



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



**“La funcionalidad de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> anti-VIH y anti-  
*Toxoplasma gondii* en pacientes VIH<sup>+</sup> y seropositivos a  
*Toxoplasma gondii*”**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**  
Presentado ante la ilustre Universidad Central  
De Venezuela, por la bachiller Josibel Camacho,  
como requisito para optar al título de  
Licenciada en Biología.

**Tutores:** Dr. MIGUEL A. ALFONZO.  
Dra. PALMIRA GUEVARA.

CARACAS, VENEZUELA  
Octubre 2.009

## RESUMEN

La infección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) conduce a una alteración marcada del sistema inmunitario de pacientes en etapas avanzadas de la infección, lo cual conlleva, entre otros fenómenos, a una eliminación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y a un desbalance entre las respuestas de citocinas tipo Th1 y Th2, conduciendo a la aparición de infecciones oportunistas. Una de estas infecciones más frecuentes asociadas a la inmunodeficiencia con VIH, es la Toxoplasmosis causada por un protozooario obligatorio intracelular denominado *Toxoplasma gondii*. Cabe destacar que en personas inmunocompetentes, la infección por *T. gondii* es latente, generalmente asintomática, no obstante, la inmunodeficiencia causada por la infección con VIH puede conllevar a una reactivación de la infección parasitaria, desarrollando graves afecciones a nivel del sistema nervioso central. En pacientes co-infectados con VIH+/Tx+ con un mayor progreso de la infección viral, los bradizoítos pueden reactivarse y manifestarse una encefalitis toxoplásmica. En nuestros estudios nos interesó evaluar si la progresión de la infección viral afectaría a la respuesta del linfocito T CD4 contra *T. gondii* generando una mayor inmunodeficiencia, por lo que pudiese influir en la clínica de los pacientes VIH+ con serología positiva. Estudiamos la función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pacientes VIH<sup>+</sup> con serología positiva para *T. gondii*, en diferentes estadios de la infección viral, buscando una mejor comprensión de los mecanismos inmunopatológicos que están afectando al cuadro de co-infección. Los resultados de los ensayos *ex vivo* observamos mayores alteraciones en la expresión de ciertas moléculas que relacionan con la muerte/supervivencia y funcionalidad de linfocitos TCD4 de

pacientes co-infectados en relación a los infectados por VIH solamente, lo cual, pudiese explicar el por qué aquellos pacientes co-infectados más inmunodeficientes (<200 CD4/ $\mu$ l) presentaron valores menores de células TCD4+ en sangre en relación a pacientes VIH+ más inmunodeficientes (<200 CD4/ $\mu$ l). Cabe destacar que este grupo de pacientes co-infectados más inmunodeficientes presentaron una tendencia mayor de carga viral en comparación a los pacientes más inmunodeficientes, infectados solamente con el virus, la cual indica que este parámetro puede estar jugando también un papel fundamental en la disminución de niveles sanguíneos de células TCD4,. , Por otra parte, se encontró que los pacientes co-infectados presentaron a un valor similar de la frecuencia de apoptosis o muerte celular en células TCD4+ sanguíneas en relación a los grupos de pacientes VIH, a pesar, que presentaron una mayor sobre-expresión de las moléculas Fas/CD95, HLA-DR y PD-1 y una menor expresión de IL-7 $\alpha$  en los linfocitos TCD4 totales, vírgenes y memoria, particularmente de los pacientes co-infectados más inmunodeficientes con respecto a los pacientes VIH. Finalmente, en referencia a los mecanismos efectores de los linfocitos T CD4, se encontró que la capacidad de proliferación con estimulación mitogénica (PHA) se perdió parcialmente en los grupos de pacientes. En presencia de antígenos *T. gondii*, los pacientes VIH/Tx+ aún no han perdido esa respuesta proliferativa específica al protozoo pero hay una tendencia a disminuir en presencia de la infección viral. En presencia o estimulación específica a antígenos del virus, los pacientes VIH estaba significativamente más perdida la respuesta de proliferación vs los pacientes co-infectados, indicando que la respuesta anti-VIH por los linfocitos T CD4 es afectada por la infección viral, mientras que la co-infección pareciera

ejercer un efecto menos drástico en tal pérdida de clones anti-VIH. Todos estos resultados pueden estar ocasionando importantes efectos sobre la inmunidad contra el parásito, ocasionando en aquellos pacientes realmente infectados por *T. gondii* en un futuro, una reactivación de la infección parasitaria que puede establecer un cuadro de encefalitis, generalmente letal.

## INDICE

<b>1.- INTRODUCCION</b> .....	10
<b>2.- ANTECEDENTES</b> .....	13
2.1.- Epidemiología y Actualidad del VIH/SIDA .....	13
2.2.- Epidemiología de la co-infección VIH/ <i>Toxoplasma gondii</i> .....	16
2.3.- Virus de Inmunodeficiencia Humana .....	18
2.3.1.- Características generales del VIH .....	19
2.3.1.1.- Estructura .....	19
2.3.1.2.- Ciclo de replicación del VIH .....	20
2.3.1.3.- Curso clínico del VIH .....	21
2.4.- Inmunopatología del VIH .....	22
2.4.1.- El linfocito TCD4+ en la infección con VIH .....	23
2.4.1.1.- La activación de la respuesta inmunitaria .....	23
2.4.1.1.1.- Fases de la respuesta inmunitaria .....	25
2.4.1.2.- La respuesta anti-VIH en linfocitos T .....	28
2.4.1.3.- Eliminación del linfocito TCD4 en la infección con VIH .....	30
2.5.- Enfermedades oportunistas en la infección con VIH: La Toxoplasmosis .....	34
2.5.1.- <i>Toxoplasma gondii</i> : Generalidades .....	34
2.5.2.- La respuesta inmunologica contra <i>T. gondii</i> .....	37
2.5.3.- La co-infección VIH/ <i>Toxoplasma gondii</i> .....	40
<b>3.- OBJETIVOS</b> .....	43
<b>4.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	44
<b>5.- RESULTADOS</b> .....	55
<b>6.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	79
<b>7.- CONCLUSIÓN</b> .....	94

**8.- BIBLIOGRAFIA ..... 97**

**9.- ANEXOS**

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> .....	10
<b>Figura 2</b> .....	20
<b>Figura 3</b> .....	27
<b>Figura 4</b> .....	36
<b>Figura 5</b> .....	54
<b>Figura 6-A</b> .....	57
<b>Figura 6-B</b> .....	58
<b>Figura 6-C</b> .....	58
<b>Figura 7-A</b> .....	59
<b>Figura 7-B</b> .....	60
<b>Figura 8-A</b> .....	61
<b>Figura 8-B</b> .....	62
<b>Figura 9</b> .....	63
<b>Figura 10</b> .....	65
<b>Figura 11</b> .....	66
<b>Figura 12</b> .....	67
<b>Figura 13</b> .....	69
<b>Figura 14</b> .....	70
<b>Figura 15</b> .....	72
<b>Figura 16</b> .....	73
<b>Figura 17</b> .....	75
<b>Figura 18</b> .....	76
<b>Figura 19</b> .....	78

## **ABREVIACIONES**

AICD: Activation induced cell death

APC: células presentadoras de antígeno

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BrdU: Bromodeoxyuridina

CD: Celulas dendríticas

CMSP: Celulas mononucleares de sangre periférica

C-18: Cyclophilin-18

CTL: Citotoxic T lymphocyte

Env: gp160 (precursor proteínico de gp120 y gp41)

gp120: glycoprotein 120. Proteína de la envoltura viral

gp41: glycoprotein 41. Proteína de la envoltura viral

HAART: Highly active anti-retroviral therapy. Conocida como ART o tri-terapia

IFN- $\gamma$ : Interferon gamma

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

LCMV: Lymphocytic choriomeningitis virus

LXA<sub>4</sub>: Lipoxina A<sub>4</sub>

MHC-1: Major histocompatibility complex type I

MHC-2: Major histocompatibility complex type II

MIA: muerte inducida por activación

Nef: Negative factor

NK: células asesinas naturales

NO: Oxido nítrico

p24: "core antigen capsid". Proteína de la capsid viral codificada por el gen *gag*.

PBS: Phosphate buffer saline

PD-1: Programmed cell death 1

PHA: Phytohematoglutinina

PI: Yoduro de propidio

Rev: Proteína Regulatoria del VIH

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SNC: Sistema Nervioso Central

Tat: Transactivating regulatory protein

TE: Toxoplasmosis encefálica

TC: Toxoplasmosis Cerebral

TCR: T-cell- receptor

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor alpha

TRAIL: TNF related apoptosis- inducing ligand

Tx: *Toxoplasma gondii*

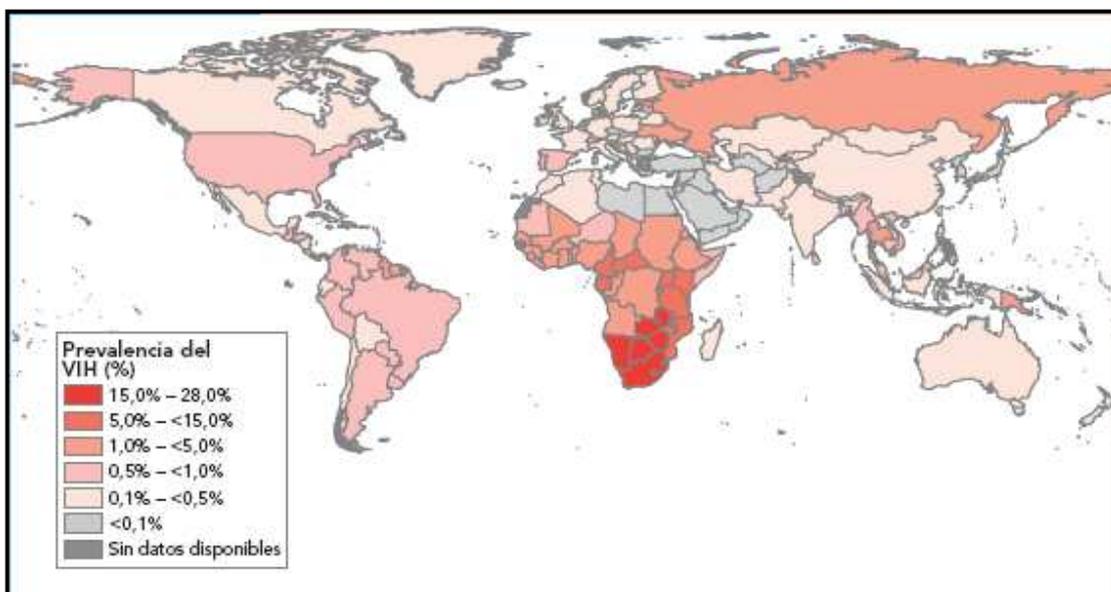
VIH-1: Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

Vpr: Viral protein R

Vpu: Viral protein U

## 1.- INTRODUCCION

La presencia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) desde la década de los 80's ha ocasionado una considerable alta tasa de mortalidad y de morbilidad en los pacientes infectados y en algunos países, la economía ha sufrido un serio retroceso, creando una situación socio-económica más precaria de la pre-existente (ONUSIDA, 2006). Se ha estimado que a nivel mundial, para el año 2007, existen aproximadamente 33 millones de personas infectadas con VIH (**ver figura 1**). Se establece que África subsahariana sigue siendo la región más afectada por el VIH, ya que representa un 67% de personas que viven infectadas con este virus y el 72% de los fallecimientos por sida, establecidos para el año 2007, en todo el mundo. Fuera de África, las infecciones continúan incrementándose en diversos países. El número anual de nuevas infecciones a nivel mundial disminuyó 3.0 millones en 2001 a 2.7 millones en el 2007 (ONUSIDA, 2008).



**Figura 1. Visión global de la infección VIH, 2007.** 33 millones de personas [30-36 millones] que viven con el VIH, 2007 (ONUSIDA, 2007).

En el caso de las mujeres, a nivel mundial, representan un 50% de las personas que viven con VIH por lo que se mantenido estable, aunque su participación en cuanto a nuevas infecciones está aumentando en diversos países. En cuanto a niños infectados, se estima que unos 370.000 [330.000-410.000] niños menores de 15 años se infectaron con VIH para el año 2007, y se estima un 45% de jóvenes entre 15-24 años que representan las nuevas infecciones en adultos a nivel mundial, donde muchos de ellos no presentan una información precisa y completa de cómo evitar la exposición al virus. Se realizaron encuestas en 64 países, indicando que el 40% de los varones y 38% de las mujeres de 15-24 años tienen un conocimiento completo sobre el VIH y cómo evitar su transmisión (Indicador 13 del UNGASS). Para el año 2007, los niveles de conocimiento siguen estando muy por debajo del objetivo mundial de asegurar que un 95% de los jóvenes tengan un conocimiento preciso sobre el VIH para el año 2010 (ONUSIDA, 2008). Sin embargo, el número de nuevas infecciones por el VIH entre los niños de todo el mundo se ha reducido desde el año 2002, efecto de que se han ampliado los tratamientos adecuados para prevenir la transmisión de madre a hijo. Con la extensión masiva de la accesibilidad a los tratamientos con antirretrovirales (HAART), ha decaído la tasa de muertes por SIDA en los últimos 10 años (ONUSIDA 2007). Cabe destacar, que en los últimos 6 años, el número de persona que reciben tratamiento antirretroviral en aquellos países de ingresos bajos y medianos se ha multiplicado, llegando aproximadamente a tres millones de personas a finales del año 2007 pero aún se requiere cubrir una mayor población. El rápido acceso a estos medicamentos, actualmente, en los contextos con recursos limitados, está salvando vidas, aumento una mejor calidad de vida, y contribuyendo a rejuvenecer hogares, comunidades y sociedades enteras (ONUSIDA, 2008).

Diariamente, más de 6.800 personas contraen infección por el VIH y más de 5.700 personas infectadas con este virus fallecen a causa del sida, la mayoría de los casos se debe a causa de un acceso inadecuado a los servicios de prevención y tratamiento del VIH. Actualmente, la pandemia del VIH aun sigue siendo uno de los desafíos más importantes, en cuanto se refiere a enfermedades infecciosas para la salud pública. Si no existe un mayor progreso en la reducción de la tasa de nuevas infecciones por el VIH, sería imposible invertir el curso de la epidemia mundial de VIH y sostener los avances en la ampliación del tratamiento, aunque en los últimos años el acceso al tratamiento se ha extendido poco a poco, por el contrario los esfuerzos para asegurar actividades consistentes de prevención del VIH han quedado retardadas (ONUSIDA, 2008).

La infección viral resulta en un profundo desorden en el sistema inmunológico que se caracteriza por la pérdida de las células T CD4<sup>+</sup> de la circulación y de los tejidos linfoides durante el curso de la infección (Stein y col., 1992; Pantaleo y Fauci, 1996). Esta disminución progresiva de las células T CD4<sup>+</sup> coincide con el aumento de la carga viral, lo cual puede ser un factor contribuyente al eventual colapso del sistema inmunológico y al consecuente desarrollo de infecciones oportunistas, las cuales son la principal manifestación clínica de la infección VIH (Fauci, 1996; Graziosi y col., 1998). Una de estas infecciones oportunistas es la toxoplasmosis, la cual, debido a la pérdida de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los pacientes pueden presentar una encefalitis causada por *Toxoplasma gondii* (TE, Toxoplasma encefalitis), reconocida como una de las principales causas de mortalidad en los pacientes VIH<sup>+</sup> co-infectados con el protozoario (Grant y col., 1990).

Existen numerosos estudios sobre el tema, en su mayoría enfocados sobre los efectos de la co-infección en el progreso del cuadro clínico del paciente VIH+, sin embargo, los trabajos referentes al estudio de la funcionalidad de las células T específicas al patógeno oportunista y las alteraciones que pudiesen estar ocurriendo por la progresión de la infección viral, son muy escasos. Por lo tanto, evaluamos la respuesta inmunitaria, haciendo mayor énfasis en la función de los linfocitos T CD4+ de pacientes VIH+ con serología positiva *para T. gondii*, en diferentes estadios de la infección viral, buscando una mejor comprensión de los mecanismos inmunopatológicos que están presente y que pudiesen conllevar a una reactivación de la infección parasitaria en el caso de los pacientes infectados con *T. gondii*.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1- Epidemiología y Actualidad del VIH/SIDA**

Los recientes informes presentados por diversas organizaciones, tales como la ONUSIDA y la OMS, nos muestran que los nuevos datos epidemiológicos han sido ampliados y mejorados durante los últimos años, promocionándonos un mejor análisis para así obtener conocimientos más sólidos sobre la epidemia mundial. Aunque ciertos expertos en el área de la salud, aclaran que es necesario ampliar mucho más la representatividad de dichos datos, a su vez, sería factible y necesario ampliar los sistemas de vigilancia de la enfermedad para hacer un mejor seguimiento de las sub-epidemias en las poblaciones de riesgo de cada país.

Si bien se sabe que la prevalencia mundial de la infección del VIH está relacionada con el porcentaje de personas infectadas con dicho virus, estimando

que el número total de personas que viven con VIH va aumentando como consecuencia de la incesante propagación de la infección con el virus, combinada con tiempos más largos de supervivencia, en una población general que probablemente sea de crecimiento constante. Las recientes estadísticas nos muestran que **África subsahariana** durante años ha sido la región más gravemente afectada y en la actualidad el sida aún sigue siendo la causa principal de mortalidad, aún así, la prevalencia de VIH en la última década se ha estabilizado o tiende a disminuir en la mayor parte de esta región, esta disminución registrada en los dos últimos años se debe a la ampliación de servicios de tratamiento antirretrovírico. Para el año 2007, más de dos de cada tres (68%) adultos y aproximadamente el 90% de los niños infectados por el VIH, se encuentran en esta región, y a su vez más de tres de cada cuatro (76%) defunciones por sida. Con estos datos se muestra la necesidad no satisfecha de la provisión de tratamientos antirretrovirales en África. Asimismo, el sida como principal causa de mortalidad en África subsahariana, nos indica un gran obstáculo a largo plazo que se debe enfrentar para la provisión de servicios de tratamiento, tomando en cuenta el impacto existente en esta región inmensamente desproporcionado (ONUSIDA, 2007). Por otra parte, en **Asia**, la epidemia en Camboya, Myanmar y Tailandia, presentan un descenso en la prevalencia del VIH, por lo que el número anual estimado de nuevas infecciones por el VIH se redujo de 450.000 en el año 2001 a 340.000 para el año 2007, aunque en **Asia oriental**, 92.000 adultos y niños que se estima que han contraído la infección por el virus en el 2007, representa un aumento de un 20% aproximadamente, en relación con las 77.000 personas que contrajeron el virus para el año 2001. En **China**, se estima que menos de la mitad de las personas que vivían con el VIH, para el año 2006, se infectaron al inyectarse

drogas con material contaminado, y la otra proporción similar de personas contrajeron el virus mediante relaciones sexuales sin protección (ONUSIDA, 2007). Igualmente, en **Pakistán**, la prevalencia del VIH va ascendiendo entre los usuarios de drogas inyectables. De la misma forma es importante destacar que en países individuales como **Viet Nam e Indonesia**, la prevalencia del VIH sigue aumentando anualmente. En **Viet Nam**, ha ascendido a más del doble el número estimado de personas que viven infectadas por el virus entre los años 2000 y 2005: la cifra ascendió de 120.000 a 260.000, siendo los principales factores de riesgo para contraer el VIH, el uso de material contaminado para la inyección de drogas y las relaciones sexuales sin protección con parejas no habituales o profesionales del sexo. Por el contrario, se obtuvo que en el **Caribe, América Latina, América del Norte, Oriente Medio y África del Norte, y Europa Occidental**, las estadísticas de las nuevas infecciones por el VIH para el año 2007, se mantuvieron relativamente estables (ONUSIDA,2007)

En **América Latina**, la epidemia del VIH se mantiene generalmente estable, aunque la transmisión se sigue manteniendo en poblaciones de mayor riesgo de exposición, como son: los profesionales del sexo y hombres que mantienen relaciones sexuales con hombres. Según datos recientes, nos muestran que el número estimado de nuevas infecciones por el VIH en esta región para el año 2007 fue de 100.000 personas nuevas infectadas, lo que aumenta a 1,6 millones del número total de personas que viven con el VIH en América Latina, donde un tercio de todas las personas que presentan la infección por el virus aproximadamente, residen en **Brasil**.

En **Venezuela**, según el informe “Situación del VIH/SIDA en Venezuela”, presentado por el Programa Nacional de ITS-SIDA (PNS)/Ministerio del Poder Popular para la Salud en el 2005, indica que hasta el año 1998, la prevalencia estimada de la infección con VIH fue de 8.047 casos, adicionalmente presenta cómo se comporta la epidemia en Venezuela, señalando en cuanto al sexo, donde el grupo más afectado son los hombres que tienen sexo con hombres (HSH), correspondiendo alrededor de un 70% de los casos notificados, aunque no queda por fuera el aumento de nuevas infecciones en los casos de hombres y mujeres heterosexuales. Sin embargo, estos datos pueden ser una sub-estimación de la realidad. Para el año 2001, se estimó que en Venezuela existían 62.000 casos de personas infectadas con el VIH, cifra contrastada con los datos que reportan para el año 2000 de un total de 10.571 casos de personas que viven con VIH/SIDA (7.014 casos con VIH y 5.849 defunciones), mientras que para el 2002 se estimó un total de 13.527 casos, donde representaban 12.103 hombres y 1.388 mujeres. En el año 2006, se evidenció un incremento exacerbado, estimándose que existe un aproximado de 110.000 personas que viven con VIH en el país (UNGASS SIDA VENEZUELA, 2008).

## **2.2.- Epidemiología de la co-infección VIH/*Toxoplasma gondii***

La toxoplasmosis es una de las enfermedades oportunistas más frecuentes en personas infectadas con VIH. En **Estados Unidos de Norte América** para los años 1999-2000, se evaluaron 4.234 personas entre 12 - 49 años de edad, donde el 15.8% resultaron positivas para la prueba serológica de *Toxoplasma gondii*, donde

la mayor prevalencia está en personas de raza negra, esta prevalencia se ha mantenido estable en los últimos años en los Estados Unidos (Jones y col., 2003).

