Chess, J. 2006. Regulation of Immune Responses by T Cells. *New Engl J Med* **354**: 1166-1176.

106. Ji, J. y Cloyd, M.W. 2009. HIV-1 Binding to CD4 on CD4+CD25+ Regulatory T Cells Enhances Their Suppressive Function in, Peripheral and Mucosal Lymphoid Tissues: An Additional Mechanism of Immunosuppression. *Int Immunol* **21**: 283-294.
107. Kaufmann, D.E., Kavanagh, D.G., Pereyra, F., Zaunders, J.J., Mackey, E.W., Rosenberg, E.S., Walker, B.D. y colaboradores. 2007. Upregulation of CTLA-4 by HIV-Specific CD4+ T Cells Correlates with Disease Progression and Defines a Reversible Immune Dysfunction. *Nat Immunol* **8**: 1246-1254.
108. Kaufmann, D.F. y Walker, B.D. 2009. PD-1 and CTLA-4 Inhibitory Cosignaling Pathways in HIV Infection and the Potencial for Therapeutic Intervention. *J Immunol* **10**: 5891-5897.
109. Kampmann, B., Tena-Coki, G., Nicol, M.P., Levin, M. y Eley, B. 2006. Reconstitution of Antimycobacterial Immune Responses in HIV-Infected Children Receiving HAART. *AIDS* **20**: 1011-1018.
110. Karlson, M.R., Rugtveit, J. y Brandtzaeg, P. 2004. Allergen-Responsive CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Children Who Have Outgrown Cow's Milk Allergy. *J Exp Med* **199**: 1679-1688.
111. Katsikis, P.D., Wunderlich, E.S., Smith, C.A., Herzenberg, L.A. y Herzenberg, L.A. 1995. Fas Antigen Stimulation Induces Marked Apoptosis of T Lymphocytes in Human Immunodeficiency Virus-Infected Individuals. *J Exp Med* **181**: 2029-2036.
112. Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J. y Sharpe, A.H. 2008. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu Rev Immunol* **26**: 677-704.
113. Kedzierska, K. y Crowe, S.M. 2001. Cytokines and HIV-1: Interactions and Clinical Implication. *Antivir Chem Chemoth* **12**: 133-150.
114. Kinter, A.J., Hennessey, M., Bell, A., Kern, S., Lin, Y., Daucher, M., Planta, M. y colaboradores. 2004. CD25+CD4+ Regulatory T Cells from the Peripheral Blood of Asymptomatic HIV-infected Individuals Regulate CD4+ and CD8+ HIV-specific T Cell Immune Responses In Vitro and Are Associated with Favorable Clinical Markers of Disease Status. *J Exp Med* **200**: 331-343.

115. Kirk, O. Reiss, P. Bickel, M. y col. 2002. Safe interruption of maintenance therapy against previous infection with four common HIV-associated opportunistic pathogens during potent antiretroviral therapy. *Ann J Respir Crit Care Med* **137**: 239-250.
116. Lanzavecchia, A. y Sallusto, F. 2000. Dynamics of T Lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors, and Memory Cells. *Science* **290**: 92-97.
117. Latchman, Y., Wood, C.R., Chmova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Freeman, G.J y colaboradores. 2001. PD-L2 is a Second Ligand of PD-1 and Inhibits T Cell Activation. *Nat Immunol* **2**: 261-268.
118. Lederman, M.M. 2001. Immune Restoration and CD4+ T-Cell Function with Antiretroviral Therapies. *AIDS* **15**: 11-15.
119. Lee, B.N., Lu, J.G., Kline, M.W., Paul, M., Doyle, M., Kozinetz, C, Shearer, W.T. y Reuben, J.M. 1996. Type 1 and Type 2 Cytokine Profiles in Children Exposed to o Infected With Vertically Transmitted Human Immunodeficiency Virus. *Clin Vaccine Immunol* **3**: 493-499.
120. Lee, J.H., Yu, H.H., Wang, L.C., Yang, Y.H., Lin, Y.T. y Chiang, B.L. 2007. The Levels of CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Paediatric Patients with Allergic Rhinitis and Bronchial Asthma. *Clin Exp Immunol* **148**: 53-63.
121. Legrand, F.A., Nixon, D.F., Loo, C.P., Ono, E., Chapman, J.M., Miyamoto, M., Diaz, R.S. y colaboradores. 2006. Strong HIV-1 Specific T Cell Responses in HIV-1 Exposed Uninfected Infants and Neonates Revealed after Regulatory T Cell Removal. *PloS One* **1**. 1-10.
122. Lewinsohn, D.A., Gennaro, M.L., Scholvinck, I. y Lewinsohn, D.M. 2004. Tuberculosis Immunology in Children: Diagnostic and Therapeutic Challenges and Opportunities. *Int J Tuberc Lung Dis* **8**: 658-674.
123. Li, T.S., Tubiana, R., Fillet, A.M., Autran, B. y Katlama, C. 1999. Negative Result of Cytomegalovirus Blood Culture with Restoration of CD4+ T Cell Reactivity to Cytomegalovirus After HAART in HIV-1 Infected Patients. *JAIDS* **20**: 514-515.
124. Li, S., Gowans, E.J., Chougnet, C., Plebanski, M. y Dittmer, U. 2008. Natural Regulatory T Cells and Persistent Viral Infection. *J Virol* **80**: 21-30.