En **Brasil**, estudios recientes muestran una prevalencia de reactividad para anticuerpos específicos para *T. gondii* de 73.5%, donde se determina un incremento de la reactividad con la edad, mostrando un 95.7% en personas mayores de 50 años, sin embargo en personas jóvenes se han detectado una alta frecuencia de detección de anticuerpos, en edades comprendidas entre 10-19 años (Neves y col., 2008).

En **Venezuela**, se han realizados estudios sobre la prevalencia de anticuerpos anti- *Toxoplasma gondii*. Por ejemplo, en el año 2003 se realizaron estudios en 6 comunidades diferentes, donde incluyeron 335 individuos de 1 a 65 años de edad, cuyos resultados indican que la tasa de infección obtenida fue de 49.8%. En estas regiones no se detecta una asociación entre la aparición de anticuerpos y la edad. La infección por ooquistes de este parásito que provienen de las heces de gato parece ser la principal vía de transmisión, e igualmente el agua contaminada (Chacín y col., 2003).

Muy pocos son los estudios sobre la prevalencia de personas co-infectadas con el VIH y el protozooario a nivel mundial, sin embargo existen estudios que nos señalan la prevalencia de esta co-infección en zonas específicas de algunos países de América Latina. Uno de los estudios más recientes que indican un aproximado de personas co-infectadas con el virus y el parásito, se realizó en **Colombia**, específicamente en el Hospital San Juan de Dios de Bogotá, en donde se encontró que el 63% de los pacientes con VIH poseen anticuerpos séricos anti-*Toxoplasma gondii* y a su vez la toxoplasmosis cerebral se manifestó en un 66% de pacientes infectados con el VIH. Por otra parte el tratamiento específico condujo a la mejoría

13 de 15 casos, es decir, el 86% de ellos. En **México**, para el año 1998 realizaron un estudio sobre agentes oportunistas en pacientes con SIDA, presentando que el 9,7% de 93 pacientes infectados con el virus desarrollaron toxoplasmosis cerebral. Otro estudio notifica una prevalencia del 9% con TC en 146 pacientes con SIDA en la ciudad de México (Gongora y col., 1998). Asimismo, para el año 2005, en cierto estudio revelan que en **Brasil**, la TC es la lesión más común en pacientes con SIDA, y es la tercera infección oportunista más frecuente en dichos pacientes. La TC ha causado una alta tasa de morbilidad y mortalidad, particularmente en paciente con SIDA en Brasil (Colombo y col., 2005).

### **2.3.- Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1)**

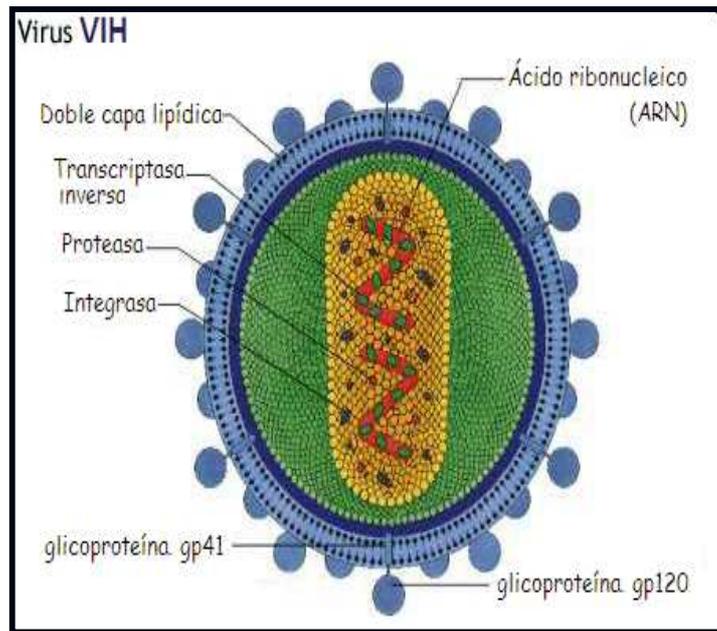
El VIH-1 es el principal causante del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en todo el mundo, mientras que el VIH-2, se presenta con menor frecuencia en los casos de de SIDA, y se encuentra principalmente en los países de África Occidental (Alcaro y col., 2003). La infección con VIH-1 está caracterizada por una declinación cuantitativa en el número de linfocitos TCD4+ y por un deterioro cualitativo de sus funciones (Rosenberg y col., 1997). Desde el reconocimiento del SIDA en 1981, considerables esfuerzos por investigadores se han dedicado a identificar el mecanismo mediante por el cual el VIH-1 causa esta enfermedad, y dos hipótesis principales han sido remitidas. La primera hipótesis es que el VIH causa una disminución de linfocitos TCD4+ al infectar e inducir la muerte en estas células. La segunda, está basada en las observaciones que tanto células infectadas como no infectadas son afectadas y donde el VIH perjudica indirectamente la

función de estas últimas células, tal vez debido a una reacción aberrante a la infección por la respuesta inmune del hospedador (Stevenson, 2003).

### **2.3.1.- Características generales del VIH**

#### **2.3.1.1.- Estructura**

El VIH pertenece a la familia de los retrovirus, subfamilia lentivirus, el cual se caracteriza por una envoltura que presenta varias proteínas en la cubierta (**ver figura 2**), por ejemplo, las más importantes para la entrada del virus a la célula blanco son las glicoproteínas gp120 y la gp41, a su vez también presenta siete proteínas internas típicas, cuatro de las cuales son estructurales y tres enzimáticas. El virión contiene dos copias de ARN genómico (Alcaro y col., 2003) y utiliza la enzima transcriptasa reversa para llevar a cabo la transferencia de información, una endonucleasa de ADN (integrasa) y una proteasa. Además, otras proteínas presentes que son importantes para la función del virus son aquellas llamadas accesorias, por ejemplo, la Tat, que tiene funciones reguladoras esenciales para incrementar la actividad polimerasa, la Rev y Vpu que indirectamente intervienen en el ensamblaje del virión (Frankel y Young, 1998).



**Figura 2.- Estructura del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1).** Representa algunos tipos de proteínas internas y superficiales que lo integran, su material genómico y la doble capa lipídica (www.blogsida.com).

### 2.3.1.2.- Ciclo de replicación del VIH

La entrada del virus en la célula blanco, generalmente linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se da mediante la fusión de la cubierta del virus con la membrana celular en sitios con receptores específicos. La proteína de cubierta gp120 se une tanto a los receptores CD4 como a los receptores de quimiocinas del tipo CC o CxC de la célula blanco, los cuales son utilizados por el VIH como co-receptores. Esta unión provoca un cambio conformación en la proteína de transmembrana gp41, que se encarga de la fusión de la membrana viral con la membrana de la célula blanco (Eckert y col., 1999). Mediante la transcriptasa reversa, el ARN viral se transcribe en ADN monocatenario que posteriormente es utilizado para sintetizar un ADN lineal

bicatenario, cuya copia de este ADN se integra en el genoma de la célula hospedadora, con la ayuda de la integrasa (Madigan y col., 2003). El proceso de transcripción reversa es el punto, en el ciclo de replicación viral, donde se genera una rápida variabilidad genómica, característica del VIH-1. La transcriptasa reversa comete errores de copias, introduciendo mutaciones y generando poblaciones virales diferentes de la cepa predominante inicial (Cabrera, 2001). La transcriptasa reversa es uno de los blancos terapéuticos en la actualidad, ya que es inhibida competitivamente por análogos nucleósidos (AZT, ddI, ddC, 3TC, d4T y abacavir), y no competitivamente por los no nucleósidos (efavirenz, nevirapina y delavirdina) (Jonckheere y col.,1998). A partir del ADN copia se origina la formación de los ARNm víricos, estos se encapsidan en nucleocápsidas, y por último ocurre la gemación de los viriones envueltos a través de la membrana plasmática y liberación de la célula, tendiendo a infectar otras células circundantes, repitiéndose el mismo ciclo (Madigan y col., 2003).

### **2.3.1.3.- Curso clínico del Virus de Inmunodeficiencia Humana**

Se han identificados cuando no se aplica tratamiento antiretroviral al menos 3 fases evolutivas distinguibles de la infección con VIH: Fase inicial, precoz o aguda, intermedia o crónica y la fase final, de crisis o de Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Alimonti y col., 2003). En la fase inicial, la penetración del VIH en el organismo, está relacionada con la virulencia de la cepa de VIH y la capacidad de respuesta del sistema inmunológico de la persona infectada. Entre las 2-6 semanas del contagio se detectan los antígenos del VIH (por ejemplo el antígeno p24), entre las 4-12 semanas aparecen los anticuerpos circulantes, donde en este período la

inmunidad celular y el antígeno p24 desaparecen y descienden las células infectadas. En la fase crónica la duración está comprendida entre 7-10 años, persistiendo en ésta la proliferación viral, aunque a un nivel bajo (Derdeyn y Hunter, 2008). Los pacientes pueden ser asintomáticos, con o sin adenopatías, los niveles de plaquetas son bajos, presentan mínimos trastornos neurológicos, detectados por pruebas electrofisiológicas. Dependiendo de cada individuo, es estimado que en 10 años el 50% de los adultos y el 80% de niños evolucionarían a estadios más avanzados, donde influyen diversos factores. Finalmente pueden llegar al SIDA, donde la replicación del VIH aumenta en esta etapa, coincidiendo clínicamente con una profunda alteración del estado general del paciente (síndrome de desgaste). En este período comienzan a aparecer las graves infecciones oportunistas, algunas neoplasias y alteraciones neurológicas, de modo que en el paciente se establece la fase de SIDA (Kaplan y Sieg, 1998). Esto ocurre generalmente cuando las células CD4+ decaen por debajo de las 200 células/ $\mu$ l de sangre periférica.

#### **2.4.- Inmunopatología del VIH**

La infección con el VIH, provoca el deterioro progresivo del sistema inmunitario, asociado con una pérdida gradual numérica y funcional de células T cooperadoras (T CD4<sup>+</sup>), debido a la alta replicación viral en éstas (Kaplan y Sieg, 1998). Esta reducción de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> se debe principalmente al tropismo del VIH por estas células T CD4<sup>+</sup>, cuyo papel es muy importante por que interactúan con células presentadoras de antígeno, células B, células T citotóxicas y células naturales asesinas (NK) durante la activación de la respuesta inmunitaria (Kaplan y Sieg, 1998). Existen otros tipos de células, en las cuales el VIH

interactúa, tales como los monocitos, macrófagos, células microgliales, células de Langerhans (Graziosi y col., 1998). El complejo de glicoproteínas de la envoltura del VIH (gp120 y gp41), Nef, Tat y Vpr pueden afectar tanto al ciclo celular como a la supervivencia de las células infectadas y no infectadas (Blanco y col., 2001). Las glicoproteínas de la envoltura son responsables de la entrada del virus a la célula y la formación del sincitio, además, se han descrito efectos nocivos por la interacción de gp120 con CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4, los cuales son los principales determinantes del tropismo viral (Blanco y col., 2001). El declive de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, ocurre como resultado de la apoptosis o muerte celular programada (Ahr y col., 2004). Algunos mecanismos que contribuyen a la muerte de las células T CD4<sup>+</sup> no infectadas, incluye la fusión con células infectadas con el virus (Rugeles y Patiño, 2004) y la interacción con proteínas pro-apotóticas. Existen diversos factores que intervienen en la infección por VIH, tales como las citocinas: el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF) y el factor estimulante de colonias monocitos (M-CSF), los cuales contribuyen al aumento de la replicación del VIH (Rugeles y Patiño, 2004).

#### **2.4.1.- El linfocito TCD4+ en la infección con VIH**

##### **2.4.1.1.- La activación de la respuesta inmunitaria**

Los linfocitos T vírgenes se generan en el timo, salen a la periferia y se mantienen recirculando de la sangre a la linfa continuamente, en las zonas T de órganos linfoides secundarios (Sprent y col., 2001). Los linfocitos T vírgenes entran al torrente sanguíneo, migran a los órganos linfoides secundarios/periféricos, donde

vuelven de nuevo a la sangre y recirculan hasta encontrar un antígeno que sea reconocido por sus receptores antigénicos. La presentación de antígeno ante los linfocitos T vírgenes se lleva a cabo mediante las células presentadoras de antígeno (APC) en los nódulos linfáticos principalmente (Kitchen y col., 2005). Este reconocimiento se da en la superficie de estas células, provocando la proliferación del linfocito T virgen, dando origen a un clon de linfocitos T, proceso por el cual se van a diferenciar en tipos de linfocitos efectores capaces de contribuir en la eliminación de patógenos (Sprent y col., 2001). Las células APCs están concentradas en los órganos linfoides periféricos, tienen la capacidad de captar antígenos, así como en su procesamiento y presentación a los linfocitos T que serán activados por ellas. Los linfocitos T dejan la sangre atravesando las paredes de las venulas endoteliales altas y pasan a la región cortical del ganglio, éstos se unen de modo transitorio a través de moléculas de adhesión no antígeno-específicas a las APCs, de tal forma, los linfocitos T CD4+ interactúan con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) de clase II unido a péptidos pertenecientes a las células dendríticas y con la citocina IL-7 (Sprent y col., 2001). Tras el reconocimiento antigénico, el linfocito T prolifera y su progenie se diferencia en células T efectoras. Los linfocitos T vírgenes pueden vivir largos períodos de tiempo sin dividirse, no obstante, cuando los receptores de esta célula reconocen al antígeno en presencia de las señales co-estimuladoras, cesa su migración, se dividen repetida y rápidamente, en un corto período de tiempo, generando una numerosa progenie que se diferencian en linfocitos T CD4 efectoras los cuales tienen la capacidad de contribuir a la erradicación del patógeno cuyos antígenos reconocieron. Estos linfocitos se clasifican en dos tipos: 1) Linfocitos T proinflamatorios (Th1), que activan los macrófagos infectados, para la destrucción

de patógenos intracelulares, principalmente producen interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Para su diferenciación se necesita de la citocina IL-2, la cual se genera debido a la estimulación de los receptores Toll-like (Muellen y col., 2001) y 2) Linfocitos T cooperadores (Th2), que activan los linfocitos B específicos para producir anticuerpos, y quienes actúan en la protección contra ciertas infecciones extracelulares (Seder y col., 2003), para la generación de estos linfocitos se necesita esencialmente la IL-4, el STAT6 y el factor de transcripción GATA-3 (Lee y col., 2001).

#### **2.4.1.1.1.- Fases de la respuesta inmunitaria**

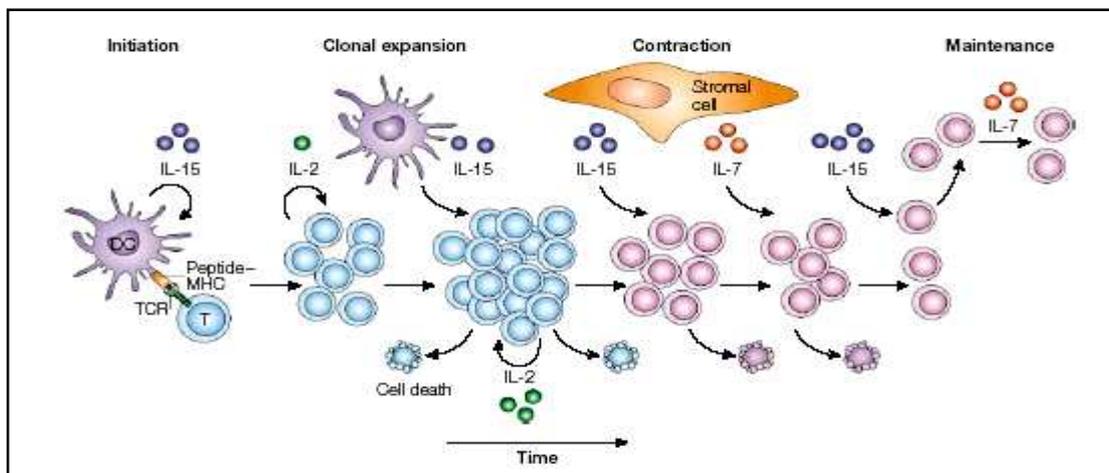
En la respuesta inmunitaria se han establecido cuatro fases principales: Fase de iniciación, fase de expansión clonal, fase de contracción clonal y finalmente la fase de generación de células memoria. Inicialmente cuando ocurre la interacción entre linfocitos- antígeno- células presentadoras de antígeno (APC), se desarrolla la respuesta inmunitaria adquirida, la cual es dependiente de células T, comenzará con la interacción entre linfocitos TCD4 vírgenes y células dendríticas (DC) (Luther y col,1997). Estas células T vírgenes, durante su patrón de recirculación sangre-linfa son metabólicamente quiescentes y presentan una vida prolongada (Sprent y Tough, 1994). La DC al interactuar con un antígeno, se producen cambios que conllevan a la maduración de la capacidad presentadora de antígeno, tales cambios pueden ser el aumento de la eficiencia de captura y procesamiento de antígeno, recambio menor de moléculas MHC-II, aumento de la expresión de moléculas de co-estimulación, tal como la molécula B7 (Jenkins y col, 2001). La DC cuando se activa, migra al tejido linfoide secundario donde se encuentran en su mayoría las

células T vírgenes, en este órgano ocurre la interacción celular para la presentación de antígeno, la cual conlleva a la activación y proliferación de los TCD4 específicos al antígeno (Jenkins y col, 2001). Una de las moléculas que actúa como marcador de activación de células T es la HLA-DR, esto es debido a que cuando una célula T está activada ocurre la expresión de diversos genes los cuales van a codificar proteínas de membrana como la HLA-DR, en este caso indicando el estado de activación de la célula T a nivel fenotípico. En cuanto a la activación crónica de linfocitos tenemos este tipo de molécula de clase II HLA-DR, la cual es un indicador de activación linfocitaria, donde su expresión tiende a aumentar en la infección con VIH. (Kamoun y col., 1992).

En la fase de expansión clonal, las células T específicas al antígeno proliferan, comienzan a sintetizar varios tipos de citocinas, como la IL-2, en el cual este evento es dependiente y la IL-5, que actúa como factor inductor de mitosis, a su vez, las células T comienzan a diferenciarse en citotóxicas (linfocitos TCD8) y colaboradoras (linfocitos TCD4) (Sprent y Surth, 2002, Jenkins y col., 2001). Una vez que las células T se encuentran activadas, ahora células efectoras, migran a tejidos no linfoides infectados, para la diseminación del patógeno. Estas células según el tipo de citocinas que secretan, se diferencian en dos subtipos Th1 y Th2.

Es importante destacar el papel fundamental que juega la interleucina 7 (IL-7) y la expresión de su receptor (IL-7R), en esta fase de expansión, ya que está interviene en la supervivencia de las células T vírgenes, en la proliferación homeostática de células T, en la maduración de las mismas y en la formación de células T memoria (Giliani y col, 2005, Rethi y col, 2005). Asimismo, se ha descrito que la señalización por medio del receptor de la IL-7, en células T periféricas, incrementa la expresión de ciertas proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 y

Mcl-2, permitiendo el bloqueo de la apoptosis, aumentando significativamente la supervivencia de las células T, aumentando la proliferación (Khaled y Durum, 2002, Sin y col., 2001). En la fase de contracción clonal, algunas poblaciones linfocitarias activadas son eliminadas por el fenómeno de apoptosis, evitando la sobrecarga de células T en el sistema inmunológico, que pueda comprometer la respuesta ante los patógenos (Sprent y Surh, 2002). La eliminación de estas células T efectoras puede estar ligadas a la expresión del receptor de muerte CD95 (Fas), y a los ligandos CD95-L (Fas-ligando) y TRAIL (Jenkins y col, 2001). Finalmente, en la respuesta inmunitaria, los linfocitos clones que no sufrieron apoptosis, responden rápida y eficientemente ante la re-infección en el organismo, creando memoria inmunitaria, siendo la fase correspondiente a la generación de células memoria. Parte de estos



mecanismos descritos están graficados en la **figura 3**.

**Figura 3.- Respuesta inmunitaria de células T (Schluns y Lefrançois, 2003).**

Esquema que representa las cuatro fases de la respuesta inmunitaria: fase de iniciación que corresponde a la presentación de antígeno y activación de las células T vírgenes, la fase de expansión clonal y contracción clonal, que corresponde a la supervivencia y eliminación de las células T efectoras y por ultimo la fase de generación de células memoria, con la participación de diversos tipos de citocinas en cada evento.

#### **2.4.1.2.- La respuesta anti-VIH en linfocitos T**

El VIH tiene dos principales células blanco: los linfocitos T CD4+ y los macrófagos de los tejidos. Los linfocitos T CD4+ de sangre periférica se encuentran infectados en una menor proporción con respecto a los que se hallan en los ganglios linfáticos, en los cuales existe una proporción alta de células infectadas (Rugeles y Patiño, 2004). Desde una visión cualitativa frente al VIH se produce una respuesta humoral y una respuesta celular, ambas con efectores específicos e inespecíficos. Se induce una respuesta intensa de anticuerpos (inmunidad humoral específica) frente a las proteínas estructurales y reguladoras del virus. Inespecíficamente se produce una activación del complemento y producción de interferones que pueden favorecer a la inhibición del VIH (Fortín y col., 1998).

Por otra parte, varios estudios han determinado que los linfocitos TCD8 juegan un papel crítico en el control de la replicación del virus en la infección con el VIH (Whitmire y Ahmed, 2001). Estas células con actividad citotóxica (CTL) son una importante línea de defensa contra diversas infecciones virales, donde ha sido claramente demostrada en modelos murinos y en el modelo del virus de inmunodeficiencia en simios (SIV). Aunque muchos de los pacientes infectados con VIH, en la etapa crónica, tienen respuesta CTL contra el virus, por razones aún no conocidas, esta respuesta no es capaz de controlar la replicación viral (Benito y col., 2004). A pesar de la presencia de CTL específicas al VIH, la replicación viral continua en altos niveles en la mayoría de los individuos infectados con el virus sin tratamiento antiretroviral, conduciendo a un estado de inmunodeficiencia más avanzado y conllevándolos a la muerte. A su vez, la ineficacia de la respuesta de las CTL puede de alguna forma ser parte de las consecuencias de las estrategias

de la evasión viral, incluyendo la rápida mutación del virus para escapar del reconocimiento y control de las CTL. De hecho, el escape puede ocurrir con un único cambio de aminoácido en un epítotope, sitio esencial para la unión con el MHC o reconocimiento del TCR (Benito y col., 2004; Shankar y col., 2000).

La respuesta de las células TCD8 en la fase aguda de la infección viral tiene tres etapas distintas: expansión, contracción y memoria. En el encuentro inicial con el virus, un pequeño número de células TCD8 proliferan y se diferencian en las células que son citotóxicas o que producen citocinas para la eliminación de células infectadas. Una vez que la infección ha sido erradicada, esta población celular con efectos citotóxicos es reducida en número, controlada por el mecanismo de apoptosis durante la fase de contracción (Whitmire y Ahmed, 2001). El control parcial de la viremia durante la infección aguda está vinculada a la primera respuesta de las células TCD8, y el punto de ajuste establecido después de la fase aguda probablemente depende de la eficacia de esta respuesta inicial CTL (Benito y col., 2004).

Si bien sabemos, las células T CD4 específicas al VIH, ayudan al control de la infección mediante secreción de interferones para la inhibición de la replicación viral, activación de macrófagos o conduciendo a las células B a producir anticuerpos antivirales. En algunos casos, la inducción de la respuesta de los linfocitos TCD8 depende de los linfocitos TCD4, como se ha demostrado en experimentos *ex vivo*, que las células TCD4 específicas con el MHC de clase II (MCH-2), es necesario para la generación de la respuesta por parte de las células citotóxicas TCD8 y conducir al concepto original de las células TCD4 colaboradoras

(Th) como esencial para la expansión clonal de células TCD8 vírgenes (Castellino y Germain, 2006).

El VIH infecta y mata a las células T CD4+, que funcionan como reguladores y amplificadores de la respuesta inmune. En la ausencia de una terapia antirretroviral eficaz, una de las características es la disminución de los linfocitos TCD4+ en el SIDA, resultando un sistema inmune debilitado, que afecta la capacidad del cuerpo para combatir infecciones (Alimonti y col., 2003). En el estado más avanzado de la enfermedad, existe una disminución inactiva en la proporción de la subpoblación CD45RA (vírgenes) de las células T y un aumento de la proporción de activar la subpoblación CD45RO (memoria-efectora) de las células T, de manera concomitante (Mc Cune, 2001). En resumen, para una respuesta inmunitaria exitosa contra un antígeno que genera señales de peligro en el organismo, la activación y la proliferación de células T juegan un papel importante. La inmunidad adquirida se fundamenta en la activación y proliferación esencialmente de células vírgenes y memoria. La capacidad de proliferación de los linfocitos TCD4+ es esencial para el control de las infecciones virales (Rosenberg y col., 1997).

#### **2.4.1.3.- Eliminación del linfocito TCD4 en la infección con VIH**

El VIH ocasiona un cuadro paradójico ya que junto a la destrucción masiva y mantenida de linfocitos CD4+ conlleva a fenómenos de activación linfocitaria (activación de linfocitos B, de linfocitos CD8+, etc.) en todas las etapas de la infección (Blanco y col., 2001).

Ciertamente la destrucción de linfocitos T no explica de manera satisfactoria la inmunodeficiencia que se plantea desde los momentos iniciales de la enfermedad, aunque la presencia de fenómenos como la apoptosis, la interferencia en la presentación de antígenos, la activación linfoide por productos del virus o la producción anormal de citocinas son otros mecanismos que inducen al deterioro del sistema inmune (Mahlknecht y col., 2000).

Un número de mecanismos directos e indirectos han sido propuestos para explicar la destrucción de los linfocitos TCD4. En los directos: 1) muerte de célula individual, 2) Formación de sincitio, y en los indirectos: 1) Muerte mediada por la inmunidad antiviral específica, 2) Mecanismos autoinmune, 3) Destrucción mediada por superantígenos, por último 3) Apoptosis (Fauci, 1996)

Dos de los principales fenómenos que alteran la funcionalidad de las células T es la apoptosis o muerte celular programada (Mahlknecht y col., 2000) y la activación crónica de linfocitos (Bentwich y col., 1998). La apoptosis se caracteriza por la compactación de la cromatina nuclear, pérdida de la forma multilobulada del núcleo y de los receptores de superficie, cambios en la asimetría de la membrana plasmática asociado con la externalización de la fosfatidilserina, por lo que permite que las células apoptóticas sean fagocitadas por los macrófagos (Salmen y col., 2007). Este fenómeno está involucrado, a su vez, en el mantenimiento de la población de linfocitos dentro de una cantidad considerada como funcional, para controlar infecciones y en la evasión de la autoinmunidad (Gougeon, 2003). La apoptosis o muerte celular se distingue usualmente de la muerte celular por necrosis por una serie de cambios únicos: en la apoptosis no ocurre liberación de lisosomas ni ocurre procesos de inflamación, mientras que en la necrosis, ocurre la desintegración de las membranas celulares y mitocondriales, así como la liberación

de procesos inflamatorios (Kerr y col., 1991). La apoptosis es inducida por dos vías principales, una vía extrínseca, conocida como AICD (activation induced cell death), que es inducida mediante la unión de ligandos a receptores de membranas plasmáticas denominados como receptores de muerte (DR), tal como: Fas (CD95), TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), entre otros, y la vía intrínseca, denominada como (activated T-cell autonomous death), que es activada mediante sensores internos de la célula, los cuales transmiten señales de muerte a la mitocondria (Green, 2000, Benedict y col, 2002). Asimismo, se ha establecido que la apoptosis es el principal mecanismo que disminuye el nivel de células T en la infección con VIH. Tanto las células TCD4 infectadas como no infectadas, igualmente las TCD8, muestran un incremento en la frecuencia apoptótica en esta infección (Alfonzo y col., 2008).

El VIH presenta varias estrategias para activar la maquinaria de apoptosis tanto en células infectadas como en no infectadas, provocando así la muerte de cierta parte de células efectoras del sistema inmune. Los mecanismos involucrados en la destrucción de células linfoides incluyen la muerte directa por expresión de los genes virales en las células infectadas, muerte indirecta de células no infectadas por liberación de proteínas virales pro-apoptóticas; destrucción de efectores específicos en los tejidos infectados por el virus, y expresión alteradas de proteínas reguladoras de la apoptosis tanto en las células T, como en las células presentadoras de antígeno, como consecuencia de activación celular crónica mediada por el virus (Salmen y col., 2007). Las proteínas virales Tat, Nef y otras también han sido implicadas en la mediación de la apoptosis en la infección con VIH (Fauci, 1996)

Otros de los mecanismos que inducen la muerte linfocitaria es la expresión del receptor Fas que al unirse con su ligando (Fas-L) activa el mecanismo intracelular (Kaplan y Sieg, 1998). Las células infectadas con VIH obtenidas de pacientes, exhiben cambios en la regulación de receptores pro-apoptóticos, ejemplo de ello es un incremento en la expresión de Fas y su ligando (FasL), acompañado de la expresión de proteínas intracelulares pro-apoptóticas miembros de la familia Bcl2 (BclXS y Bas) y disminución de la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl2 y Bcal (Alimonti y col., 2003). Las células T de pacientes infectados no sólo muestran aumento de la expresión del receptor Fas, sino que además tiene mayor susceptibilidad a morir por esta vía. Un incremento en la expresión de Fas y Fas Ligando y en la susceptibilidad de apoptosis inducida por TRAIL, también han sido establecido en pacientes infectados con el VIH (Jeremias y col., 1998). Por otra parte, en células mononucleares se ha evidenciado un aumento en la expresión de FasL y niveles elevados de Fas soluble. Estos cambios están asociados con un incremento en la carga viral y la progresión hacia la fase SIDA. En linfocitos T CD4+ y TCD8+, el virus es capaz de regular la apoptosis mediante la modulación de MIA (muerte inducida por activación, mediada por receptores de muerte), asociada con la alteración en la expresión de receptores de muerte, tal como, Fas/FasL (Salmen y col., 2007). Se han realizado estudios, donde investigadores han tratado de probar que la apoptosis por vía Fas/Fas-L se acentúa en pacientes infectados con VIH+ y por ende influye en la eliminación de los linfocitos TDC4+ (Kaplan y Sieg, 1998).

Recientemente se ha estudiado una molécula que también parece influir en la inducción de la muerte linfocitaria, denominada como programmed cell death 1 (PD-1, siglas en inglés), la cual fue aislada, usando hibridización substractiva, como

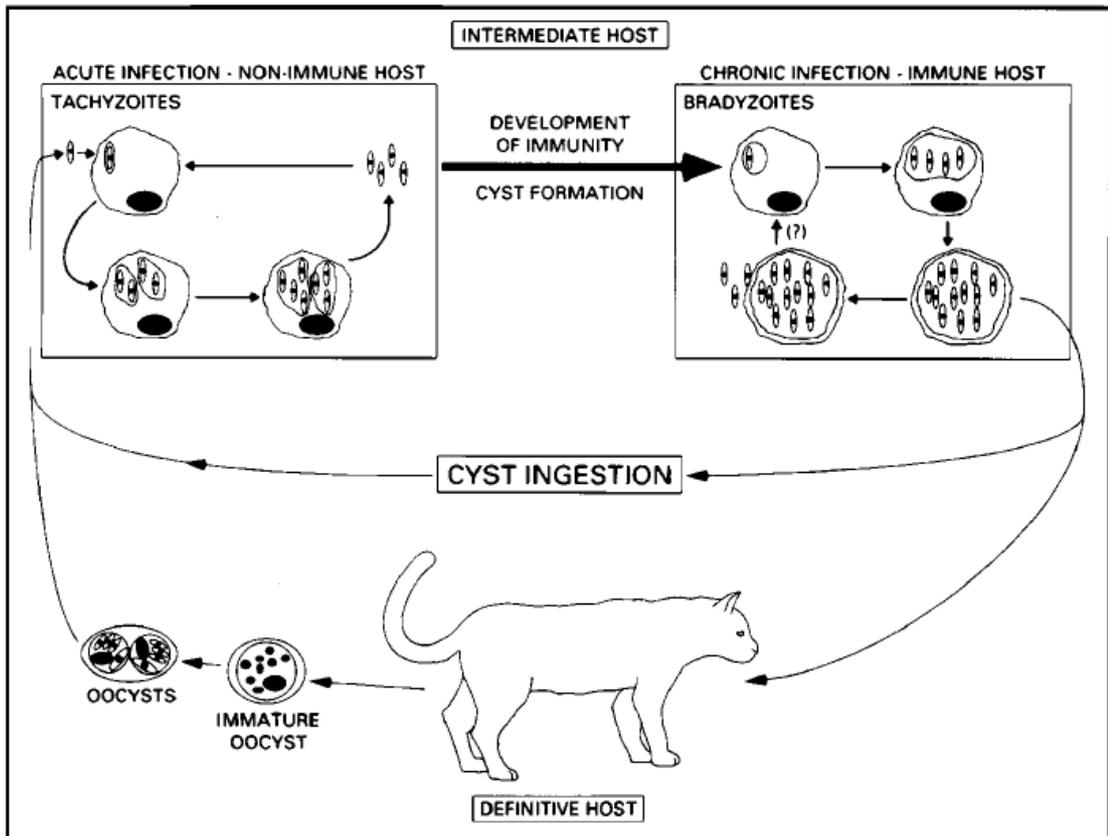
una molécula cuya expresión estuvo aumentada en una línea de células T del Timo por estímulo apoptóticos (Okazaki y col., 2006). La región extracelular de PD-1 consiste en un solo dominio IgV (variable) y su región citoplasmática contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor vía tirosina (ITIM), que por lo general, estos están vinculados con cascadas de señalización inhibitoria y otro motivo cambiante del inmunorreceptor vía tirosina denominado ITSM. La PD-1 pertenece a la familia CD28 y contiene un 23% de homología en secuencias de aminoácidos de CTLA-4, siendo este un antígeno 4 asociado los linfocitos citotóxicos. Los ligandos para PD-1 (PD-Ls) son PD-L1 (también conocido como B7-DC) y PD-L2 (B7-DC) (Okazaki y col., 2006). Ambos ligandos son proteínas transmembranas del tipo 1 con dominios IgV- e IgC-like, en la región extracelular. PD-L1 es constitutivamente expresada en células T, células B, macrófagos y células dendríticas (DCs). La expresión de PD-L1 es también detectado en células no linfoides, por ejemplo en células endoteliales del corazón, en células  $\beta$  del páncreas, entre otras. PD-L2 es observada en la activación de macrófagos y DCs. La unión de PD-L1 y PD-L2 con PD-1 inhiben la activación linfocitaria (Okazaki y col., 2006).

## **2.5.- Enfermedades oportunistas en la infección con VIH: La Toxoplasmosis**

### **2.5.1.- *Toxoplasma gondii*: Generalidades**

*Toxoplasma gondii* es un protozoario obligatorio intracelular, del orden Coccidia (Nash y col., 1998), agente etiológico de la toxoplasmosis en el hombre (Hospedador intermediario), el cual se adquiere al ingerir directa o indirectamente

los ooquistes (eliminados en las heces de gatos) o carne que contenga quistes viables del parásito. Sólo en el intestino de los felinos se cumple el ciclo sexuado que conducen a la producción de ooquistes. El ciclo asexuado tiene lugar en los tejidos extraintestinales de los felinos y de los demás hospedadores (Dubey y col., 1998). En el ciclo vital de *T. gondii*, existen tres tipos de estadios principales de desarrollo: el taquizoíto (es la forma activa de replicación, responsable de la diseminación de la infección y de la destrucción tisular), el bradizoíto (es la forma quiescente, contenida en los quistes tisulares), que pueden reactivarse cuando se deteriora la inmunidad celular, y el esporozoíto (es la forma de resistencia, que esta dentro de los ooquistes), los cuales pueden ser vehiculados por insectos y gusanos (**ver figura 4**) (Sierra y col., 2007). La infección aguda es normalmente controlada por el sistema inmunológico del hospedador, sin embargo, la transmisión del taquizoíto al feto en desarrollo puede ser devastadora, siendo *T. gondii* una de las principales causas de defectos neurológicos congénitos en humanos. En adultos sanos, un pequeño porcentaje de taquizoítos se diferencian, ejerciendo una mínima replicación de bradizoítos en el cerebro, músculos y otros órganos, donde estos pueden permanecer viables como una infección crónica durante la vida del hospedador (Dzierszinski, F y col., 2004).



**Figura 4.-. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* (Denkers y Gazzinelli, 1998).**

Durante la infección aguda, originada por la ingesta de oocistes o quistes, los taquizoítos invaden y proliferan dentro de cualquier célula nucleada, resultando la lisis de estas células o la reinfección de otras células en el hospedador. Con el desarrollo de la respuesta inmunitaria, los taquizoítos se diferencian en bradizoítos, los cuales residen dentro de quistes, en tejidos muculares y en el sistema nervioso central. La infección crónica puede persistir durante toda la vida del hospedador, sin embargo, en pacientes con inmunodeficiencias, puede ocurrir la ruptura del quiste, conduciendo a la reiniciación de una infección aguda. Dentro del intestino del gato, ocurre la diferenciación de gametos femeninos y masculinos del parásito, originándose posteriormente la formación de oocistes, los cuales se encuentran en las heces del gato y permaneciendo la infección por varios meses.

### **2.5.2.- La respuesta inmunológica contra *T. gondii***

*Toxoplasma gondii* es un parásito obligatorio intracelular, el cual después de la infección primaria en los seres humanos, se mantiene en un estado latente gracias al sistema inmunológico del hospedador (Däubener y Hadding, 1996). Durante la fase aguda de la infección, la forma taquizoíto del parásito se replica intracelularmente, ocasionando rápidamente la lisis de la célula hospedadora. La liberación de los taquizoítos, producen nuevas infecciones en las células circundantes. Con la activación de la respuesta inmunológica específica, los taquizoítos son eliminados parcialmente no en su totalidad. Algunos parásitos se enquistan bajo la forma de bradizoítos, conduciendo a la instalación de la infección crónica en el hospedador. Estos quistes son encontrados principalmente en el sistema nervioso central (SNC), donde estos causan inicialmente una débil inflamación (Krahenbul y col., 1982; Däubener y Hadding, 1996). Sin embargo, la transmisión del taquizoíto al feto en desarrollo puede ser devastadora, donde la infección por *T. gondii* es una de las principales causas de los defectos neurológicos congénitos en seres humanos (Dzierszinski y col., 2004). Un estado de inmunosupresión causado por cáncer, trasplantes o alguna infección, tal como la infección con VIH, puede conducir a la reversión del estadio del parásito y ocurre una reactivación de la infección, pasando de bradizoítos a una rápida reproducción de taquizoítos. Esto resulta de la ruptura de los quistes, causando necrosis del tejido local (Aliberti, 2005)

Los macrófagos, los linfocitos T, las células asesinas naturales (NK), secretores de citocinas, especialmente interferón- gamma (IFN- $\gamma$ ), son los elementos principales implicados en la inmunidad celular, donde la infección con *T.*

*gondii* desencadena ambos sistemas inmunitarios, el innato y el adaptativo, lo que conduce a la resistencia y una protección de la infección a largo plazo (Maubon y col., 2008). Los taquizoítos estimulan los macrófagos para producir interleukina-12 (IL-12), a su vez esta activa las células asesinas naturales (NK) y a los linfocitos T, para la producción de IFN- $\gamma$  (Bhopale, 2003). Esta citocina implicada en la defensa contra el parásito, induciendo efectos protectores en humanos (Däubener y Hadding, 1996). La citocina IL-12 es esencial para desencadenar la respuesta inmune dependiente de IFN- $\gamma$  contra la infección con *T. gondii* (Aliberti, 2005). Esta infección también induce a la secreción de distintas citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 o el factor de crecimiento transformador (TGF- $\beta$ ) (Maubon y col., 2008). El IFN- $\gamma$  y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) actúan sinérgicamente para mediar en la eliminación de taquizoítos por parte de los macrófagos. La combinación de estas dos citocinas mejoran los resultados en la producción de radicales libres y óxido nítrico (NO), tanto que puedan eliminar a los parásitos (Bhopale, 2003).

Las células dendríticas pueden activar el sistema inmunológico por el reconocimiento de moléculas o derivados del parásito, las cuales pueden secretar IL-12 durante la infección con *T. gondii*. Sin embargo, las DCs son una fuente abundante de esta citocina *in vivo*, con fuertes indicios de ser la población celular más relevante para el desarrollo de una respuesta inmune específica de tipo 1 contra el parásito (Aliberti, 2005).

Inmediatamente después de la infección, las células dendríticas del hospedador producen IL-12, en respuesta de productos secretados por *T. gondii*, incluyendo el receptor 5 de quimiocinas CC (CCR5) que actúa como una proteína

de unión, y el componente secretado por *T. gondii* denominado Cyclophilin-18 (C-18). La producción de IL-12 favorece la diferenciación y/o proliferación de tipo 1, produciendo IFN- $\gamma$  por parte de células T (ambas CD4+ y CD8+) y células asesinas naturales (NK). El IFN- $\gamma$ , a su vez, activa células hospedadoras, incluyendo macrófagos, para ejercer la actividad microbicida, tal como la producción de óxido nítrico (NO) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Aliberti, 2005). A mediados de la fase aguda, la actividad del potencial de efectos citotóxicos, es controlada por la producción de IL-10 en los sitios de alto nivel de replicación del parásito, como el hígado y el bazo. La IL-10 produce efectos negativos en el curso de la toxoplasmosis por inhibición de la producción del IFN- $\gamma$  e inhibe los efectos mediados por el mismo (Däubebler y Hadding, 1996). Se ha descrito que las células T CD4+ colaboradoras (Th1), producen IFN- $\gamma$  e IL-2. La IL-2 induce la producción de citocinas para la activación de células NK o células NKT, las cuales son citotóxicas para aquellas células blanco infectadas con *T. gondii*. Las células T colaboradoras de tipo Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10, las cuales están asociadas con la regulación de la protección por parte de la respuesta inmune celular (Bhopale, 2003). Es importante la producción de anticuerpos IgM e IgG dirigido contra *T. gondii*, lo que conduce a la activación de la vía clásica del complemento, resultando una eliminación efectiva del parásito extracelular. La activación de la vía alterna del complemento, en contraste, no resulta efectiva en la eliminación del parásito. Se ha descrito que la respuesta inmunitaria humoral está principalmente implicada en la defensa contra *T. gondii*, en la fase aguda de la infección (Däubener, 1997). Las IgG e IgM específicas para el parásito, pueden indicar el estado de la infección, siendo detectadas por ciertas técnicas serológicas, de gran

importancia diagnóstica, tales como la ELISA (Bosch y col., 2006). Además, se ha observado que en la fase crónica, la lipoxina A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>) producida, controla la respuesta de citocinas pro-inflamatorias, sobre todo en sitios donde la replicación del parásito pueda estar ocurriendo, como en el sistema nervioso central, sin interferir con la actividad microbicida de los macrófagos. (Aliberti, 2005).