125. Lichterfeld, M., Kaufmann, D.E., Yu, X.G., Mui, S.K., Addo, M.M., Johnson, M.N., Altfeld, M. y colaboradores. 2004. Loss of HIV-1-Specific CD8+ T Cell Proliferation after Acute HIV-1 Infection and Restoration by Vaccine-Induced HIV-1-Specific CD4+ T Cells. *J Exp Med* **6**: 701.
126. Lieberman, J., Shankar, P., Manjunath, N. y Andersson, J. 2001. Dressed to Kill? A Review of with Antiviral CD8 T Lymphocytes Fail to Prevent Progressive Immunodeficiency in HIV-1 Infection. *Blood* **98**: 1667-1677.
127. Lim, A., Tan, D., Price, P., Kamarulzaman, A., Tan, H.Y., James, I. y colaboradores. 2007. Proportion of Circulating T Cells with Regulatory Phenotype Increase with HIV-Associated Immune Activation and Remain High on Antiretroviral Therapy. *AIDS* **21**: 152-1534.
128. Liu, W., Putnam, A.L., Xu-yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Bluestone, J.A. y colaboradores. 2006. CD127 Expression Inversely Correlates with FoxP3 and Suppressive Function of Human CD4+ T reg Cells. *J Exp Med* **7**: 1701-1711.
129. Lyasere, C., Tilton, J.C. y Jhonson, A.J. 2003. Disminished Proliferation of Human Immunodeficiency Virus-Specific CD4+ T Cells Is Associated with Diminished Interleukin-2 (IL-2) Production and is Recovered by Exogenous IL-2. *J Virol* **77**: 10900-10909.
130. Lynch, D.H., Ramsdell, F. y Alderson, M.R. 1995. Fas and FasL in the Homeostatic Regulation of Immune Responses. *Immunol Today* **16**: 569-574.
131. MacPherson, P.A., Fex, C., Sanchez-Dardon, J., Hawley-Foss, N. y Angel, J.B. 2001. Interleukin-7 Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Reduced in HIV Infection and Partially Restored With Effective Antiretroviral Therapy. *JAIDS* **28**: 454-457.
132. Maggi, E., Mazzareti, M., Ravina, A., Annunziato, F., de Carli, M., Piccini, M., Manetti, R. y colaboradores. 1994. Ability of HIV to Promote a Th1 to Th0 Shift and to Replicate Preferentially in Th2 and Th0 Cells. *Science* **265**: 244-248.
133. Mallek, T.R. y Bayer, A.L. 2004. Tolerance, Not Immunity, Crucially Depends on IL-2. *Nat Rev Immunol* **4**: 665-674.

134. Mansoor, N., Scriba, T.J., Kock, M., Tameris, M., Abel, B., Keyser, A., Hanekom, W.A. y colaboradores. 2009. Infant HIV-1 Infection Severely Impairs the Bacille Calmette-Guerin Vaccine-Induced Immune Response. *J Infect Dis* **7**: 1-17.
135. Margolis, L., y Shattock, R. 2006. Selective Transmission of CCR5-Utilizing HIV-1: The Gatekeeper Problem Solved?. *Science* **4**: 312-317.
136. McCune, J.M. 1991. HIV-1: The Infective Process In Vivo. *Cell* **64**: 351-363.
137. McCune, J.M. 2001. The Dynamics of CD4+ T-cell Depletion in HIV Disease. *Nature* **410**: 974:978.
138. McMichael, A.J. y Rowland-Jones, S.L. 2001. Cellular Immune Responses to HIV. *Nature* **410**: 980-987.
139. Mezzaroma, I., Carlesimo, M., Pinter, E., Alario, C., Giovanna, S., Muratori, D., Aitui, F. y colaboradores. 1999. Long-term Evaluation of T-Cell Subsets and T-Cell Function After HAART in Advanced Stage HIV-1 Disease. *AIDS* **13**: 1187-1193.
140. Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W. y Radbruch, A. 1990. High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS. *Cytometry* **11**: 231-238.
141. Mitra, D., Steiner, M., Lynch, D.H., Staiano-Coico, L. y Laurence, J. 1996. HIV-1 Upregulates Fas Ligand in CD4+ T Cells *In Vitro* and *In Vivo*: Association with Fas-Mediated Apoptosis and Modulation by Aurintricarboxylic Acid. *Immunology* **87**: 581-585.
142. Miyawaki, T., Uehara, T., Nibu, U.R., Tsuji, T., Yachie, A., Yonehara, S. y Taniguchi, N. 1992. Differential Expression of Apoptosis-Related Fas Antigen on Lymphocyte Subpopulation in Human Peripheral Blood. *J Immunol* **149**: 3753-3758.
143. Mojumdar, K., Vajpayee, M., Chauhan, N.K., Singh, A., Singh, R. y Kurupati, S. 2011. Loss of CD127 and Increased Immunosenescence of T Cell Subsets in HIV Infected Individuals. *Indian J Med Res* **134**: 972-981.