### **2.5.3 - La co-infección VIH/*Toxoplasma gondii***

La infección por el VIH provoca una alta replicación viral en las células TCD4+, lo que resulta la pérdida progresiva y defectos funcionales en estas células T. El deterioro funcional, agotamiento de este subconjunto de células T y ruptura de la inmunidad celular contribuyen a la aparición de infecciones oportunistas, por agente patógenos intracelulares, que son la principal causa de morbilidad y mortalidad en SIDA (Alfonzo y col., 2008). La Toxoplasmosis es una de las enfermedades oportunistas más frecuentes en pacientes infectados con VIH. La reactivación del estado latente de *T. gondii* es común en pacientes inmunocomprometidos, tales como los que presentan SIDA, siendo el causante de severas complicaciones (Bhopale, 2003). En eventos de inmunosupresión la reactivación del estado latente del parásito, trae como consecuencia enfermedades sintomáticas, tal como la encefalitis toxoplásmica (Däubener y Hadding, 1996). Los pacientes inmunodeficientes están en alto riesgo de encefalitis y a la toxoplasmosis letal, debido a la ruptura de quistes y la propagación de taquizoítos. El estudio de las interacciones específicas entre el parásito y los diferentes tipos de células neuronales (astrocitos, microglías y neuronas) también es esencial para la comprensión de la inmunopatología debido a que el sistema nervioso central es el

centro esencial en la fase aguda y crónica de la infección con *Toxoplasma gondii*, tanto en la infección congénita, como en la reactivación en pacientes infectados con VIH (Maubon y col., 2008). En un hospedador inmunosuprimido, el taquizoíto, se divide y causa daños a nivel de tejido y la infección persistente no establecida, además, cuando el hospedador infectado está en etapa crónica, adquiere un inmunocompromiso, los bradizoítos cambian a taquizoítos, causando problemas cerebrales (Buzoni y Werts, 2006). Por lo tanto, a los pacientes que desde el inicio de su infección con el VIH se le detectan anticuerpos contra *T. gondii* debe ser considerado en situación de riesgo para el desarrollo de la encefalitis toxoplásmica (Israelski y Remington 1998). Diversos estudios hacen énfasis en la importancia que tiene la función de la respuesta inmunitaria en el mantenimiento de la infección por el protozooario, cuando se encuentra en un estado latente, debido a que el cerebro es el sitio más comúnmente afectado por este estado del parásito. En modelos murinos se ha demostrado la importancia de las citocinas, las células NK y T en la regulación de la inmunidad protectora contra *T. gondii* (Hunter y Remington, 1994).

Como se mencionó en párrafos anteriores, la infección con el parásito protozooario *Toxoplasma gondii* es frecuentemente asociada con severos síntomas neurológicos y la encefalitis causada por este organismo, la cual es reconocida como una de las principales causas de mortalidad en los pacientes VIH+ co-infectados con el protozooario (Grant y col., 1990). En estos pacientes, la TE resulta de la reactivación del latente estado de quistes del parásito (bradizoítos) en el cerebro, donde ellos persisten después de una infección primaria (Levy y col., 1985). La ruptura de los quistes y la transformación de los bradizoítos a los

invasivos taquizoítos conducen a una activa infección que conlleva al característico tejido necrótico y a la inflamación localizada (Gazzinelli y col., 1991). Aún no se conoce los mecanismos que intervienen en la reactivación de la TE. Se ha propuesto que la disminución de las células CD4+ (< 200 CD4/ $\mu$ l) durante la infección con el VIH es la principal causa de la reactivación, pero las células CD8+ así como macrófagos y células NK (natural killer, siglas en inglés) pueden también contribuir en un control inmunológico inadecuado durante la infección (Gazzinelli y col., 1991; Langermans y col., 1992; Denkers y col., 1993). Todos estos resultados sugieren indirectamente que los linfocitos T están ejerciendo un papel importante para el control de la diseminación del parásito en el hospedador.

En nuestro estudio nos enfocamos en evaluar la respuesta inmunitaria, específicamente la funcionalidad de los linfocitos TCD4+ específicos para *T. gondii*, de pacientes VIH+ con serología positiva para *T. gondii*, en las diferentes etapas de la infección viral, mediante ensayos *ex vivo* e *in vitro*, además, determinando si la respuesta inmunitaria contra el VIH+ al deteriorarse durante la progresión de la infección influye en la respuesta inmunitaria contra el *T. gondii*. Es decir, si la progresión de la infección viral genera una mayor inmunosupresión, la cual afectaría a la respuesta contra *T. gondii* por lo que pudiese influir en la clínica de los pacientes VIH+ con serología positiva.

### **3.- OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la funcionalidad de los linfocitos TCD4+ específicos para *T. gondii* en pacientes VIH+ y con serología positiva para *Toxoplasma gondii*, mediante ensayos *ex vivo* e *in vitro*, este último en presencia de antígenos específicos para el virus y para el protozooario, mediante citometría de flujo.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

**Determinación y medición de los siguientes parámetros en los individuos a estudiar:**

1. El fenotipaje, midiendo la cantidad de linfocitos TCD4+ totales, con sus subpoblaciones, vírgenes y memoria.
2. La expresión *ex vivo* del receptor de muerte celular denominado CD95/Fas en células TCD4+ y sus subpoblaciones, vírgenes y memoria.
3. La apoptosis *ex vivo*, en linfocitos TCD4+ totales.
4. La expresión de HLA-DR *ex vivo*, en linfocitos TCD4+ totales,
5. La expresión del receptor alfa de la molécula IL-7 (CD127) *ex vivo* en linfocitos TCD4+ totales, con sus subpoblaciones, vírgenes y memoria.
6. La expresión de la molécula PD-1 (CD279) *ex vivo* en linfocitos TCD4+ totales, con sus subpoblaciones, vírgenes y memoria.
7. Las posibles correlaciones entre la expresión *ex vivo* de moléculas de superficie y la frecuencia de apoptosis en linfocitos T CD4+ en linfocitos TCD4+. mediante ensayos *ex vivo*.
8. La proliferación celular de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) *in vitro*, en presencia de antígeno del VIH, de *Toxoplasma gondii* (Tg) y de mitógenos como PHA.

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.- Grupos de estudio

**Grupo Control (Individuos sanos):** Este grupo de controles incluyen dos sub-grupos, ambos constituidos por adultos sero-negativos a VIH, donde, el primer grupo control consiste en personas voluntarias provenientes del Banco Municipal de Sangre y con serología negativa a *Toxoplasma gondii*, mientras que el segundo grupo de controles son personas voluntarias provenientes del Instituto de Medicina Tropical de la UCV, con serología positiva a *Toxoplasma gondii*. Estas personas voluntarias para la colaboración del proyecto de investigación fueron informadas del mismo y se le suministró un documento de consentimiento, el cual certifica su estado de consentimiento para participar con dicho proyecto.

**Grupo VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup>:** Este grupo se divide en 3 sub-grupos de acuerdo a la cantidad de linfocitos TCD4 en sangre de pacientes infectados con el virus, los cuales consisten en adultos sero-positivos al VIH<sup>+</sup>, con prueba confirmatoria (ELISA/Western Blot) y sero-negativos a *Toxoplasma gondii*. Son pacientes regulares del Servicio de Insectología del Hospital “José Ignacio Baldó” (El Algodonal), sin tratamiento antirretroviral, en diferentes estadíos de la infección con el VIH y que no haya presentando alguna infección oportunista. Los sub-grupos están conformados por: i) Pacientes VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup> con menos de 200 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (< 200 células TCD4/ $\mu$ l de sangre); ii) Pacientes VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup> entre 200 y 350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (200-350) TCD4/ $\mu$ l de sangre y iii) Pacientes VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup> con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (>350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre).

**Grupo VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>+</sup>:** Este grupo se divide en 3 sub-grupos de acuerdo a la cantidad de linfocitos TCD4 en sangre de pacientes infectados con el virus, los cuales consisten

en adultos sero-positivos al VIH<sup>+</sup>, con prueba confirmatoria (ELISA/Western Blot) y sero-positivos a *Toxoplasma gondii*. Son pacientes regulares del Servicio de Infectología del Hospital “José Ignacio Baldó” (El Algodonal), sin tratamiento antirretroviral y antiparasitario, en diferentes estadios de la infección con el VIH y que no haya presentando alguna infección oportunista. Los sub-grupos están conformados por: i) Pacientes VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup> con menos de 200 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (< 200 células TCD4/ $\mu$ l de sangre); ii) Pacientes VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup> entre 200 y 350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (200-350) TCD4/ $\mu$ l de sangre y iii) Pacientes VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup> con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (>350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre).

Cada uno de los pacientes VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>-</sup> y VIH<sup>+</sup>/Tx<sup>+</sup> fueron previamente entrevistados, donde se les informó con detalles el basamento del proyecto de investigación y a su vez se les manifestó el beneficio que obtendrían por participar en el mismo, el cual consistió en el suministro de la prueba de inmunofenotipaje CD4. En dicha entrevista se les entregó una carta de consentimiento, la cual certifica que decidieron colaborar voluntariamente en el proyecto. El formato de la carta de consentimiento se encuentra anexado al final del presente trabajo. Los datos clínicos presentes en la historia médica de cada uno de los pacientes incluidos en el proyecto de investigación fueron proporcionados por el servicio de infectología del Hospital “José Ignacio Baldó” (El Algodonal), bajo las correctas normas de confidencialidad de los pacientes. Asimismo, la información de cada una de las historias de dichos pacientes, fueron suministrados bajo la oportuna y agradecida colaboración de la Dra Yajaira Roldan y su cuerpo de enfermeras.

**4.2.- Ensayos ex-vivo:** Estos experimentos se realizaron con el fin de estudiar el comportamiento inmunológico de las células TCD4 en sangre periférica *ex vivo*, en

el orden de bajo ciertos parámetros. Los experimentos *ex vivo*, abarcaron las siguientes pruebas, mediante el uso de la citometría de flujo: cuantificación de las subpoblaciones de células T (inmunofenotipaje), estudio de la expresión del receptor de muerte celular CD95/Fas, determinación de la apoptosis, estudio de la expresión de HLA-DR como marcador de activación linfocitaria, estudio de la expresión del receptor  $\alpha$  de la molécula IL-7 (CD127), estudio de la expresión de la molécula PD-1 (CD279) y la expresión simultánea de PD-1/Fas. Para todos estos ensayos, excepto el del inmunofenotipaje, utilizamos 50  $\mu$ l de sangre, se incubó en conjunto con los anticuerpos respectivos, durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregó 500  $\mu$ l de solución de lisis (BD, USA) para la hemólisis durante 5-10 minutos, luego se lavaron las células con PBS para la eliminación de los anticuerpos no fijados, se centrifugó por 10 minutos A 500 g. Finalmente, se resuspendieron las células en una solución de PBS con paraformaldehído al 1% y se procedió a analizar en el citómetro de flujo.

#### **4.2.1.- Cuantificación de las subpoblaciones de células T en Sangre Periférica.**

Se realizó fenotipaje para determinar el nivel, en valores absolutos, de las subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica, mediante el uso de citometría de flujo, utilizando una serie de anticuerpos monoclonales asociados a fluorocromos (anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD8-APC, CD45RA-FITC y CD45RO-PE). Se tomaron 50  $\mu$ l de sangre total (no coagulada), en presencia de cada uno de los anticuerpos monoclonales anteriormente mencionados y se incubaron por 30 minutos en oscuridad, y a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó la hemólisis, empleando 500  $\mu$ l de solución de lisis (BD, USA) por 5-10 minutos, para eliminar los anticuerpos no fijados se procedió a lavar las células con un buffer

fosfato (PBS 1X), utilizando la técnica de centrifugación por 10 minutos a 500 g. El análisis de las diversas intensidades de fluorescencia resultantes de las células marcadas se llevó a cabo, por medio de un citómetro de flujo de 4 canales (BD FACSCalibur). Cada muestra fue seleccionada en los leucocitos vivos en base a los parámetros “*forward scatter*” y “*side scatter*”, pertenecientes a la plantilla de adquisición y el análisis de datos del citómetro de flujo, fijando la población que agrupaba a los linfocitos T, los cuales fueron marcados con el anticuerpo monoclonal anti-CD3. Finalmente, el análisis y la cuantificación de las subpoblaciones celulares se realizaron con la adquisición de 10.000 eventos. La cuantificación de los valores absolutos de linfocitos T, se realizó a partir de los datos presentes en un examen hematológico completo. Dichas hematologías completas fueron elaboradas en colaboración con nuestro proyecto de investigación, por parte del personal del laboratorio clínico *Clinifar C.A.*, ubicado en la Escuela de Medicina J.M. Vargas. De estas hematologías, se tomaban los valores absolutos de los glóbulos blancos totales (Nº de células por cada µl de sangre), y el porcentaje de linfocitos totales en relación a los glóbulos blancos, los cuales nos permitieron conocer los valores absolutos de las diferentes subpoblaciones de células T en sangre periférica.

**4.2.2.- Medición de la expresión *ex vivo* del receptor Fas/CD95 en células T CD4+.** Se ha determinado que Fas/CD95 es una molécula que contribuye a la inducción de la apoptosis celular, donde juega un papel importante en la infección con VIH (Dyrhrol. y col., 2001). Las células T de pacientes infectados no solo muestran aumento de la expresión del receptor Fas, sino que además tiene mayor susceptibilidad a morir por esta vía, al unirse con su ligando Fas-L. Se realizó la

determinación *ex vivo* de la expresión de la molécula CD95, en las subpoblaciones linfocitarias, marcando con una serie de anticuerpos selectivos conjugados a fluorocromos (anti-CD95-FITC, anti-CD3-PerCP y anti-CD4/APC y anti-CD45RO-PE). Posteriormente se procedió al protocolo ya descrito en el punto 4.2.

#### **4.2.3.- Medición de la expresión *ex vivo* de la molécula IL-7 (CD127) en células**

**T CD4+.** La interleucina IL-7 se ha considerado como posible reguladora de la homeostasis de las células T, donde puede jugar un papel esencial en la timopoyesis, porque participa en la diferenciación de timocitos a células T vírgenes maduras en el timo, las que luego saldrán a sangre periférica. A su vez la IL-7 ha sido identificado como un factor de supervivencia de linfocitos T (Gracia y col., 2005). Se midió la expresión de su receptor, específicamente la subunidad alfa, denominada como CD127 o IL-7Ralfa. En este trabajo se estudiaron las posibles alteraciones de esta molécula en los pacientes, cuantificando su expresión *ex vivo* en la superficie de membrana de las subpoblaciones linfocitarias mediante el marcaje selectivo con anticuerpos conjugados a fluorocromos (anti-IL-7-PE, anti-CD3-PerCP y anti-CD4/APC y anti-CD45RA-FITC). Posteriormente se procedió al protocolo ya descrito en el punto 4.2.

#### **4.2.4.- Medición de la expresión *ex vivo* de la molécula HLA-DR en células T**

**CD4+.** La molécula HLA-DR se ha considerado como un marcador de activación linfocitaria (Kamoun y col., 1992). En la infección con VIH aumenta la expresión de esta molécula en los linfocitos T, como consecuencia de su activación. Se procedió a medir dicha expresión, utilizando una serie de anticuerpos selectivos conjugados

a fluorocromos (anti-HLA-DR-PE, anti-CD3 PerCP y anti-CD4/CD8-APC), Posteriormente se procedió al protocolo ya descrito en el punto 4.2.

**4.2.5.- Determinación ex vivo de la apoptosis en células T CD4+.** La cuantificación de la apoptosis se realizó mediante un kit comercial (BD®), cuyo principio está basado en la detección de fosfatidilserina. Este fosfolípido se encuentra sobre la superficie de células mononucleares en las primeras fases de la apoptosis. La fosfatidilserina es reconocida por la annexina V, la cual está conjugada con un fluorocromo. En el ensayo se tomaron 300 µl de sangre y se realizaron dos lavados consecutivos con PBS. Seguidamente se resuspendieron las células en PBS, se tomaron 50 µl de esta suspensión y se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas mediante un marcaje selectivo con annexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés), así como el porcentaje de células necróticas, marcadas mediante ioduro de propidium (BD®), el cual se adhiere al ADN de estas células, utilizando a su vez anticuerpos monoclonales (anti-CD3-PerCP y anti-CD4/CD8-APC), y finalmente el marcaje diferencial fue analizado a través de un citómetro de flujo.

**4.2.6.- Medición de la expresión ex vivo de la molécula PD-1 (CD279) y PD1/Fas en células T CD4+.** La molécula PD-1 (muerte programada de células tipo 1), ha sido recientemente estudiada, la cual consiste en la mediación de la inhibición de la respuesta de los linfocitos T (D' Souza y col., 2007). Se ha observado que este receptor, al unirse con su ligando (PD-Ls) en parte puede perjudicar la función de las células T en una infección crónica y aumentar la susceptibilidad de las células T a la apoptosis (Gordon y col., 2007). Estudios

recientes han determinado un incremento específico en la expresión de PD-1 en células T contra el VIH durante la infección. Para cuantificar esta expresión molecular de PD-1 se utilizó una serie anticuerpos selectivos conjugados a fluorocromos (anti-PD-1-PE, anti-CD3-PerCP y anti-CD4/APC y anti-CD45RA-FITC), Posteriormente se procedió al protocolo ya descrito en el punto 4.2. Simultáneamente, se realizó el mismo procedimiento para determinar la expresión de PD-1 y Fas/CD95 en conjunto, para el estudio de su correlación en la infección con VIH. Para esto se utilizó una serie de anticuerpos selectivos conjugados a fluorocromos (anti-PD-1-PE, anti-CD95-FITC, anti-CD3-PerCP y anti-CD4/APC) y finalmente el marcaje diferencial fue analizado a través de un citómetro de flujo.

**4.3.- Purificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).** Las CMSP incluyen: linfocitos B, células NK, linfocitos T y monocitos. Las células mononucleares fueron purificadas a partir de sangre periférica mediante la técnica de *centrifugación en gradiente de densidad* con Ficoll-Histopaque. Esta técnica permite separar este tipo de células de las polimorfonucleares y otros componentes que forman parte de la sangre. La centrifugación se realizó por un tiempo de 30 minutos con una velocidad de 500 g, empleando Histopaque 1077 (Sigma), que permitió la formación del gradiente. El Histopaque ofrece un medio acuoso que contiene polisacárido sintético de alto peso molecular, el cual presenta buena solubilidad en el agua, no posee grupos ionizables, no es incorporado al interior celular, es estable a pH neutro y alcalino, y no altera la presión osmótica del medio. Dicha centrifugación generó un anillo celular, por debajo de la capa compuesta por el plasma sanguíneo y por encima de la capa de eritrocitos y granulocitos. Seguidamente, se recolectaron las células presentes en dicho anillo y se realizó dos

lavados con PBS (Phosphate buffer saline) para la obtención de las CMSP, las cuales se contaron y se discriminaron las células vivas de las muertas utilizando azul de Tripano (*Tripán blue*, por sus siglas en inglés), en una cámara de Neubauer. Finalmente, estas células vivas fueron cultivadas a concentraciones definidas.

**4.4.- Ensayo *in vitro*:** Este ensayo se realizó con el fin de estudiar el comportamiento de un parámetro en particular, la proliferación específica, relacionado con la funcionalidad de los linfocitos TCD4, de los pacientes infectados con el VIH y co-infectados con VIH/*Toxoplasma gondii*, en condiciones controladas y en respuesta a una estimulación específica a antígenos del VIH y del protozooario *Toxoplasma gondii*.

**4.4.1.- Cultivo de células mononucleares de sangre periférica.** El cultivo de CMSP nos permitió estudiar la proliferación o blastogénesis de los linfocitos TCD4 en la presencia o ausencia del mitógeno fitohematoglutidina (PHA), el antígeno del VIH-1 (ENV) y el antígeno de *Toxoplasma gondii* (Tg, el cual se obtuvo a partir de un extracto crudo de antígeno soluble de taquizoítos, cepa RH, donada gentilmente por la Dra. Belkysolé Alarcón del Instituto de Medicina Tropical, UCV). El cultivo celular se realizó durante 72 horas, a 37°C, 5.2 % de CO<sub>2</sub> y a una concentración de 100.000 células/pozo por triplicado en placas de cultivo de 96 pozos en 0.2 mL de medio de cultivo RPMI-1140 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2%), estreptomina (1x 10<sup>4</sup> U/mL), penicilina (1x 10<sup>4</sup> U/mL), aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio (1%) y buffer HEPES (1%) para mantener las condiciones óptimas del cultivo celular. El PHA presentaba una concentración final de 5 µg/mL y los antígenos una concentración final de 1 µg/mL.

A partir de estas PBMC aisladas, se realizó un ensayo *in vitro* donde determinamos la proliferación de los linfocitos TCD4, con la finalidad de evaluar un parámetro relacionado con la funcionalidad de estas células, de pacientes co-infectados VIH+/*Toxoplasma gondii*, en respuesta a la estimulación específica de ciertos antígenos.

**4.4.2.- Determinación de proliferación de células T.** Se determinó la proliferación de los linfocitos TCD4+, pasada las 72 horas de cultivo, midiendo la reincorporación de Bromo-deuxiridina (BrdU), el cual es un equivalente del nucleótido uridina y puede incorporarse en la cadena de ADN, en lugar de la timidina, como deoxinucleótido en la síntesis del mismo, cuando las células se encuentran en la fase S del ciclo celular, indicando que existe proliferación. El ensayo consistió en el uso de una solución permeabilizante (saponina al 5% en PBS con suero fetal bovino) por 15 minutos, la cual permitió la permeabilización de la membrana celular de los linfocitos TCD4+, para otorgar la entrada del anticuerpo anti-BrdU al interior celular durante el marcaje con los anticuerpos restantes. Por su parte, se emplearon una serie de anticuerpos monoclonales selectivos conjugados con fluorocromos (anti-BrdU-FITC, anti-CD3-PerCP, anti-CD4APC y anti-CD45RO-PE). Finalmente, la cuantificación del porcentaje de células TCD4 cultivadas que proliferaron en respuesta a estimulación con PHA, ENV o Tg, se determinó mediante la incorporación y fijación de la BrdU al ADN de las células, por medio del análisis de fluorescencias en el citómetro de flujo para la detección del marcaje positivo.

**4.5.- Análisis estadístico.** El análisis se llevó a cabo mediante los programas estadísticos *SigmaPlot 8* y *SigmaStat* para Windows. Se realizó una comparación de los promedios obtenidos en cada uno de los grupos de estudio, mediante la prueba de *T de Student* (T-Student) no pareada 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 *Mann-Whitney Test*. Se tomaron los datos estadísticamente significativos cuando  $p \leq 0.05$ . Asimismo, las correlaciones entre algunos de los parámetros en los ensayos *ex vivo*, se obtuvieron por la prueba de *Pearson Product Moment* y para aquellos datos con distribución normal y los no paramétricos con la prueba de *Spearman*.