144. Molloy, A., Laochumroonvorapong P, Kaplan G. 1994. Apoptosis but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing intracellular bacillus Calmete-Guerin. *J Exp Med* **180**: 1499-1509.
145. Montes, M., Lewis, D.E., Sanchez, C., de Castilla, D.L., Graviss, E.A., Seas, C. y colaboradores. 2006. FoxP3+ Regulatory T Cells in Antiretroviral-naive HIV Patients. *AIDS* **20**: 1669-1671.
146. Montes, M., Sanchez, C., Lewis, D.E., Graviss, E.A., Seas, C., Gotuzzo, E. y White Jr, C. 2011. Normalization of FoxP3+ Regulatory T Cells in Response to Effective Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis* **203**: 496-499.
147. Moore, K., Waal Malefyt, R., Coffman, R. y O'Garra, A. 2001. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
148. Mora, S. y Corado, J.A. 2003. *Inmunología Actual: Bases Fisiológicas para la Comprensión de las Alteraciones del Sistema Inmunitario*. Alfa Impresiones, Primera Edición, Valencia, Venezuela.
149. Moreno-Fernandez, M.E., Zapata, W., Blackard, J.T., Franchini, G. y Chougnet, C.A. 2009. Human Regulatory T Cells Are Target for Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection, and Their Susceptibility Differs Depending on the HIV 1 Strain. *J Virol* **83**: 12925-12933.
150. Moreno-Fernandez, M.E., Rueda, C.M. y Chougnet, C.A. 2011. Regulatory T Cells Control HIV Replication in Activated T cells through a cAMP-Dependent Mechanism. *Immunobiology* **117**: 5372-5380.
151. Moriuchi, H., Moriuchi, M., y Fauci, A.S. Nuclear Factor- κ B Potentially Up-Regulates the promoter activity of RANTES, a Chemokine That Blocks HIV Infection. *J Immunol* **158**: 3483-3491.
152. Mossmann, T.R. y Sad, S. 1996. The Expanding Universe of T-Cell Subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* **14**: 138-146.

153. Mozos, A., Garrido, M., Carreras, J., Plana, M., Diaz, A., Alos, L. y colaboradores. 2007. Redistribution of FoxP3-Positive Regulatory T Cells from Lymphoid Tissues to Peripheral Blood in HIV-Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* **46**: 529-537.
154. Muñoz-Fernandez, M., Navarro, J., Garcia, A., Punzon, C., Fernandez-Cruz, E. y Fresno, M. 1997. Replication of Human Immunodeficiency Virus-1 In Primary Human T Cells Is Dependent on the Autocrine Secretion of Tumor Necrosis Factor Through the Control of Nuclear Factor-Kappa B Activation. *J Allergy Clin Immunol* **100**: 838-845.
155. Murphy, K., Travers, P. y Walport, M. 2009. Inmunobiología de Janeway. Mc Graw Hill, Séptima Edición, México.
156. Muthumani, K., Choo, A. Y., Shedlock, D. J., Laddy, D.J., Sundaram, S.G., Hirao, L., Weiner, D.B. y colaboradores. 2008. HIV-1 Nef Induces Programmed Death (PD-1) Expression Through a p38 MAPK Dependent Mechanism. *J Virol* **82**: 11536-11544.
157. Nasi, M., Pinti, M., Bugarini, R., Troiano, L., Lugli, E., Bellodi, C., Mussini, C. y colaboradores. 2005. Genetic Polymorphisms of Fas (CD95) and Fas Ligand (CD178) Influence the Rise in CD4+ T Cell Count After Antiretroviral Therapy in Drug-Naïve HIV-Infected Patients. *Immunogenetics* **57**: 628-635.
158. Nicod, L.P. 2007. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **137**: 357-362.
159. Ninane, J., Grymonprez, A., Burtonboy, G., Francois A. y Cornu, G. 1988. Disseminated BCG in HIV Infection. *Arch Dis Child* **63**: 1268-1269.
160. Nilsson, J., Boasso, A., Velilla, P.A., Zhang, R., Vaccari, M., Franchini, G., Shearer, G.M., Andersson, J. y Chougnet, C. 2006. HIV-1 Driven Regulatory T-cell Accumulation in Lymphoid Tissues is Associated with Disease Progression in HIV-AIDS. *Immunobiology* **108**: 3808-3817.
161. Obaro, S.K., Pugatch, D. y Luzuriaga, K. 2004. Immunogenicity and Efficacy of Childhood Vaccines in HIV-1-Infected Children. *Lancet Infect Dis* **4**: 510-518.