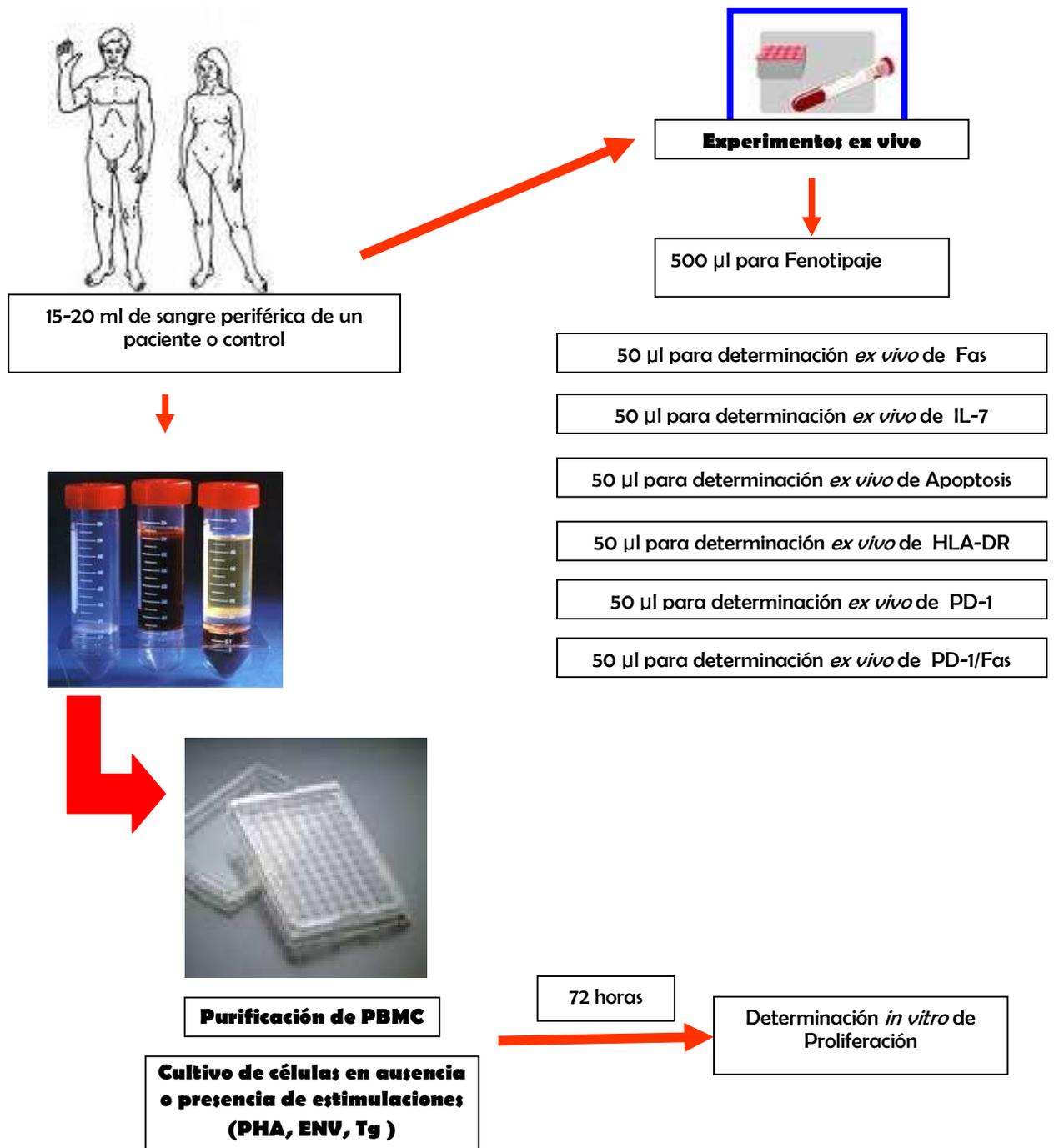


Figura 5.- Esquema general del plan de trabajo efectuado

## 5.- RESULTADOS

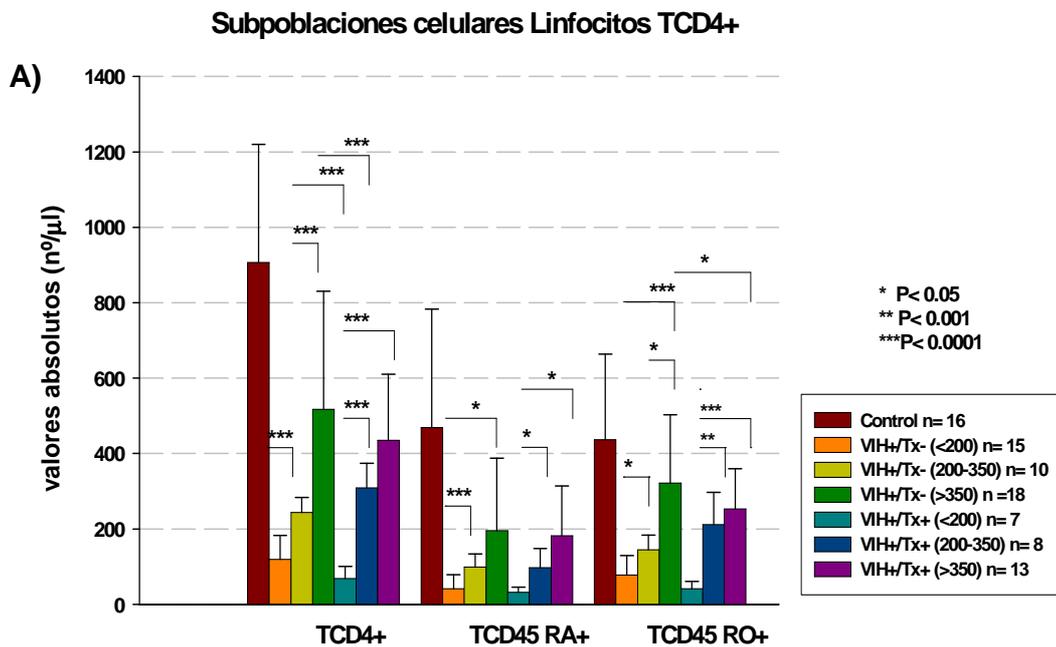
### 5.1.- Subpoblaciones celulares:

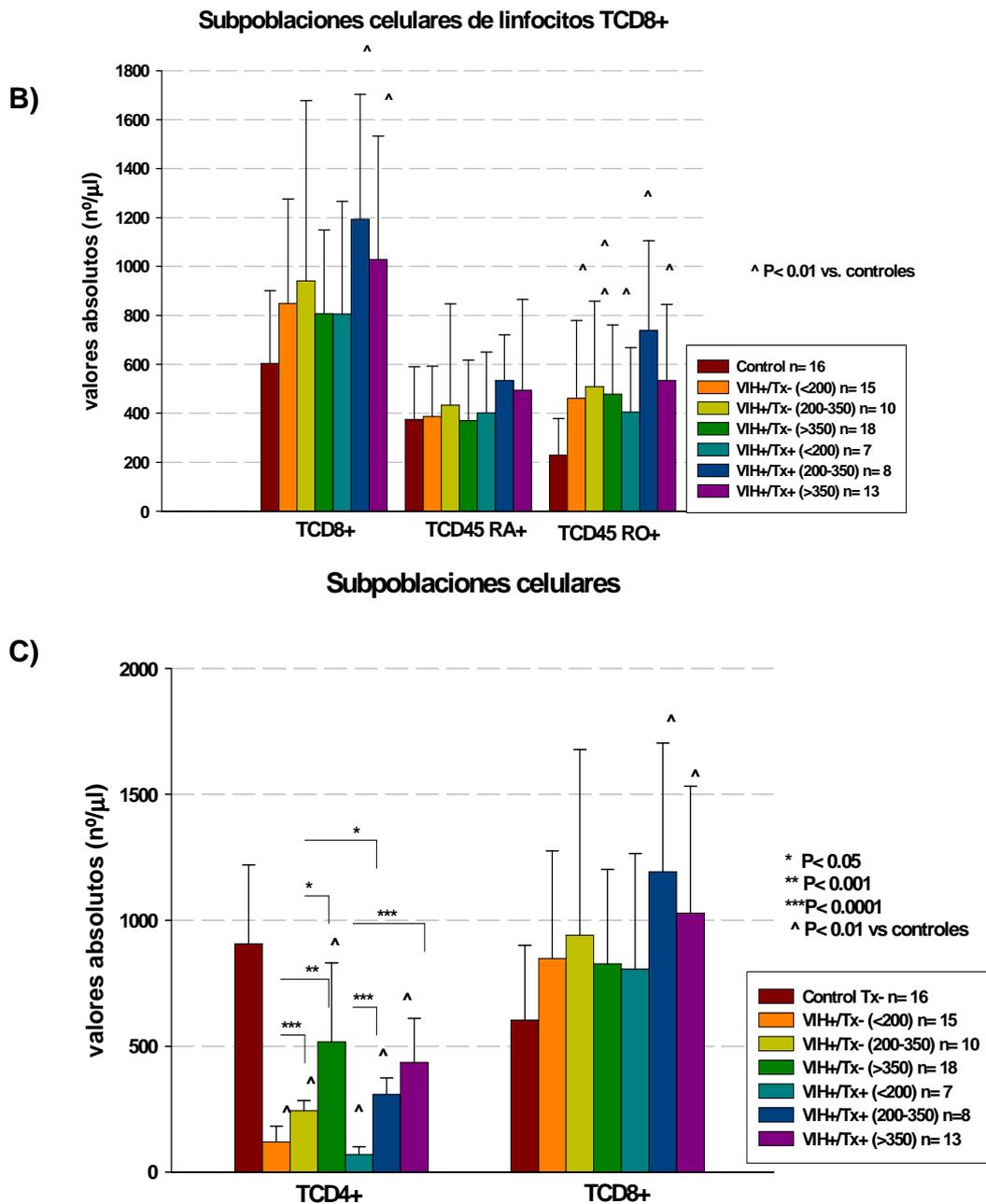
Se midieron las cantidades sanguíneas de las subpoblaciones linfocitarias de los diversos grupos en estudio, de las cuales se pudo observar cambios significativos en los grupos infectados con VIH y co-infectados con *Toxoplasma gondii*, comparándolos con los valores del grupo control (**Figura 6**). Evidentemente, se puede ver en la **Figura 6A**, la disminución de células TCD4 totales, vírgenes y memoria en sangre de los pacientes, tanto en los grupos VIH+/Tx- como en los co-infectados, siendo perceptible que los pacientes mayormente afectados son aquellos más inmunocomprometidos, los cuales tienen menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre, de ambos grupos. A su vez, se hace notorio que aquellos pacientes del grupo de co-infectados presentan relativamente un número menor de células TCD4 totales, vírgenes y memoria, en relación al grupo de pacientes infectados con VIH. Los resultados obtenidos (promedio  $\pm$  desviación estándar) de los diferentes grupos en estudio para la cantidad en sangre de linfocitos TCD4+ (totales), son los siguientes : Grupo control (**906**  $\pm$  314), pacientes VIH/Tx- con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**120**  $\pm$  63), pacientes VIH/Tx- entre 200-350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**244**  $\pm$  40), pacientes VIH/Tx- con más de 350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**517**  $\pm$  314), pacientes co-infectados VIH/Tx+ con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**69**  $\pm$  31), pacientes co-infectados VIH/Tx+ entre 200-350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**309**  $\pm$  65), y pacientes co-infectados VIH/Tx+ con más de 350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**435**  $\pm$  175). Se hace evidente, que los valores de linfocitos TCD4 son significativamente menores a medida que progresa la infección, como se observa en aquellos pacientes más

inmunosuprimidos con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre de ambos grupos, infectados con VIH seronegativos para *T. gondii* como en los co-infectados. Además, se obtuvo una disminución significativa en las subpoblaciones vírgenes y memoria en los pacientes más inmunocomprometidos en relación a los pacientes más inmunocompetentes (> 350 TCD4/ $\mu$ l en sangre) y al grupo control.

Con respecto a la población de linfocitos TCD8 sanguíneos totales, vírgenes y memoria (**Figura 6B**), se obtuvo un ligero aumento en los pacientes de los subgrupos VIH/Tx+ (200-350) TCD4/ $\mu$ l en sangre, VIH/Tx+ (> 350 TCD4/ $\mu$ l en sangre), en relación a los pacientes más inmunosuprimidos de estos grupos. Por el contrario, se encontró que el grupo VIH+/Tx- presentó una pequeña disminución de estas células en los pacientes más inmunocompetentes. A su vez, cabe destacar, que todos los pacientes infectados presentan valores más altos en comparación al grupo control. En detalle, observamos los resultados expresados como el promedio  $\pm$  desviación estándar de los linfocitos TCD8 totales: Grupo control (**604**  $\pm$  297), pacientes VIH/Tx- con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**848**  $\pm$  428), pacientes VIH/Tx- entre 200-350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**941**  $\pm$  737), pacientes VIH/Tx- con más de 350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**807**  $\pm$  342), pacientes co-infectados VIH/Tx+ con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**806**  $\pm$  459), pacientes co-infectados VIH/Tx+ entre 200-350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**1193**  $\pm$  511), y pacientes co-infectados VIH/Tx+ con más de 350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre (**1028**  $\pm$  504).

Igualmente, observamos la relación entre la población de linfocitos TCD4 totales con la población de los linfocitos TCD8 totales en la **Figura 6C**, destacando que los pacientes más inmunocompetentes presenta niveles más altos de ambas poblaciones, comparándolos con aquellos que presentan menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre, es decir, los más inmunodeficientes. Además, se encontró que estos dos subgrupos de pacientes presentan cantidades extremadamente bajas de linfocitos TCD4 totales en relación al grupo control, lo contrario sucede con los linfocitos TCD8 donde se hace evidente que ambos subgrupos de pacientes más inmunodeficientes y el resto de los subgrupos presentan valores absolutos relativamente altos de linfocitos TCD8 que el grupo control.

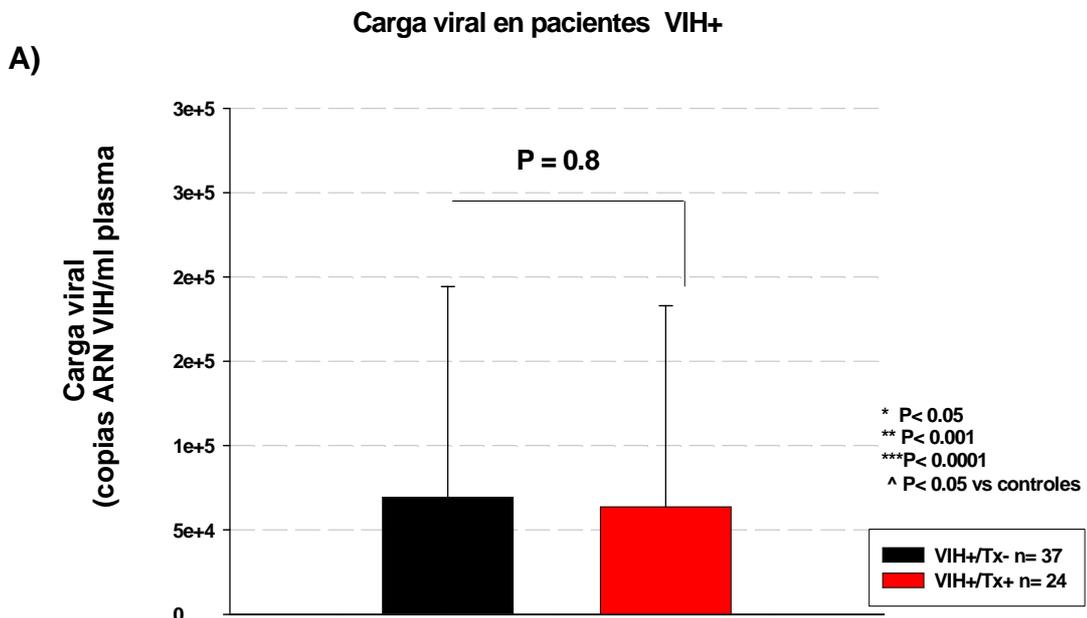


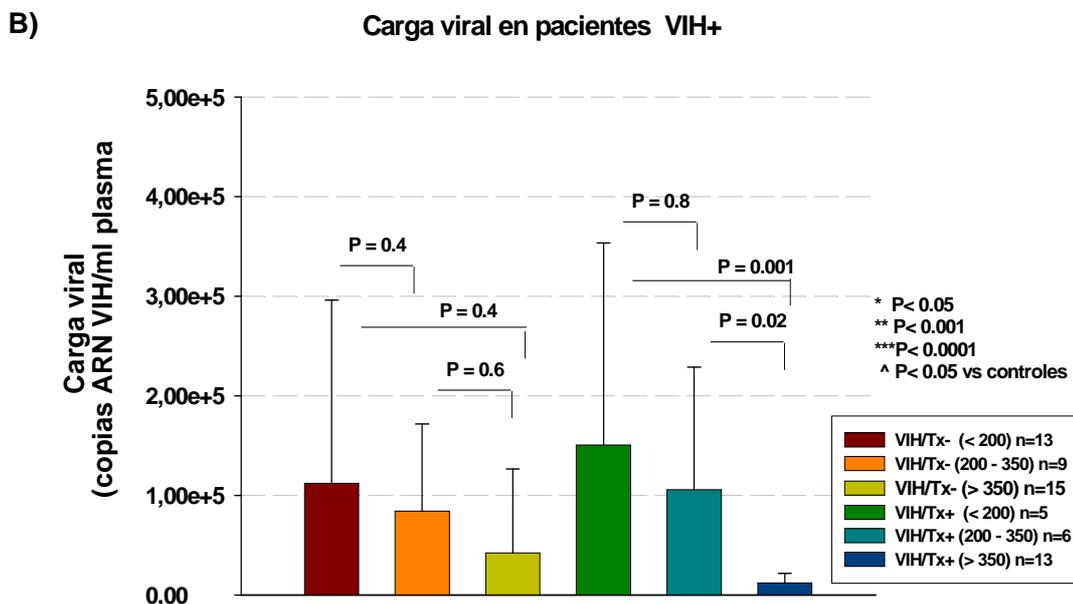


**Figura 6.- Subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica.** Se determinaron los valores absolutos de células para las subpoblaciones de linfocitos T a partir de sangre periférica total, para siete grupos humanos; **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+); **VIH+/Tx- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- (200-350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre. **(A)** de las células TCD4+ vírgenes y memoria **(B)** de las células TCD8+ vírgenes y memoria y **(C)** de las células TCD4+ y TCD8+ totales. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados.

## 5.2.- La carga viral en pacientes infectados

La cuantificación de la carga viral, se realizó al momento de incluir el paciente en el estudio, donde los resultados los podemos evidenciar en la **Figura 7**, de los cuales podemos encontrar que entre ambos grupos totalizados de pacientes (VIH+ y VIH+/Tx+) se pudo observar que presentan valores similares de partículas virales en sangre (**Figura 7A**). Sin embargo, se encontró resultados diferentes cuando se discriminó con mayor detalle a los grupos de pacientes VIH+ y VIH+/Tx+ en base a la cantidad de linfocitos T CD4 en sangre, observándose una diferencia significativa entre aquellos pacientes más inmunosuprimidos con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre, los cuales presentan un mayor valor de partículas virales en sangre en relación a los más inmunocompetentes de ambos grupos (**Figura 7B**).



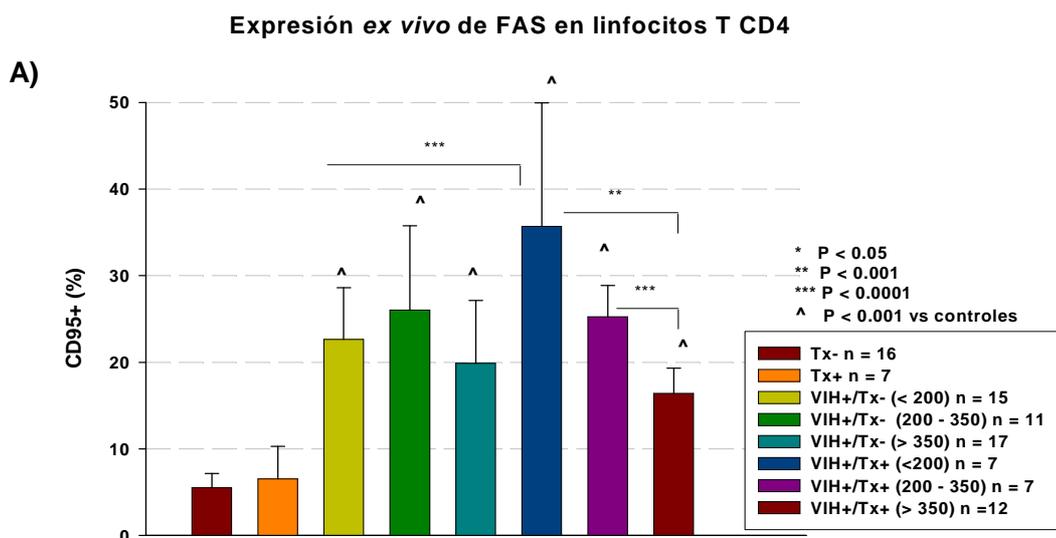


**Figura 7.- Medición de la carga viral en sangre.** Valores absolutos de la carga viral de los grupos de estudios en general VIH+/Tx- (totalizados) y VIH+/Tx+ (totalizados) (A), en diferentes subgrupos de pacientes VIH+ y VIH/Tx+ basados en los valores sanguíneos de la carga viral (B).