162. Oettinger, T., Jorgensen, M., Ladefoged, A., Haslov, K. y Andersen, P. 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine: Review of the Historical and Biochemical Evidence for a Genealogical Tree. *Tuber Lung Dis* **79**: 243–250.
163. ONUSIDA. 2010. Global Report: UNAIDS Report on the Global AIDS Epidemic. Disponible en: http://www.unaids.org/globalreport/documents/20101123_GlobalReport_full_en.pdf.
164. Ordway, D.J., Costa, L., Martins, M., Silveira, H., Amaral, L., Arroz, M.J., Ventura, F.A. y Dockrell, H.M. 2004. Increased Interleukin-4 Production by CD8 and $\gamma\delta$ T Cells in Health-Care Workers Is Associated with the Subsequent Development of Active Tuberculosis. *J Infect Dis* **190**: 756-766.
165. Oswald-Richter, K., Grill, S.M., Shariat, N., Leelawong, M., Sundrud, M.S., Haas, D.W. y Unutmaz, D. 2004. HIV Infection of Naturally Occurring and Genetically Reprogrammed Human Regulatory T Cells. *Plos Biol* **2**: 955-966.
166. Palmer, B.E., Boritz, E., Blyveis, N. y Wilson, C.C. 2002. Discordance Between Frequency of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific Gamma Interferon-Producing CD4+ T Cells and HIV-1 Specific Lymphoproliferation in HIV-1-Infected Subjects with Acute Viral Infection. *J Virol* **76**: 5925-5936.
167. Palmer, B.E., Boritz, E. y Wilson, C.C. 2004. Effects of Sustained HIV-1 Plasma Viremia on HIV-1 Gag-Specific CD4+ T Cell Maturation and Function. *J Immunol* **172**: 3337-3347.
168. Panel on Antiretroviral Therapy and Medical Management of HIV-Infected Children. 2012. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection. Disponible en: <http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/pediatricguidelines.pdf>.
169. Pantaleo, G. y Fauci, A.S. 1995. New Concepts in the Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 487-512.
170. Pantaleo, G. y Fauci, A.S. 1996. Immunopathogenesis of HIV Infection. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**:825-54.
171. Petrovas, C., Casazza, J.P., Brenchley, J.M., Price, D.A., Gostick, E., Adams, W.C., Precopio, M.L. y colaboradores. 2006. PD-1 is a Regulator of Virus-Specific CD8+ T Cell Survival in HIV infection. *J Exp Med* **10**: 2281-2292.

172. Poli, G., Bressler, P., Kinter, A., Duh, E., Timmer, W.C., Rabson, A., Fauci, A.S. y colaboradores. 1990. Interleukin 6 Induces Human Immunodeficiency Virus Expression in Infected Monocytic Cells Alone and In Synergy With Tumor Necrosis Factor Alpha by Transcriptional and Post-Transcriptional Mechanism. *J Exp Med* **172**: 151-158.
173. Poli, G., Kinter, A. y Fauci, A. 1994. Interleukin 1 Induces Expression of the Human Immunodeficiency Virus Alone and in Synergy with Interleukin 6 in Chronically Infected U1 Cells: Inhibition of Inductive Effects by the Interleukin 1 Receptor Antagonist. *P Natl Acad Sci USA* **91**: 108-112.
174. Poranen, M., Daugelavicius, R. y Bamford, D. 2002. Common Principles in Viral Entry. *Annu Rev Microbiol* **56**: 521-538.
175. Powderly, W.G. 2000. Prophylaxis for Opportunistic Infections in an Era of Effective Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis* **31**: 597-601.
176. Prendergast, A., Klenerman, P. y Goulder, P.J. 2012. The Impact of Differential Antiviral Immunity in Children and Adults. *Nat Rev Immunol* **12**: 636-648.
177. Rabin, R.L., Roeder, M., Maldonado, Y., Petru, A., Herzenberg, L.A. y Herzenberg, L.A. 1995. Altered Representation of Naive and Memory CD8 T Cell Subsets in HIV-Infected Children. *J Clin Invest* **95**: 2054-2060.
178. Renaud, M., Katlama, C., Mallet, A., Calvez, V., Carcelain, G., Tubiana, R., Jouan, M. y colaboradores. 1999. Determinants of Paradoxical CD4 Cell Reconstitution After Protease Inhibitor Containing Antiretroviral Regimen. *AIDS* **13**: 669-676.
179. Resino, S., Navarro, J., Bellón, M., Gurbindo, D., León, A. y Muñoz-Fernandez, A. 2001a. Naive and Memory CD4+ T Cells and T Cell Activation Markers in HIV-1 Infected Children on HAART. *Clin Exp Immunol* **125**: 266-273.
180. Resino S., Bellón, J.M., Gurbindo, D. y Muñoz-Fernández, M.A. 2001b. Disruption in Cytokine and Chemokine Production by T-Cells in Vertically HIV-1 Infected Children. *Acta Paediatr* **90**: 989-997.

181. Resino, S., Galán, I., Pérez, A., León, J.A., Seoane, E., Gurbindo, D. y Muñoz, M.A. 2004. HIV-Infected Children with Moderate/Severe Immune-Suppression: Changes in the Immune System After Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Exp Immunol* **137**: 570-577.
182. Resino, S., Resino, R., Micheloud, D., Gutierrez, D.G., León, J.A., Tamos, J.T., Ciria, L. y colaboradores. 2006a. Long-Term Effects of Highly Active Antiretroviral Therapy in Pretreated, Vertically Type 1-Infected Children: 6 Years of Follow Up. *Clin Infect Dis* **42**: 862-869.
183. Resino, S., Seoane, E., Pérez, A., Ruiz-Mateos, E., Leal, M. y Muñoz-Fernandez, M.A. 2006b. Different Profiles of Immune Reconstitution in Children and Adults with HIV-Infection After Highly Active Antiretroviral Therapy. *BMC Infect Dis* **6**: 112-119.
184. Rethi, B., Fluor, C., Atlas, A., Kryzowska, M., Mowafi, F., Grutzmeier, S., De Milito, A. y colaboradores. 2005. Loss of IL-7R α Is Associated with CD4 T-Cell Depletion, High Interleukin-7 Levels and CD28 Down-Regulation in HIV Infected Patients. *AIDS* **19**: 2077-2086.
185. Rinaldo, C.R., James, J., Liebmann, M., Huang, X.L., Fan, Z., Al-Shboul, Q., McMahon, D.K. y colaboradores. 1999. Prolonged Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Viremia in Persons with Advanced Disease Results in Enhancement of CD4 T Cell Reactivity to Microbial Antigens but Not to HIV-1 Antigens. *J Infect Dis* **179**: 329-336.
186. Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. y Flavell, R. 1997. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4 Producing CD4+ T Cells. *J Exp Med* **185**: 461-469.
187. RSCMV. 2011. Datos epidemiológicos de la tuberculosis en el mundo y Venezuela. Disponible en: <http://www.aipop.org/site/uploads/c9d3ab42-50e2-46aa.pdf>.
188. Roger, P.M., Breitmayer, J.P., Arlotto, C., Pugliese, P., Pradier, C., Bernard-Pomier, G. Dellamonica, P. y Bernard, A. 1999. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) Is Associated with a Lower Level of CD4+ T Cell Apoptosis in HIV-Infected Patients. *Clin Exp Immunol* **118**: 412-416.