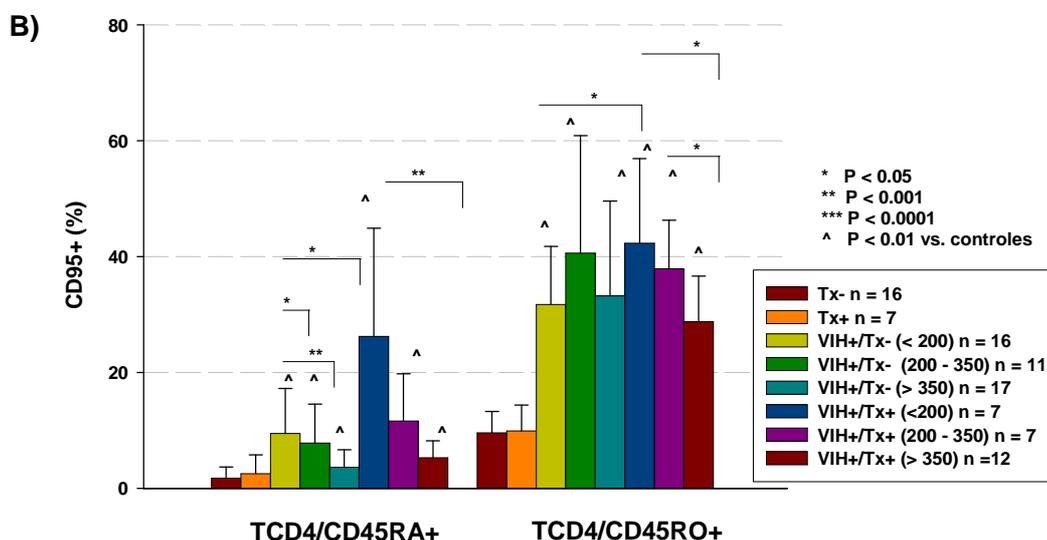
### 5.3.- Expresión de Fas *ex vivo* en las subpoblaciones linfocitarias

El papel que desarrolla la molécula Fas (CD95) en la infección con VIH, es muy importante ya que interviene en la apoptosis de las células, siendo uno de los mecanismos más acentuados en la eliminación de linfocitos TCD4 en la infección, incrementándose su expresión a medida que progresa la enfermedad (Kaplan y col., 1998). Al realizar el estudio de la expresión *ex vivo* de la molécula CD95/FAS en la población de linfocitos TCD4 de todos los pacientes y controles, se pudo observar (Figura 8) un aumento significativo de la expresión de Fas en linfocitos TCD4 totales, vírgenes y memorias en todos los grupos de pacientes infectados con VIH+, incluyendo a los co-infectados VIH+/Tx+, en relación a los grupos controles. Igualmente, se evidenció que los pacientes con menos de 200 linfocitos TCD4+/μl

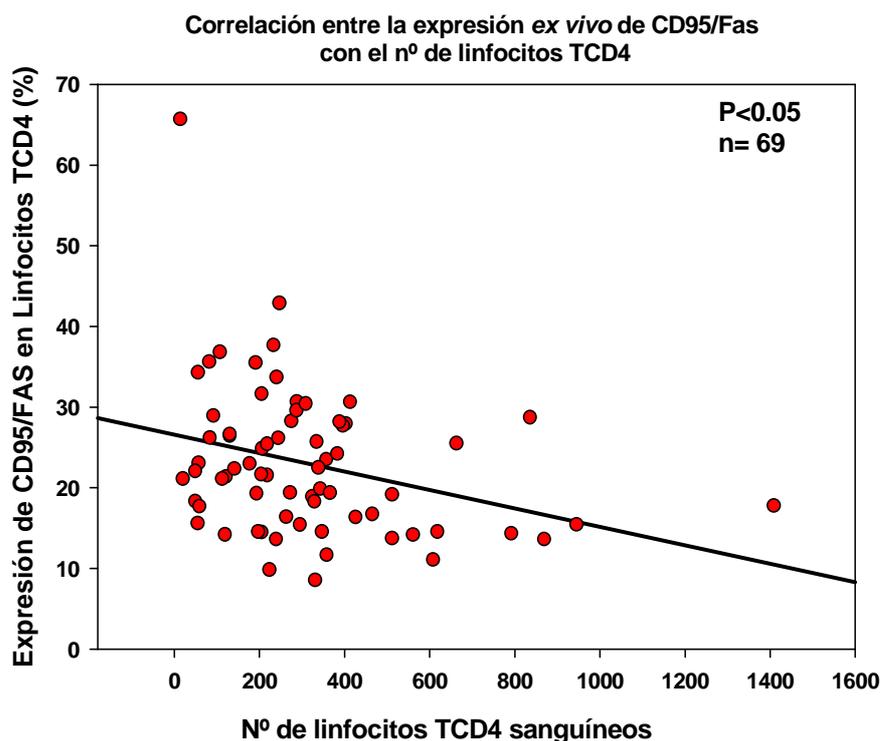
sangre, del grupo VIH+/Tx+, presentan una mayor expresión de Fas en linfocitos TCD4 total (**Figura 8A**) en relación a los restantes subgrupos. De la misma manera, se evidencia un similar incremento en el porcentaje de expresión de esta molécula en las subpoblaciones vírgenes y memoria en estos todos los grupos de pacientes infectados (**Figura 8B**), en donde se destacan con un mayor valor en la expresión de esta molécula en aquellos pacientes co-infectados más inmunosuprimidos (<200 TCD4/ $\mu$ l de sangre) en la subpoblación de linfocitos TCD4 vírgenes en relación a los grupos controles y los restantes subgrupos de pacientes infectados. Finalmente, se pudo evidenciar que existe una correlación inversa significativa ( $p < 0.05$ ) entre el número de linfocitos TCD4 de sangre periférica de pacientes VIH+ totalizados y el porcentaje de TCD4 CD95+. Se puede decir, que a medida que disminuye los niveles de linfocitos TCD4 en sangre, se evidencia un aumento progresivo de la expresión del receptor Fas/CD95 en estas células (**Figura 9**).



### Expresión ex vivo de FAS en linfocitos TCD4 vírgenes y memorias



**Figura 8.- Expresión ex vivo de Fas en linfocitos TCD4.** Se determinó el porcentaje de las células marcadas positivamente a la molécula CD95/FAS en linfocitos TCD4 totales (A), vírgenes y memoria (B), a partir de sangre periférica. Para la medida se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-FAS-FITC y el análisis de los resultados se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Los grupos de estudio fueron los siguientes: **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+) ; **VIH+/Tx- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- (200-350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l sangre. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados



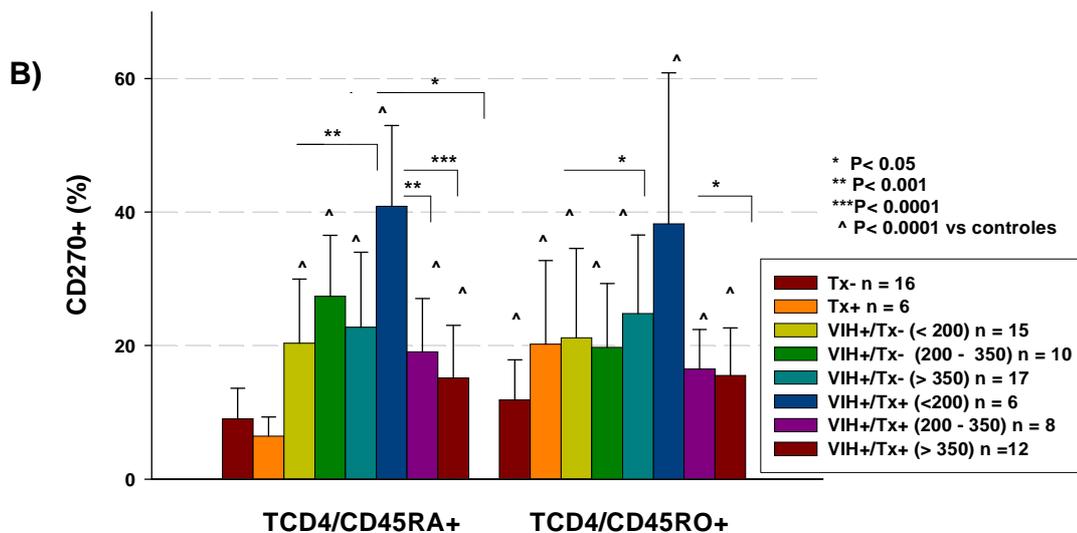
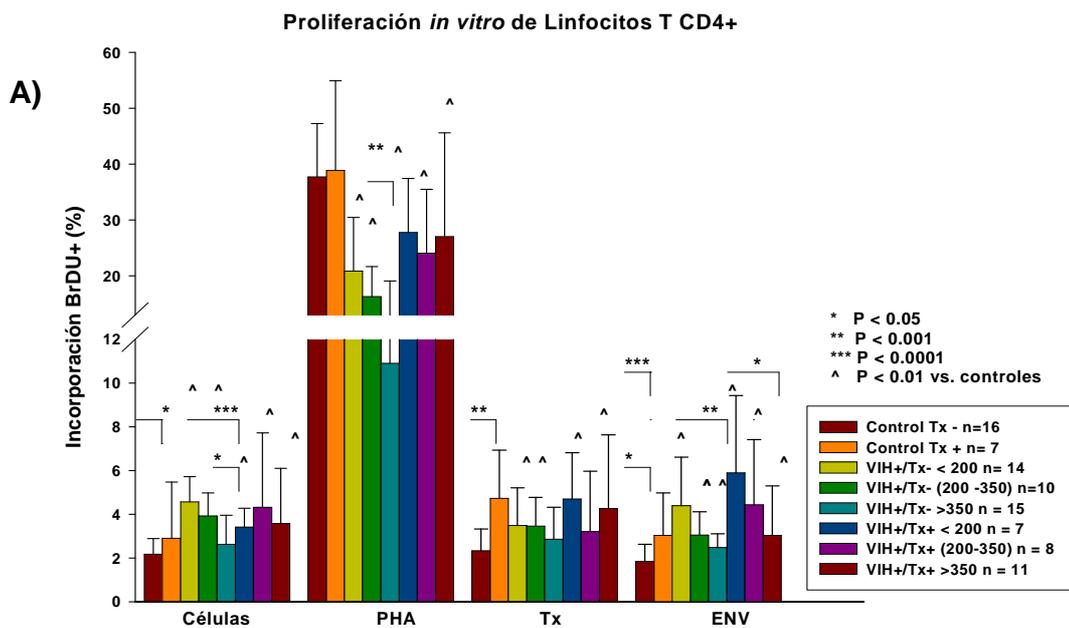
**Figura 9.- Correlación entre la expresión *ex vivo* de CD95/FAS en linfocitos TCD4 y el número de linfocitos TCD4 en sangre periférica de pacientes VIH+.** Se determinó la correlación entre la expresión *ex vivo* de la molécula CD95/FAS en linfocitos TCD4 en porcentaje y la cantidad sanguínea de linfocitos TCD4 en valores absolutos, de pacientes infectados con VIH+ totalizados. La correlación se realizó mediante la prueba estadística de Pearson con una significancia de  $p < 0.05$ .

#### **5.4.- Expresión *ex vivo* de PD-1 y PD-1/Fas en las subpoblaciones linfocitarias**

La molécula PD-1 (muerte programada de células tipo 1), consiste en una molécula recientemente estudiada que media inhibición de la respuesta de los linfocitos T (D' Souza y col., 2007). Por lo tanto se analizó la expresión *ex vivo* de esta molécula en linfocitos TCD4 en los diversos grupos de estudio. Se evidencia en los resultados obtenidos (**Figura 10**) que existe un aumento significativo de la expresión de PD-1 en los linfocitos TCD4 totales, vírgenes y memoria de todos los pacientes, siendo más evidente en los pacientes co-infectados VIH+/Tx+ más

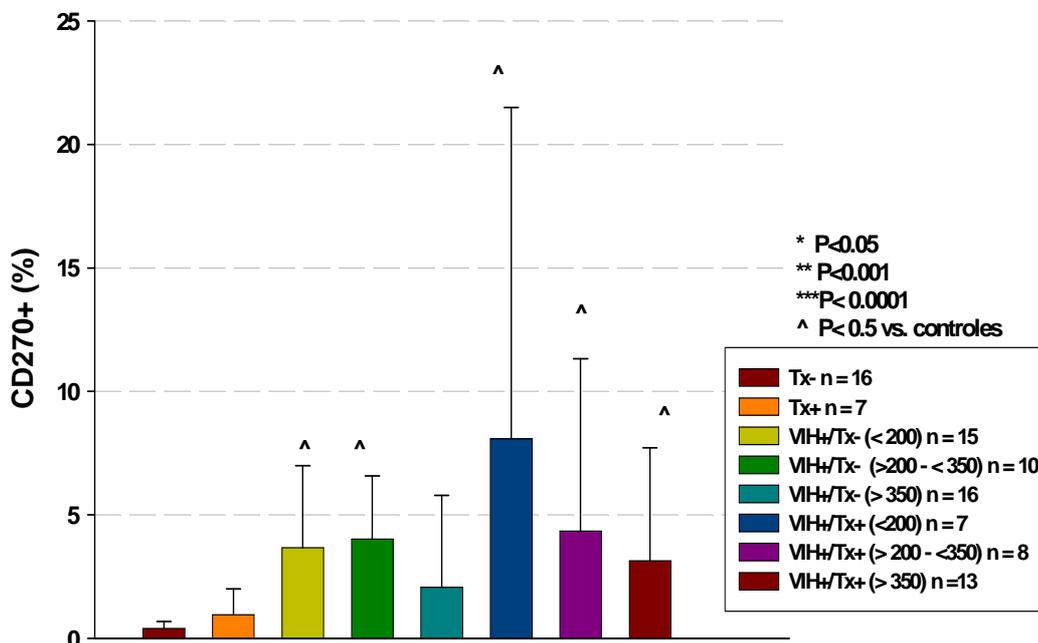
inmunodeficientes ( $< 200$  TCD4/ $\mu$ l de sangre), quienes presentan una mayor expresión de esta molécula en relación a los otros grupos, incluyendo los grupos controles. Por el contrario, los pacientes VIH+ no presentan valores significativos en ninguna de sus subpoblaciones entre los subgrupos. Por otra parte, cabe destacar, que se observó una correlación significativa inversa ( $p < 0.05$ ), donde se puede evidenciar, que a medida que se presenta una menor cantidad sanguínea de linfocitos TCD4, la expresión de PD-1 en es mayor en dichas células los pacientes infectados con VIH (totalizados) **(Figura 11)**.

Por otra parte, también evaluamos la expresión simultánea de dos moléculas principales en la infección con VIH, que tienden a inducir la apoptosis en los linfocitos T, PD-1 y Fas/CD95, donde se encontró una mayor tendencia en la expresión de ambas moléculas en aquellos pacientes más inmunosuprimidos, en relación a los grupos controles **(Figura 12)**, siendo más notorio en aquellos pacientes co-infectados con menos de 200 TCD4/ $\mu$ l de sangre, similar al comportamiento que se observó en la expresión *ex vivo* de ambas moléculas por separado, es decir, un incremento en los valores de los pacientes más inmunosuprimidos de ambos grupos, en relación a los pacientes más inmunocompetentes, sin resaltar diferencias significativas entre los grupos de pacientes .

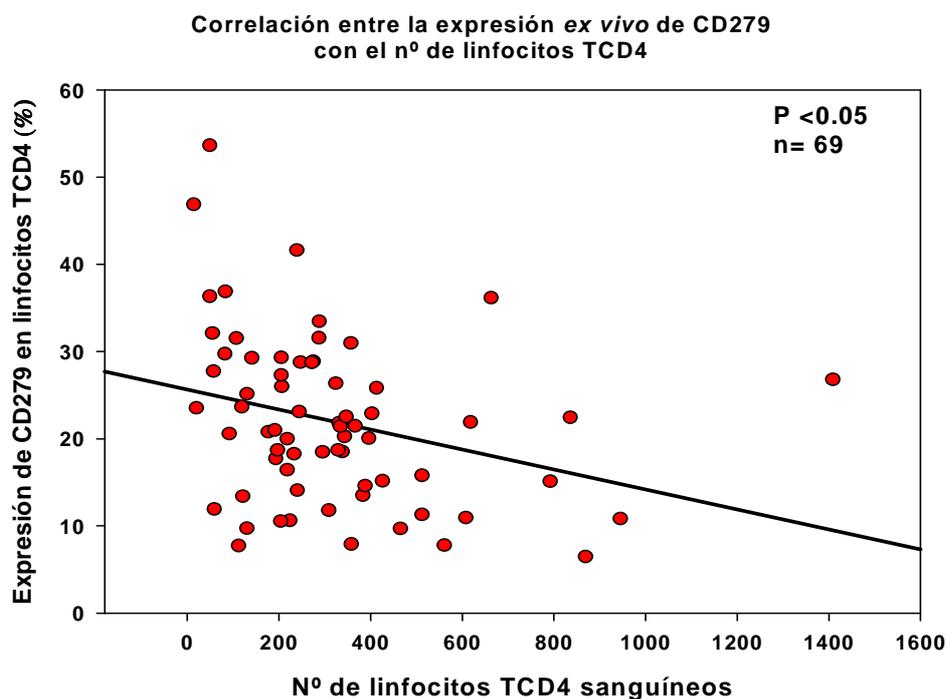


**Figura 10.- Expresión *ex vivo* de PD-1 en linfocitos TCD4.** Se determinó la expresión *ex vivo* de la molécula CD279 en linfocitos TCD4 totales (A), vírgenes y memoria (B). Para la medida se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- PD-1-PE y el análisis de los resultados se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Los grupos de estudio fueron los siguientes: **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+) ; **VIH+/Tx- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- (200 -350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l sangre. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados.

### Expresión ex vivo de PD-1/FAS en linfocitos T CD4



**Figura 11.- Expresión ex vivo de PD-1/Fas en linfocitos TCD4.** Se determinó la expresión ex vivo simultánea de CD279 y Fas/CD95 en linfocitos TCD4 totales. Para la medida se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- PD-1-PE y anti-Fas-FITc y el análisis de los resultados se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Los grupos de estudio fueron los siguientes: **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+) ; **VIH+/T- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- (200-350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4/μl sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4/μl sangre. Las barras representan el promedio ± desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados.



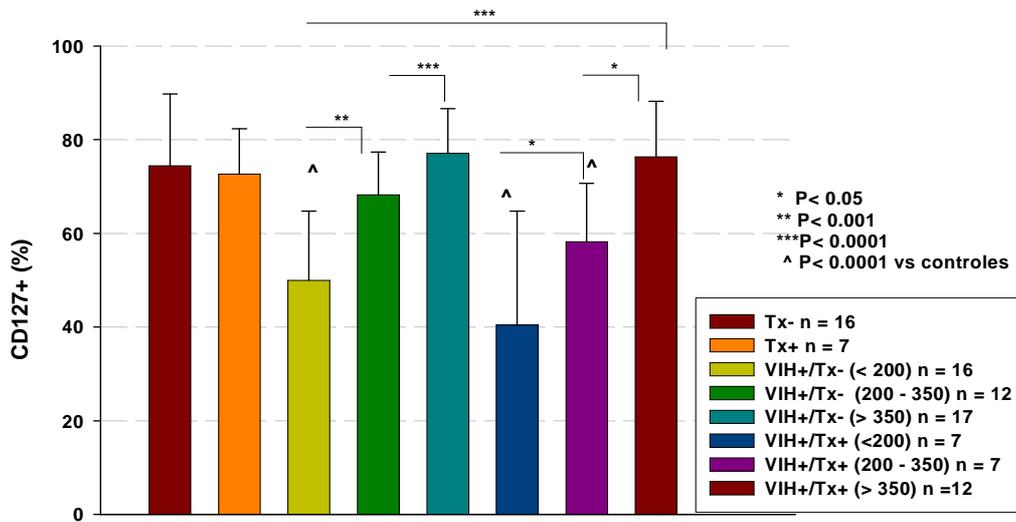
**Figura 12.- Correlación entre la expresión *ex vivo* de PD-1 y el número de linfocitos TCD4 en sangre periférica de pacientes VIH+.** Se determinó la correlación entre la expresión *ex vivo* de la molécula PD-1 en linfocitos TCD4 en porcentaje y la cantidad sanguínea de linfocitos TCD4 en valores absolutos, de pacientes infectados con VIH+ totalizados. La correlación se realizó mediante la prueba estadística de Pearson con una significancia de  $p < 0.05$ .

### 5.5.- Expresión *ex vivo* de IL-7R $\alpha$ en Linfocitos TCD4

La interleucina (IL)-7 es considerada como uno de los principales reguladores de la homeostasis de las células T, interviene en la timopoyesis y en el mantenimiento de las células T memoria (Rethi y col., 2005), la cual sus efectos depende de la expresión de su receptor, conformado por tres subunidades, siendo la específica la subunidad alfa. Por lo tanto quisimos analizar la expresión *ex vivo* de la subunidad alfa ( $\alpha$ ) del receptor de la IL-7 (CD127) de los grupos en estudio. Se pudo observar en la **Figura 13**, que la expresión de esta molécula se encuentra

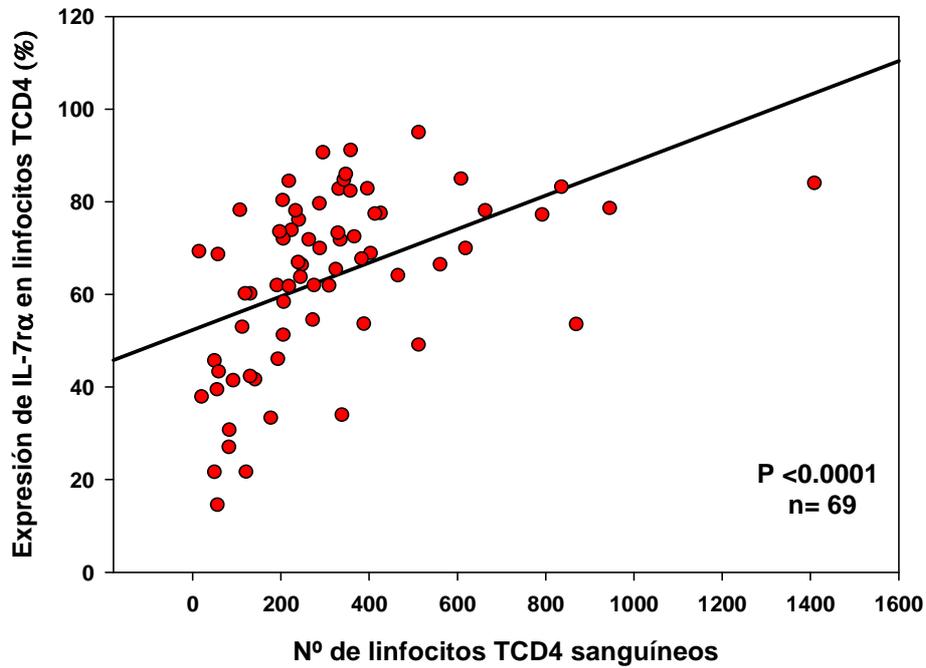
disminuida significativamente en aquellos pacientes más inmunosuprimidos de ambos grupos de pacientes infectados con VIH+, siendo más evidente el subgrupo de pacientes más inmunosuprimidos de co-infectados, en relación a los pacientes más inmunocompetentes y grupos controles. Además, si analizamos ambos grupos de pacientes VIH+ se logra observar que existe un comportamiento similar en el porcentaje de la expresión de CD127 en ambos, y se hace notorio que aquellos pacientes más inmunocompetentes presentan valores similares a los grupos controles. Igualmente, obtuvimos una posible correlación positiva ( $p < 0.0001$ ), entre la expresión de CD127 y el nº de linfocitos TCD4 en sangre periférica (**Figura 14**), en la se puede observar que dicha expresión está vinculada con el nivel de inmunodeficiencia en los pacientes VIH+, es decir, que a medida que disminuye la cantidad de linfocitos TCD4 en sangre, disminuye la expresión de dicho receptor sobre estas células.