189. Romagnani, S., Del Petre, G., Manetti, R., Ravina, A., Annunziato, F., De Carli, M., Maggi, E. y colaboradores. 1994. Role of Th1/Th2 Cytokines in HIV Infection. *Immunol Rev* **140**: 73-92.
190. Romagnani, S. 1997. The Th1/Th2 Paradigm. *Immunol Today* **6**: 236-266.
191. Rook, G.A. y Hernandez-Pando, R. 1996. The Pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* **50**: 259-284.
192. Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalams, S.A. y Walker, B.D. 1997. Vigorous HIV-1 Specific CD4+ T Cell Responses Associated with Control of Viremia. *Science* **278**: 1447-1450.
193. Rosenberg, Z.F. y Fauci, A.S. 1989. Immunopathogenic Mechanisms of HIV Infection. *Clin Immunol Immunop* **50**: 149-156.
194. Rosignoli, G., Cranage, A., Burton, C., Nelson, M., Steel, A., Gazzard, B., Gotch, F. y Imami, N. 2007. Expression of PD-L1, a Marker of Disease Status, is not Reduced by HAART in Aviremic Patients. *AIDS* **21**: 1363-1381.
195. Sallusto, F., Mackay, C.R., Lanzavecchia, A. 2000. The Role of Chemokine Receptors in Primary, Effector, and Memory Immune Responses. *Annu Rev Immunol* **18**: 593-620.
196. Sanders, E.J., Varedi, M. y French, S. 1993. Cell Proliferation in the Gastrulating Chick Embryo: A Study Using BrdU Incorporation and PCNA Localization. *Development* **118**: 389-399.
197. Saison, J., Demaret, J., Fabienne, V., Chidiac, C., Malcus, C., Poitevin-Later, F., Monneret, G. y colaboradores. 2012. CD4+CD25+CD127- Assessment as A Surrogate Phenotype for FoxP3+ Regulatory T Cells in HIV-1 Infected Viremic and Aviremic Subjects. *Cytom Part B-Clin Cy* **84**: 50-54.
198. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y. y colaboradores. 2001. Immunologic Tolerance Maintained by CD25+ CD4+ Regulatory T Cells: Their Common Role in the Controlling Autoimmunity, Tumor Immunity, and Transplantation Tolerance. *Immunol Rev* **182**: 18-32.

199. Sakaguchi, S. 2004. Naturally Arising CD4+ Regulatory T Cells for Immunologic Self-Tolerance and Negative Control of Immune Response. *Annu Rev Immunol* **22**: 531-562.
200. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. y Masahiro, O. 2008. Regulatory T Cells and Immune Response. *Cell* **133**: 775-787.
201. Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. y Hafler, D.A. 2010. FOXP3+ Regulatory T Cells in the Human Immune System. *Nat immunol* **10**: 490-500.
202. Schols, D. y De Clerq, E. 1996. Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Induces Anergy in Human Peripheral Blood Lymphocytes by Inducing Interleukin-10 Production. *J Virol* **70**: 4953-4960.
203. Seddiki, N., Santer-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M. y colaboradores. 2006. Expression of Interleukin (IL)-2 and IL-7 Receptors Discriminates Between Human Regulatory and Activated T Cells. *J Exp Med* **203**: 1693-1700.
204. Seddiki, N., Sasson, S.C., Santer-Nanan, B., Munier, M., van Bockel, D., Ip, S., Marriott, D., Kelleher, A.D. y colaboradores. 2009. Proliferation of Weakly Suppressive Regulatory CD4+ T Cells Is Associated With Over-Active CD4+ T-Cell Responses in HIV-Positive Patients with Mycobacterial Immune Restoration Disease. *Eur J Immunol* **39**: 391-403.
205. Sharma, T.S., Hughes, J., Murillo, A., Riley, J., Soares, A., Little, F., Mitchell, C.D. y Hanekom, W.A. 2008. CD8+ T Cell Interleukin-7 Receptor Alpha Expression as a Potential Indicator of Disease Status in HIV-Infected Children. *Plos One* **12**: 1-7.
206. Shearer, W.T., Quinn, T.C., LaRussa, P., Lew, J.F., Mofenson, L., Almy, S., Rich, K. y colaboradores. 1997. Viral Load and Disease Progression in Infants Infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. *New Engl J Med* **336**: 1337- 1342.
207. Sloand, E.M., Kumar, P.N., Kim, S., Chaudhuri, A., Weichold, F.F. y Young, N.S. 1999. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor Modulates Activation of Peripheral Blood CD4+ T Cells and Decreases Their Susceptibility to Apoptosis in Vitro and in Vivo *Blood* **94**: 1021-1027.
208. Soares, A.P., Scriba, T.J., Joseph, S., Harbacheuski, R., Murray, R.A., Gelderbloem, S.J., Hanekom, W.A. y col. 2008. Bacille Calmette Guerin Vaccination of Human Newborns

- Induces T Cells with Complex Cytokine and Phenotypic Profiles. *J Immunol* **180**: 3569-3577.
209. Sportes, C., Hakin, F.T., Memon, S.A., Zhang, H., Chua, K.S., Brown, M.R., Fleisher, T.A. y colaboradores. 2008. Administration of rhIL-7 in Humans Increases In Vivo TCR Repertoire Diversity by Preferential Expansion of Naïve T Cell Subsets. *J Exp Med* **7**: 1701-17014.
210. Sprent, J., Tough, D.F., Sun, S. 1997. Factors Controlling the Turnover of T Memory Cells. *Immunol Rev* **156**: 79-85.
211. Sprent, J. y Tough, D. 2001. T Cell Death and Memory. *Science* **293**: 245-248.
212. Sprent, J. y Surh, C. 2002. T Cell Memory. *Annu Rev Immunol* **20**: 551-579.
213. Stevenson, M., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P. y Lamonica, C.A. 1990. HIV-1 Replication Is Controlled at the Level of T Cell Activation and Proviral Integration. *EMBO J* **9**: 1551-1560.
214. Stone, S.F., Price, P., Keane, N.M., Murray, R.J. y French, M.A. 2002. Levels of IL-6 and Soluble IL-6 Receptor Are Increased in HIV Patients with a History of Immune Restoration Disease After HAART. *HIV Med* **3**: 21-27.
215. Streeck, H., Brumme, Z.L., Anastario, M., Cohen, K.W., Jolin, J.S., Meier, A., Rosenberg, E.S., Altfeld, M. y colaboradores. 2008. Antigen Load and Viral Sequence Diversification Determine the Functional Profile of HIV-1-Specific CD8+ T Cells. *Plos Med* **5**: 790-804.
216. Su, L., Kaneshima, H., Bonyhadi, M., Salimi, S., Kraft, D., Rabin, L. y McCune, J.M. 1995. HIV-1 Induced Thymocyte Depletion Is Associated with Indirect Cytopathicity and Infection of Progenitor Cells In Vivo. *Immunity* **2**: 25-36.
217. Taga, K., Cherney, B. y Tosato, G. 1993. IL-10 Inhibits Apoptotic Cell Death in Human T Cells Starved of IL-2. *Int Immunol* **5**: 442-449.
218. Takeshita, S., Breen, E., Ivashchenko, M., Nishinian, P., Kishimoto, T., Vredevoe, D. y Martinez-Maza, O. 1995. Induction of IL-6 and IL-10 Production by Recombinant HIV-1 Envelope Glycoprotein 41 (gp41) in the THP-1 Human Monocyte Cell Line. *Cell Immunol* **165**: 234-242.

219. Tang, H., Kuhen, K. y Staal, F. 1999. Lentivirus Replication and Regulation. *Annu Rev Genet* **33**: 133-170.
220. Than S., Hu, R., Oyaizu, N., Romano, J., Wang, X., Sheikh, S., Phwa, S. 1996. Cytokine Pattern in Relation to Disease Progression in Human Immunodeficiency Virus-Infected Children. *K Infect Dis* **1**: 47-56.
221. Thompson, C. y Powrie, F. 2004. Regulatory T Cells. *Curr Opin Pharmacol* **4**: 408-414.
222. Toossi, Z., Mincek, M., Seeholtzer, E., Fulton, S.A., Hamilton, B.D., Hirsch, C.S. 1997. Modulation of IL-12 by Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) in *Mycobacterium tuberculosis*-infected Mononuclear Phagocytes and in Patients with Active Tuberculosis. *J Clin Lab Immunol* **49**: 59-75.
223. Trautman, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E.A., Gimmig, S., Besette, B., Sekaly, R.P. y colaboradores. 2006. Upregulation of PD-1 Expression on HIV-Specific CD8+ T Cells Leads to Reversible Immune Dysfunction. *Nat Med* **12**: 1198-1202.
224. Trunz, B.B., Fine, P. y Dye, C. 2006. Effect of BCG Vaccination on Childhood Tuberculosis Meningitis and Miliary Tuberculosis Worldwide: A Meta Analysis and Assesment of Cost-Effectiveness. *Lancet* **367**: 1173-1180.
225. Tsunemi, S., Iwasaki, T., Imado, T., Higasa, S., Kakishita, E., Shirasaka, T. y Sano, H. 2005. Relationship of CD4+CD25+ Regulatory T Cells to Immune Status in HIV-Infected Patients. *AIDS* **19**: 879-886.
226. UNGASS Venezuela. 2012. Informe Nacional de Avances en la Implementación de la Declaración de Compromisos sobre VIH/SIDA (2001) y la Declaración Política sobre VIH/SIDA (2006 y 2011).
227. Van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. y Reutelingsperger, C.P. 1998. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* **31**: 1-9.