### Expresión *ex vivo* de IL-7 $\alpha$ en linfocitos T CD4



**Figura 13.- Expresión *ex vivo* de IL-7 $\alpha$  en linfocitos TCD4.** Se determinó la expresión *ex vivo* de la molécula IL-7 $\alpha$  (CD127) en linfocitos TCD4 totales. Para la medida se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- PD-1-PE y el análisis de los resultados se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Los grupos de estudio fueron los siguientes: **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+) ; **VIH+/T- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- (200-350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados.

**Correlación de la expresión ex vivo de IL-7 $\alpha$   
con el n° de linfocitos TCD4**



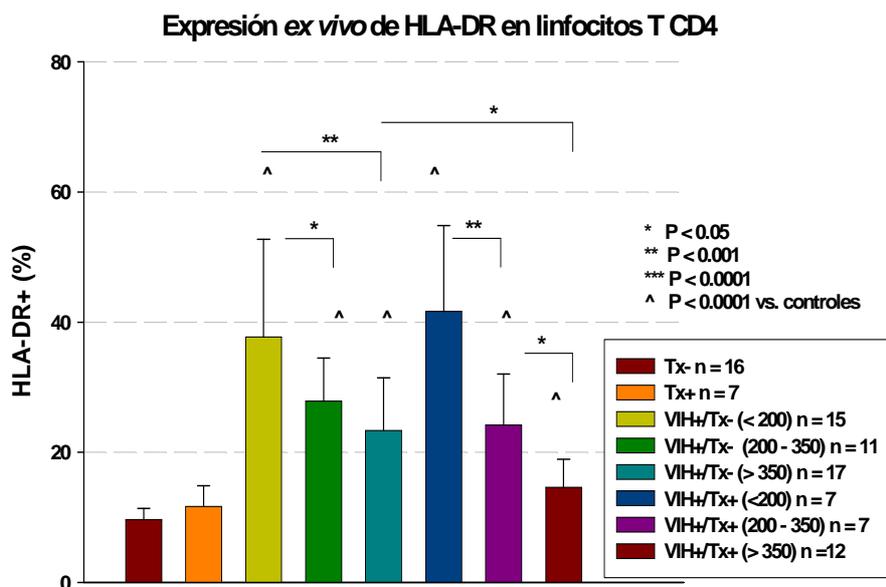
**Figura 14.- correlación entre la expresión ex vivo de IL-7 $\alpha$  y el número de linfocitos TCD4 en sangre periférica de pacientes VIH+.** Se determinó la correlación entre la expresión ex vivo de la molécula IL-7 $\alpha$  en linfocitos TCD4 en porcentaje y la cantidad sanguínea de linfocitos TCD4 en valores absolutos, de pacientes infectados con VIH+ totalizados. La correlación se realizó mediante la prueba estadística de Pearson con una significancia de  $p < 0.05$ .

## 5.6- Expresión de HLA-DR *ex vivo* en linfocitos TCD4

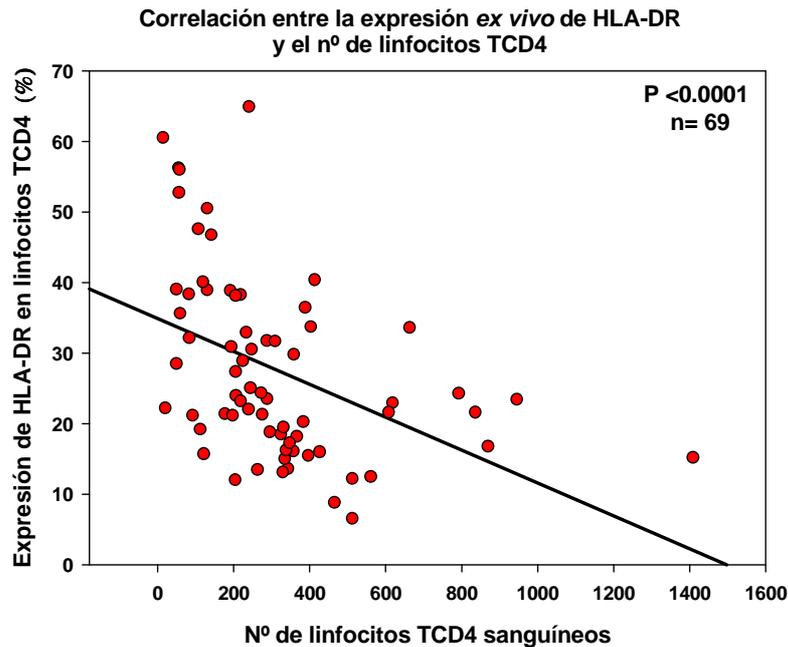
La molécula HLA-DR es conocida como un marcador específico de la activación linfocitaria, por lo tanto quisimos estudiar la expresión *ex vivo* de esta molécula en células TCD4. Se observó que los pacientes infectados con VIH en general, presentaron porcentajes significativamente mayores de linfocitos TCD4 activados en relación a los grupos controles, sin embargo, se puede evidenciar que los pacientes más inmunosuprimidos (<200 TCD4/ $\mu$ l de sangre) de ambos grupos, VIH+/Tx- y VIH+/Tx+, muestran valores significativamente más altos vs. los pacientes más inmunocompetentes (**Figura 15**). A su vez, se observa que existe un comportamiento similar entre ambos grupos de pacientes infectados. Efectivamente, los resultados que obtuvimos expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar fueron los siguientes: Grupo control Tx- = (**9.7**  $\pm$  1.7 %), grupo control Tx+ = (**11.7**  $\pm$  3.2 %), pacientes VIH/Tx- con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre = (**37.7**  $\pm$  15.0 %), pacientes VIH/Tx- entre 200-350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre = (**27.9**  $\pm$  6.6 %), pacientes VIH/Tx- con más de 350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre = (**23.4**  $\pm$  8.1 %), pacientes co-infectados VIH/Tx+ con menos de 200 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre = (**41.7**  $\pm$  13.2 %), pacientes co-infectados VIH/Tx+ entre 200-350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre = (**24.2**  $\pm$  7.8 %), y pacientes co-infectados VIH/Tx+ con más de 350 linfocitos TCD4/ $\mu$ l en sangre=(**14.6**  $\pm$  4.3 %).

Por otra parte, obtuvimos una correlación negativa con significancia estadística ( $p < 0.0001$ ), entre la expresión *ex vivo* de la molécula HLA-DR en linfocitos TCD4 y la cantidad en sangre de estas células de pacientes infectados

con VIH totalizados, lo cual nos sugiere de que en la medida que dichos pacientes presentan valores más bajos de linfocitos TCD4 en sangre, aumenta la proporción de células activadas (HLA-DR) (Figura 16).



**Figura 15.- Expresión ex vivo de HLA-DR en linfocitos TCD4.** Se determinó el porcentaje de células HLA-DR+ en linfocitos TCD4 totales a partir de sangre periférica. Para la medida se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- HLA-DR-PE y el análisis de los resultados se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Los grupos de estudio fueron los siguientes: **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+); **VIH+/T- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- (200-350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4/μl sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4/μl sangre. Las barras representan el promedio ± desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados.

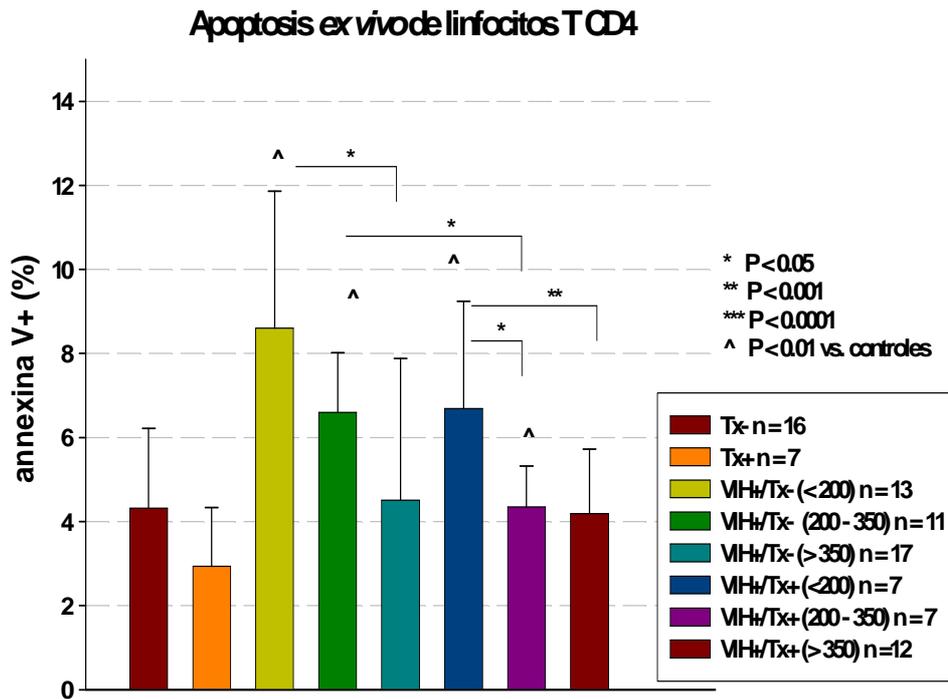


**Figura 16.- Correlación entre la expresión ex vivo de HLA-DR y el número de linfocitos TCD4 en sangre periférica de pacientes VIH+.** Se determinó la correlación entre la expresión ex vivo de la molécula HLA-DR en linfocitos TCD4 en porcentaje y la cantidad sanguínea de linfocitos TCD4 en valores absolutos, de pacientes infectados con VIH+ totalizados. La correlación se realizó mediante la prueba estadística de Pearson con una significancia de  $p < 0.05$ .

### 5.7.- Frecuencia de apoptosis ex vivo en linfocitos TDC4

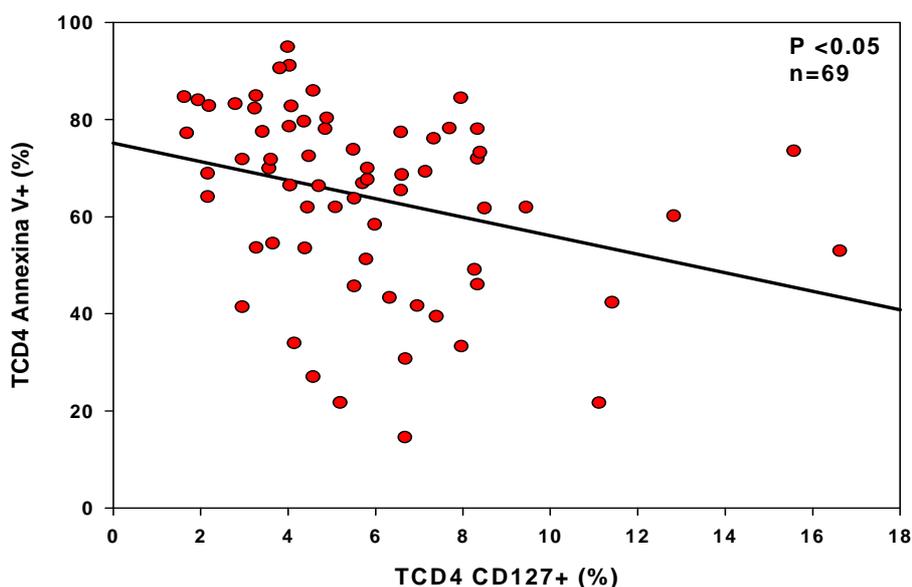
La eliminación de linfocitos T CD4 es una de las características de la infección por parte del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1), donde una de las causas principales es la masiva muerte celular de los linfocitos T mediada por la apoptosis (Kerr, 1991). En este estudio nos propusimos medir la frecuencia de apoptosis ex vivo, mediante la utilización del fenotipo Annexina V<sup>+</sup>. Podemos observar en los resultados (**Figura 17**), que los pacientes más inmunodeficientes (<200 TCD4/ $\mu$ l de sangre) de ambos grupo, VIH+/Tx- y VIH+/Tx+, presentaron una mayor frecuencia significativa de apoptosis, en relación a los grupos controles. Además, en estos grupos de pacientes más inmunodeficientes se evidenciaron

diferencias significativas en la frecuencia de apoptosis en relación al resto de los pacientes pero con mayor inmunocompetencia, especialmente con el subgrupo de los pacientes infectados con VIH con serología positiva a *T. gondii*, cuyos valores fueron más altos ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ ) con respecto al grupo de pacientes (200-350 TCD4/ $\mu$ l) y ( $> 350$  TCD4/ $\mu$ l), respectivamente. Además, observamos que los pacientes más inmunocompetentes del grupo de pacientes co-infectados mostraron una tendencia mayor con respecto al grupo control Tx+, en la cual observamos el promedio  $\pm$  desviación estándar, pacientes VIH+/Tx+ ( $> 350$  TCD4/ $\mu$ l de sangre) vs. Grupo control Tx+ (**4.2**  $\pm$  1.5 vs. **2.9**  $\pm$  1.4). A su vez, obtuvimos una correlación de forma negativa, con significancia estadística ( $p < 0.05$ ), entre la expresión ex vivo de la molécula CD127 en linfocitos TCD4 y la frecuencia de apoptosis ex vivo (**Figura 18**). Por el contrario no se obtuvo ninguna correlación entre la frecuencia de apoptosis y otros parámetros inmunológicos, como son, la expresión ex vivo de Fas/CD95 y la expresión ex vivo de la molécula PD-1 (datos no mostrados).



**Figura 17.- Apoptosis ex vivo en linfocitos TCD4.** Se determinó la expresión *ex vivo* de apoptosis en linfocitos TCD4 totales, a partir del marcaje con annexina V y yoduro de propidio y el análisis de los resultados se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Los grupos de estudio fueron los siguientes: **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+); **VIH+/T- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- (200-350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4/μl sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/μl sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4/μl sangre. Las barras representan el promedio ± desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados (p<0.05).

Correlación entre la expresión ex vivo de CD127 y la frecuencia de apoptosis en linfocitos TCD4



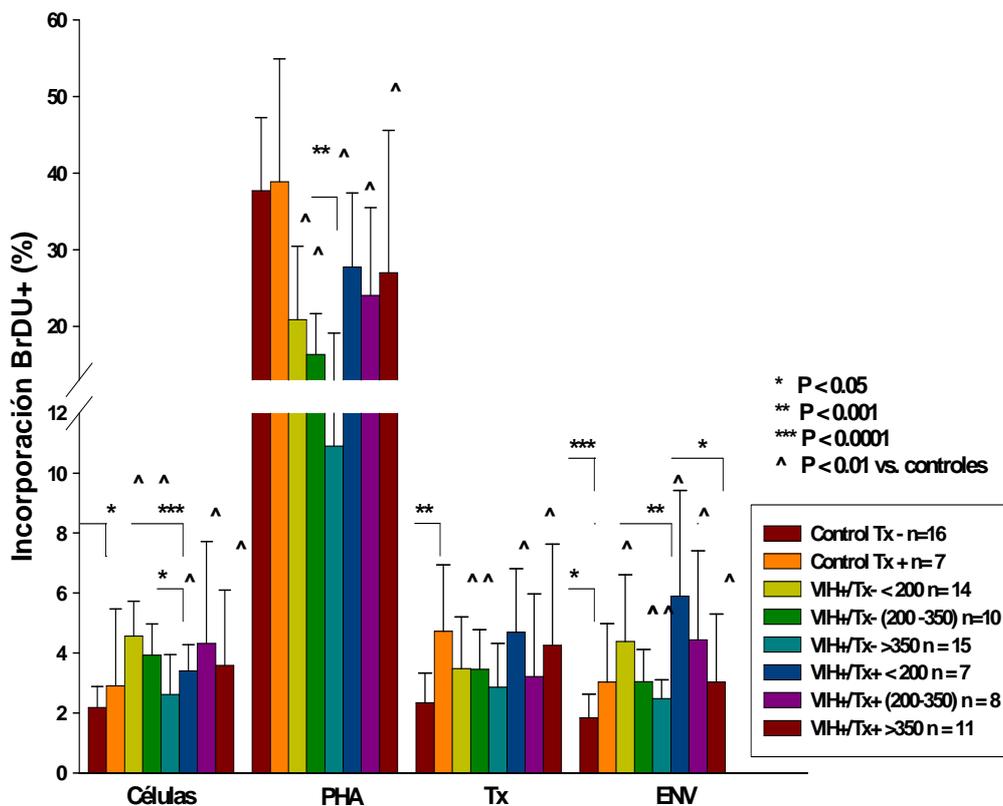
**Figura 18.- Correlación entre la expresión ex vivo de IL-7 $\alpha$  y la frecuencia de apoptosis en linfocitos TCD4 en sangre.** Se determinó la correlación entre la expresión ex vivo de la molécula IL-7 $\alpha$  en linfocitos TCD4 y el porcentaje de apoptosis ex vivo de linfocitos TCD4 de pacientes infectados con VIH+ totalizados. La correlación se realizó mediante la prueba estadística de Pearson con una significancia de  $p < 0.05$ .

### 5.7.- Proliferación *in vitro* de Linfocitos TCD4 totales

Al analizar la capacidad proliferativa de los linfocitos TCD4, se observó que el grupo de pacientes infectados con VIH y el grupo de co-infectados presentaron valores similares de células TCD4 anti-BrdU+ sin estimulación entre ellos y los grupos controles (ver **Figura 19**). A su vez, se obtuvo que el grupo de pacientes VIH mostraron porcentajes más bajos de proliferación en presencia con PHA, en relación al grupo de co-infectados y grupos controles. Por otra parte, cuando se analizó la capacidad proliferativa de linfocitos TCD4 anti-BrdU+ en presencia del antígeno de *Toxoplasma gondii* (Tx), se encontraron altos valores en el grupo control Tx+ y el grupo de pacientes co-infectados en comparación al grupo de pacientes VIH y el otro grupo control Tx-, mostrando una diferencia significativa

entre los grupos controles. Además, se evidenció que todos los pacientes infectados en condiciones de estimulación con péptidos virales ENV no tuvieron incrementos significativos en la capacidad de proliferación específica en relación a las condiciones de los mismos sin estímulo. Sin embargo, se pudo observar que el grupo de pacientes co-infectados presentaron mayor capacidad proliferativa específica ante dicho antígeno, obteniendo una mayor diferencia significativa en relación al grupo de pacientes VIH y grupos controles (**Figura 19**). Siendo más evidente en aquellos pacientes más inmunodeficientes del grupo de co-infectado, los cuales presentan mayor capacidad proliferativa específica ante la estimulación con ENV en comparación a los pacientes VIH y grupos controles.

### Proliferación *in vitro* de Linfocitos T CD4+



**Figura 19.- Proliferación *in vitro* de linfocitos T CD4+.** Se determinó el porcentaje de proliferación de linfocitos TCD4, en presencia de diferentes condiciones de estimulación *in vitro*, evaluado a 72 horas de cultivo a través de la incorporación de BrdU y el análisis de los resultados se realizó mediante la técnica de citometría de flujo. Los grupos de estudio fueron los siguientes: **controles:** voluntarios sanos con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y voluntarios sanos con serología positiva para *T. gondii* (Tx+) ; **VIH+/Tx- <200:** pacientes VIH+ con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- (200-350):** pacientes VIH+ entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx- > 350:** pacientes VIH+ con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l sangre y **VIH+/Tx+ < 200:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con menos de 200 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ (200-350):** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* entre 200 y 350 células TCD4+/ $\mu$ l sangre, **VIH+/Tx+ > 350:** pacientes VIH+ co-infectados con *T. gondii* con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l sangre. Las barras representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de los resultados individuales. Las diferencias en los promedios fueron por el método de T de Student para datos no pareados ( $p < 0.05$ ).