228. Van Stipdonk, M.J., Lemmens, E.E. y Schoenberger, S.P. 2001. Naïve CTLs Require a Single Brief Period of Antigenic Stimulation for Clonal Expansion and Differentiation. *Nat Immunol* **2**: 423-429.
229. Venet, F., Malcus, C., Ferry, T., Poitevin, F. y Monneret, G. 2010. Percentage of Regulatory T Cells CD4+CD25+CD127- in HIV-Infected Patients is Not Reduced After Cryopreservation. *J Immunol Methods* **357**: 55-58.
230. Vigano, A., Vella, S., Saresella, M., Vanzulli, A., Bricalli, D., Di Fabio, S., Ferante, P. y colaboradores. 2000. Early Immune Reconstitution After Potent Antiretroviral Therapy in HIV-Infected Children Correlates with the Increase in Thymus Volume. *AIDS* **14**: 251-261.
231. Violari, A., Cotton, M.F., Gibb, D.M., Babiker, A.G., Steyn, J., Madhi, S.A., Jean-Philippe, P. y McIntyre, J.A. 2008. Early Antiretroviral Therapy and Mortality among HIV-Infected Children. *New Engl J Med* **359**: 2233-2244.
232. Vitale, M., Carusso, A., De Francesco, M.A., Rodella, L., Bozzo, L., Garrafa, E., Grassi, M. y colaboradores. 2003. HIV-1 Matrix Protein p17 Enhances the Proliferative Activity of Natural Killer Cells and Increases Their Ability to Secrete Proinflammatory Cytokines. *Brit J Haematol* **120**: 337-343.
233. Vivas, W., Navarro, E., Siciliano, L., López, M., García, Y., García, J. y Alfonzo, M. 2012. Evaluación de Moléculas Ex Vivo y la Frecuencia de Apoptosis en Linfocitos TCD4+ y TCD8 de Niños Infeccionados por VIH bajo el TAAE. Jornadas de Investigación y Extensión de la Facultad de Ciencias UCV, Caracas, Venezuela.
234. Wang, L., Chen, J.J., Gelman, B.B., Konig, R., y Cloyd, M.W. 1999. A Novel Mechanism of CD4 Lymphocyte Depletion Involves Effects of HIV on Resting Lymphocytes: Induction of Lymph Node Homing and Apoptosis Upon Secondary Signaling Through Homing Receptors. *J Immunol* **162**: 268-276.
235. Walker, A.S., Doerholt, K., Sharland, M. y Gibb, D.M. Response to Highly Active Antiretroviral Therapy Varies with Age: The UK and Ireland Collaborative HIV Pediatric Study. *AIDS* **18**: 1915-1924.

236. Weir, R.E., Gorak-Stolinka, P., Floyd, S., Lalor, M.K., Stenson, S., Branson, K., Blitz, R. y colaboradores. 2008. Persistence of the Immune Response Induced by BCG Vaccination. *BMC Infect Dis* **8**: 1-9.
237. Westendorp, M.O., Frank, R., Ochsenbauer, C., Stricker, K., Dhein, J., Walczak, H., Debatin, K.M. y colaboradores. 1995. Sensibilization of T Cells to CD95-Mediated Apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* **375**: 497-499.
238. WHO. 2011. Global Tuberculosis Control. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/en/.
239. Wu, Y., y Marsh, J. 2001. Selective Transcription and Modulation of Resting T Cell Activity by Preintegrated HIV DNA. *Science* **293**: 1503-1507.
240. Xu, X.N., Laffert, B., Screaton, G.R., Kraft, M., Wolf, D., Kolanus, W., Baur, A.S. y colaboradores. 1999. Induction of Fas Ligand Expression by HIV Involves the Interactions of Nef with the T Cell Receptor Chain. *J Exp Med* **189**: 1489-1496.
241. Zagury, J.F., Franchini, G., Reitz, M., Collaiti, E., Starcich, B., Hall, L., Fargnoli, K. y colaboradores. 1988. Genetic Variability Between Isolates of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 2 is Comparable to the Variability Among HIV Type 1. *P Natl Acad Sci USA* **85**: 5941-5945.
242. Zelinsky, G., Dietze, K.K., Husecken, Y.P., Schimmer, S., Nair, S., Werner, T., Gibbert, K. y col. 2009. The Regulatory T-cell Response During Acute Retroviral Infection is Locally Defined and Controls the Magnitude and Duration of the Virus-Specific Cytotoxic T-cell Response. *Blood* **114**: 3199-3207.
243. Zhang, J., Zhang, Z., Wang, X., Fu, J., Yao, J., Jiao, Y., Chen, L. y colaboradores. 2007. PD-1 Up-Regulation is Correlated with HIV-Specific Memory CD8+ T Cell Exhaustion in Typical Progressors but no in Long-Term Nonprogressors. *Blood* **109**: 4671-4678.
244. Zhang, S., Zhang, Z., Fu, J., Kang, F., Xy, X., Nie, W., Zhou, C. y colaboradores. 2009. Progressive CD127 down-regulation corralates with increased apoptosis CD8 T cells during chronic HIV-1 infection. *J. Immunol* **39**: 1425-1434.

9. ANEXOS

9.1. 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:

9.2. Formulario de Información

<p align="center">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</p>
--

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 a 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 de la 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 medica 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.