## 6.- DISCUSION DE RESULTADOS

La progresión de la infección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo-1 (VIH-1) en individuos, puede conllevar a la fase de SIDA, favoreciendo la adquisición de enfermedades oportunista, entre ellas, la toxoplasmosis, la cual afecta el Sistema nervioso central del paciente co-infectado mediante una encefalitis, que sin tratamiento, lo conduce a la muerte. En nuestro estudio, nosotros quisimos estudiar los linfocitos T CD4 mediante pruebas *ex vivo* e *in vitro* para medir diversos parámetros inmunológicos en pacientes VIH/Tx+, cuyos valores fueron comparados con pacientes infectados solamente con VIH y controles respectivos. Para ello se clasificó a los pacientes de acuerdo al número de linfocitos TCD4 sanguíneos que presentaban para el momento cuando se realizaron las pruebas. Esto con el fin de examinar cambios de algunos de estos parámetros inmunológicos en estas células, en diferentes fases de la infección viral, y su posible relación con la respuesta inmunológica contra el protozoario *Toxoplasma gondii*. De esta manera, se formaron dos grandes grupos: VIH+/Tx- y VIH+/Tx+, los cuales, a su vez, se conformaron en 3 subgrupos cada uno de ellos: los pacientes VIH+/Tx- con menos de 200 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (< 200 TCD4/ $\mu$ l de sangre), pacientes VIH+/Tx- entre 200-350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (200-350 TCD4/ $\mu$ l de sangre), pacientes VIH+/Tx- con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (>350 TCD4/ $\mu$ l de sangre), y los pacientes co-infectados VIH+/Tx+ con menos de 200 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (< 200 TCD4/ $\mu$ l de sangre), pacientes VIH+/Tx+ entre 200-350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (200-350 TCD4/ $\mu$ l de sangre), por ultimo pacientes VIH+/Tx+ con más de 350 células TCD4/ $\mu$ l de sangre (>350 TCD4/ $\mu$ l de

sangre). Además, se incluyeron sus respectivos grupos controles (personas sanas): Controles con serología negativa para *T. gondii* (Tx-) y controles con serología positiva para *T. gondii* (Tx+).

Se conoce que el VIH-1 ocasiona alteraciones en el sistema inmunológico, que se caracterizan principalmente por una disminución del número en sangre y en ganglios de células TCD4+, la cual invierte la proporción entre células T CD4/CD8 (Pantaleo y col., 1996). Además, la infección con VIH-1 ha mostrado afectar la supervivencia de las células TCD4+ y TCD8+, por diversos mecanismos que inducen a estas células a sufrir apoptosis (Alfonzo y col., 2008). En uno de los resultados obtenidos de este trabajo, se observa el comportamiento de los valores de linfocitos TCD4 y TCD8, con sus respectivas subpoblaciones vírgenes y memoria (**Figura 6**), donde efectivamente, se pudo constatar que los pacientes más inmunodeficientes de ambos grupos presentan valores significativamente menores tanto de linfocitos TCD4 totales como vírgenes y memoria (**Figura 6A**), mientras que los valores de linfocitos TCD8 (totales, vírgenes y memoria), fueron más altos en relación a los grupos controles (pacientes sanos)(**Figura 6B**). Sin embargo, en los estadios finales de la infección (< 200 CD4/ $\mu$ l) se pudo observar una disminución de los linfocitos T CD8 totales y memoria en los pacientes co-infectados en relación a este mismo grupo de pacientes co-infectados pero con mayor inmunocompetencia (> 350 CD4/ $\mu$ l). El aumento de las células CD8 sanguíneas durante las primeras fases de la infección con VIH ha sido estudiada, de lo cual se conoce que durante la fase aguda de la infección viral se desarrolla una respuesta vigorosa de células TCD8 oligoclonal, posible razón del aumento exacerbado de estas células en sangre. Sin embargo, en estadios tardíos de la enfermedad, el número de células TCD8 decrecen por lo que se ha planteado que

unos de los factores en que el paciente presenta la fase de Sida (Petrovas y col., 2005, Blanco y col., 2001). Muchos estudios han sustentado la importancia de la mediación de los linfocitos TCD8 en el control de la infección. Una actividad CTL (cytotoxic T lymphocyte) parece ser el mecanismo de defensa inmune primaria en estados tempranos de la infección, cuando la neutralización de anticuerpos aún no ha aparecido (Petrovas y col., 2005). Sin embargo, estos linfocitos TCD8, sufren alteraciones a lo largo del tiempo por efectos indirectos de la replicación viral, afectando sus mecanismos efectores y sus niveles cuantitativos en sangre (Alfonzo y col., 2008), tal como se pudo evidenciar en nuestros resultados (**Figura 6B**).

Como mencionamos anteriormente, uno de los marcadores principales en la infección con VIH a lo largo de la fase crónica en pacientes VIH+ es la disminución de células TCD4+. La pérdida de estas células TCD4+, se puede deber a varias causas como la muerte indirecta de células no infectadas por liberación de proteínas virales pro-apoptóticas (Li y col., 1995), destrucción de efectores específicos en los tejidos infectados por el virus, y expresión alteradas de proteínas reguladoras de la apoptosis tanto en las células T, como en las células presentadoras de antígeno, como consecuencia de activación celular crónica mediada por el virus (Salmen y col., 2007). La carga viral en cierta manera también juega un papel fundamental en la disminución de los niveles sanguíneos de esta célula TCD4+ en los pacientes infectados, aunque observamos en nuestros resultados que la diferencia en sus promedios no es totalmente significativa, nos muestra una tendencia a tener una mayor carga viral aquellos pacientes más inmunocomprometidos de ambos grupos en relación a aquellos pacientes más inmunocompetentes (**Figura 7B**). A su vez, observamos que en estos pacientes más inmunodeficientes del grupo de co-infectados presentan los más altos valores

de carga viral, por lo que se puede inducir que puede estar relacionado con los más bajos valores sanguíneos que encontramos en este subgrupo linfocitos TCD4. Sin embargo, cuando analizamos la carga viral por grupo de pacientes totalizados, se pudo constatar que presentaban un valor similar de la carga viral entre ambos grupos de pacientes (totalizados) (**Figura 7A**), lo que sugiere la importancia de realizar los análisis de este parámetro en grupos de pacientes con diferentes estadios de la infección viral y no de forma totalizada, ya que en esta última forma no permite discriminar los resultados de la carga viral y otros parámetros inmunológicos. Finalmente, estos resultados sugieren que la carga viral es uno de los parámetros que pueden estar influyendo en la pérdida de linfocitos TCD4+ en los pacientes infectados con VIH.

Otro mecanismo molecular muy importante que contribuye a la eliminación de los linfocitos TCD4+ es mediante la participación de dos moléculas conocidas como Fas/CD95, que corresponde al receptor presente en la superficie celular y Fas ligando (FasL) las cuales inducen la apoptosis. Se conocen dos vías, por las cuales puede ocurrir una sobre-expresión de CD95 en linfocitos T, una de ellas es la que resulta en respuesta a la activación linfocitaria, como proceso fisiológico que ayuda a eliminar el exceso de células T efectoras durante la respuesta inmunitaria, en la cual se observa la activación de la célula T, señalización mediante CD95 y re-estimulación antigénica del TCR (Leonardo y col., 1995). La segunda vía, se debe directamente a las proteínas del VIH-1, que ejercen diversos efectos nocivos tales como: a) la proteína Tat del VIH-1, la cual ha sido demostrada como inductora de apoptosis en linfocitos T no infectados, b) la proteína gp-120 del VIH-1 que se entrecruza con los linfocitos T CD4 y ocasiona apoptosis en estas células, y por último c) la proteína Vpr del VIH-1, la cual tiene un efecto citostático o citotóxico en

las células (Kaplan y col, 1998). Finalmente, podemos decir que estas proteínas tienen el efecto de incrementar la expresión de CD95 en células T no infectadas, conduciéndolas a la apoptosis. Nosotros estudiamos la expresión del receptor Fas/CD95, y demostramos que todos los pacientes infectados con VIH, presentan un aumento significativo en la expresión de Fas, tanto en linfocitos TCD4+ totales como en sus subpoblaciones con respecto a los grupos controles (**Figura 8**), sin embargo se hace evidente, que existe una mayor sobreexpresión de esta molécula en los pacientes co-infectados VIH+/Tx+ (**Figura 8A**), indicando que la co-infección con *T. gondii* pareciera ejercer un mayor efecto en la expresión de Fas/CD95 en linfocitos TCD4, que cuando está presente solamente la infección con el VIH. No podemos explicar cual o cuales serían los mecanismos que ocasionan este fenómeno, pero seguramente el protozooario está creando un microambiente que favorece conjuntamente con la presencia del virus la sobreexpresión de CD95/Fas. Algunos estudios, que se han enfocado en la infección con *T. gondii* han demostrado que la expresión de Fas, como la apoptosis mediada por Fas-FasL, en ratones infectados con dicho parásito, parece ser regulada por la secreción de citocinas pro-inflamatorias, como son la IL-2 e INF-gamma. Estos resultados sugieren un papel crucial en la interacción de Fas y su ligando en la apoptosis de células T en la infección con *T. gondii* (Lüder y Gross, 2005).

La expresión de Fas juega un papel importante en la progresión de la infección con VIH, acentuando la disminución de los linfocitos TCD4+. Este efecto lo pudimos apreciar, al analizar la correlación negativa que obtuvimos (**Figura 9**), donde se muestra que a medida que progresa la enfermedad y la cantidad de células TCD4+ sanguíneas son menores, la expresión de Fas se ve significativamente aumentada. Este resultado ha sido obtenido en diversos trabajos

previos, los cuales señalan que la proporción de la expresión de Fas en células T de personas infectadas con VIH aumenta con la progresión de la enfermedad (Kaplan y col., 1998).

Otra molécula que estudiamos su expresión en linfocitos T CD4 es una recientemente descubierta, la PD-1 (*programmed death*), también conocida como muerte programada de células tipo 1, la cual parece influir en la inhibición de la respuesta de linfocitos T en infecciones como la del VIH-1 (D' Souza y col., 2007). Se conoce que la molécula PD-1 (CD279) es expresada en células TCD4, células TCD8, células NKT, células B, y monocitos activados. Esta molécula presenta dos tipos de ligando, PD-L1 y PD-L2. La PD-L2 (B7-DC; CD273), es solamente expresada en células dendríticas y macrófagos, mientras que PD-L1 es ampliamente expresada en células presentadoras de antígeno profesionales como no profesionales (APCs), células B, células T y macrófagos. Estudios recientes han demostrado que la PD-1 es altamente expresada por células TCD8, en infecciones como LCMV (lymphocytic choriomeningitis virus), en su fase crónica, y que la vía PD-1-PD-L juega un principal papel en la regulación del agotamiento de las células T, durante esta infección (Freeman y col., 2007). Otros estudios, han indicado similarmente este papel en el agotamiento de células TCD8 por la vía de PD-1-PD-L en la infección por el VIH (Petrovas y col., 2006). Efectivamente, los autores demuestran que la expresión de PD-1 es elevada en las células TCD8 específicas del VIH y que bloqueando esta vía, conduce a incrementar la proliferación de células T y la producción de citocinas efectoras (Petrovas y col., 2006). Nosotros al evaluar la expresión de PD-1 en linfocitos TCD4 totales, vírgenes y memorias en condiciones *ex vivo*, pudimos constatar una elevada y significativa expresión de

esta molécula en linfocitos TCD4 totales, igual que en sus subpoblaciones, en todos los pacientes VIH+ vs. Grupo control, siendo más evidente la alta expresión de PD-1 en aquellos pacientes más inmunodeficientes del grupo de co-infectados (VIH+/Tx+) en relación a aquellos pacientes más inmunodeficientes del otro grupo (VIH+/Tx-) (**Figura 10**). Además se pudo observar, que existe una correlación negativa, entre la expresión de CD279 y el grado de inmunodeficiencia de los pacientes VIH+ totalizados, lo que quiere decir, que a medida que progresa la enfermedad, esta molécula se expresa en altos valores, con significancia estadística ( $p < 0.05$ ) (**Figura 12**). Según la literatura, durante la fase crónica de una infección viral e infecciones parasitarias, el aumento de PD-1 y sus ligandos, puede atenuar la respuesta inmune y facilitar la persistencia de los agentes patógenos, ya que estas moléculas intervienen en la regulación de la respuesta inmune (Freeman y col., 2007), lo que nos puede dar alguna explicación sobre la expresión alta que obtuvimos en aquellos pacientes más inmunodeficientes del grupo VIH+/Tx+ en relación a los demás grupos. Es decir, en fases más avanzadas de la infección viral induce una mayor expresión de la PD-1, posiblemente interviniendo en la permanente activación de la respuesta inmune, específicamente los linfocitos T, contribuyendo así al fenómeno conocido como *agotamiento* de los linfocitos T ante esta infección crónica, lo cual permite que se prolongue en el tiempo. Posiblemente, nuestros pacientes infectados con VIH, la alta expresión de esta molécula sobre los linfocitos T CD4 sea una de las causas de la fase crónica de la infección, la cual no ocurre resolución de la misma. Pero el hecho que estos pacientes presenten una posible co-infección, en este caso, con *T. gondii*, el cuadro se agrava más, reflejándose una mayor expresión de la molécula PD-1 e inhibiendo más los mecanismos efectores del linfocito T CD4. Una posible confirmación de esta

especulación es que al analizar los resultados obtenidos en la evaluación de la presencia simultánea de PD-1 y FAS/CD95, se obtuvo nuevamente que todos los pacientes VIH+, presentaron valores significativamente mayores en comparación con el grupo control, no obstante, se observa que los pacientes más inmunodeficientes del grupo de co-infectados poseen una expresión simultánea de ambas moléculas mayor vs. pacientes más inmunodeficientes del grupo de VIH+/Tx- (**Figura 11**), indicando que ambas moléculas en conjunto pueden estar afectadas por la presencia de las dos infecciones.

La homeostasis de linfocitos T, es mediada por una interleucina denominada IL-7, la cual ejerce efectos positivos en la supervivencia y en la proliferación homeostática de estas células, donde los individuos infectados con VIH, se ha observado que son gravemente afectados debido a la baja expresión del receptor alfa de la interleucina-7 (IL-7R $\alpha$ ) (Rethi y col., 2005). La importancia de la mediación de señales por parte de la IL-7 para el desarrollo de células T, ha sido confirmada en humanos, con la demostración mediante mutaciones del gen IL7R- $\alpha$ , el cual codifica para la molécula IL-7R $\alpha$  (también conocida como CD127). Esta interleucina, la IL-7 ha sido identificada como un factor soluble secretado por células estromales en la médula ósea y el timo, ayudando a la proliferación de linfocitos T y B inmaduros (Giliani y col., 2005). Los efectos de la IL-7, se obtiene al unirse con la subunidad  $\alpha$  de su receptor, la cual se encuentra en la superficie de membranas de linfocitos T, B y células NK, activando una cadena de cascadas en el interior de la célula, ejerciendo también efectos en la proliferación, por lo tanto, su expresión en la respuesta inmunitaria es regulada con cambios dependientes de la madurez y estado de activación de la célula (Goldrath y col., 2002). Al analizar

nuestros resultados (**Figura 13**), observamos que aquellos pacientes más inmunodeficientes tanto del grupo VIH+/Tx-, como del grupo VIH+/Tx+, presentan una menor expresión significativa de CD127 en sus linfocitos T CD4 en relación a los grupos controles, por consecuente, se puede inducir la alta probabilidad que la baja expresión de esta molécula *ex vivo*, puede estar provocando una mínima sobrevivencia de los linfocitos TCD4. Trabajos previos han demostrado esta última afirmación, que la baja expresión de IL-7R $\alpha$  e está relacionada con un incremento de apoptosis en dichas células. (Rethi y col., 2005). Por otra parte, nosotros encontramos una correlación significativamente positiva ( $p < 0.0001$ ), entre el porcentaje de la expresión de la molécula CD127 y la concentración sanguínea de células TCD4+, lo que nos sugiere, que a medida que progresa la infección viral, este receptor disminuye su expresión en dichas células de pacientes VIH+ totalizados (**Figura 13**). Estos resultados confirman estudios previos pero los autores encuentran además, una elevada concentración de IL-7 en el suero de pacientes infectados con VIH, la cual está correlacionada con los bajos valores de expresión de su receptor en células TCD4+, indicando una sobreproducción de la citocina, posiblemente como un mecanismo para compensar la baja expresión de su receptor y por ende, de sus bajos efectos (Rethi y col., 2005).

Una de las moléculas que se ha considerado como marcador de la actividad linfocitaria, es conocida como HLA-DR, cuyo aumento de la expresión de esta molécula ocurre en consecuencia a dicha activación (Maino y col. 1995; Kamoun y col., 1992). Por consiguiente, se estudió este parámetro en nuestro trabajo, ya que durante la infección con VIH se observa una tendencia a aumentar la expresión de dicha molécula, la cual tiene relación con la activación crónica del sistema

inmunitario, y que ha sido asociada con la progresión de la enfermedad (Liu y col., 1997) y así nos permitió estudiar el nivel de activación del sistema inmune de los pacientes co-infectados VIH+/Tx+. Por consiguiente, los resultados obtenidos, señalan que en efecto los pacientes infectados con VIH-1 presentan valores significativamente altos en relación a los grupos controles, donde la expresión de esta molécula la encontramos en valores mucho más altos en linfocitos TCD4 activados en los pacientes VIH+ más inmunodeficientes de ambos grupos (**Figura 15**). Cuando analizamos la correlación entre la expresión de la molécula HLA-DR y la cantidad de linfocitos T CD4 en sangre, encontramos una correlación significativamente negativa ( $p < 0.0001$ ), lo cual nos demuestra que la expresión de la molécula HLA-DR está asociada con la progresión de la infección (**Figura 16**). Esto nos sugiere que existe un incremento gradual del porcentaje de linfocitos TCD4 que expresan dicho marcador durante la progresión viral, donde la activación linfocitaria puede estar asociada al aumento paulatino de la carga viral del paciente. La literatura nos indica que este aumento de la activación linfocitaria, puede conllevar a un aumento de la expresión de Fas/CD95, debido a diversos efectos como es la concentración aumentada de proteínas virales, que traen como consecuencia la activación linfocitaria (Leonardo y col., 1995; Li y col., 1995).

Unos de los fenómenos más importantes en la infección con VIH-1, es el establecimiento de la apoptosis, como mecanismo efector y regulador de la respuesta inmune. A su vez, estudios han demostrado que la apoptosis juega un papel muy importante en la infección con *T. gondii*, donde la apoptosis en células T puede ser en gran parte mediada por Fas, pero también ocurre independientemente de esta molécula, bajo ciertas condiciones. Dependiendo de la magnitud de la

apoptosis en células T, puede estar asociada con la restricción de la replicación del parásito o facilitar una interacción estable entre el parásito y el hospedador. Aunque, *T. gondii* también establece estrategias que inhiben la apoptosis en células del hospedador. Estudios explican este fenómeno indicando que la apoptosis es bloqueada por mecanismos indirectos en células no infectadas circundantes, de esta manera modulando la respuesta inflamatoria inducida por el al parásito. Por el contrario, la inhibición de la apoptosis en células infectadas, por interferencia directa en las señales cascada de la apoptosis es aún para facilitar el desarrollo intracelular de *T. gondii* (Lüder y Gross, 2005). Por tal motivo uno de nuestros principales enfoques fue el de estudiar este fenómeno *ex vivo* en linfocitos TCD4 en la co-infección VIH+/Tx+. Se pudo observar en los resultados obtenidos, que los pacientes VIH+ en general presentaron valores altamente significativos de células TCD4+ apoptóticas *ex vivo* en relación a los grupos controles. Así mismo, se evidencia que los pacientes más inmunosuprimidos de ambos grupos VIH+/Tx- y VIH+/Tx+, presentan un aumento significativo de apoptosis en linfocitos TCD4+, con respecto a los pacientes más inmunocompetentes de dichos grupos. En cuanto a los pacientes co-infectados encontramos que los pacientes más inmunodeficientes del grupo presentan una mayor cantidad de células apoptóticas en relación a los pacientes más inmunocompetentes de este grupo (**Figura 17**). Esto pudiese ser explicado, donde el estrés de la infección parasitaria con *T. gondii* puede inducir la muerte celular apoptótica de la célula hospedora, tal como ha sido demostrado en trabajo previo (Nash y col., 1998). Ciertos estudios demuestran que en presencia de la infección con *T.gondii*, los linfocitos TCD4 y TCD8 ejercen una actividad citolítica contra las células blanco infectadas por el parásito, por la vía de la apoptosis. Estos linfocitos TCD8 representan la célula efectora más relevante en el efectivo control

de la infección por *T.gondii*, por lo que la inducción de la apoptosis, es un mecanismo efector importante para el control de la replicación del parásito. Sin embargo, este factor se complementa con el hecho de que las células TCD4 y TCD8 no solo ejercen efectos citotóxicos, sino también producen citocinas tal como el IFN-gamma, el cual, es otro factor sumamente importante para la protección contra el parásito (Lüder y Gross, 2005).

Varios estudios clínicos, han establecido una correlación positiva entre la magnitud de apoptosis y la progresión de la infección viral (Petrovas y col., 2005). Igualmente, la progresión de esta enfermedad, a su vez va correlacionada tanto con la apoptosis como con la carga viral. Por el contrario, los niveles de células T CD4, está inversamente correlacionada con el nivel de apoptosis (Alimonti y col., 2003). Una de las causas de este aumento de apoptosis en dichas células, puede explicarse debido a la alta expresión de Fas/CD95 que apreciamos en resultados discutidos anteriormente, donde encontramos que los pacientes VIH+ y co-infectados más inmunosuprimidos presentan niveles aumentados en la expresión de esta molécula, que a su vez se correlaciona con la disminución de las células TCD4+, por lo que se puede decir, que a medida que aumenta la expresión de Fas/CD95 en linfocitos TCD4+, existe una mayor apoptosis en dichas células en condiciones *ex vivo*, a pesar de que no se obtuvo una correlación significativa (datos no mostrados) entre la expresión *ex vivo* de Fas/CD95 y la frecuencia de apoptosis en células TCD4+ *ex vivo* de pacientes VIH+ totalizados. Este resultado nos sugiere que no sólo este parámetro puede estar afectando a dichas células conduciéndolas a la apoptosis. Existen otros eventos pro-apoptóticos que se encuentran alterados en esta infección viral, uno de ellos es una de las vías

recientemente estudiadas la cual consiste en la interacción de las moléculas PD1-PD-L y aquella vía que implica la disminución de niveles intracelulares de Bcl-2 (molécula antiapoptótica) y Bcl-xL, siendo estas importantes para células activadas (Petrovas y col., 2005; 2006). A pesar que no podemos explicar las posibles causas, cabe destacar que en nuestros resultados, no se observó una correlación significativa entre la expresión de PD-1 y la frecuencia de apoptosis *ex vivo* en dichas células de pacientes VIH+ totalizados (datos no mostrados). No tenemos explicación para estos resultados, a pesar que trabajos previos encuentran tales correlaciones entre estos parámetros, una posible explicación pudiese ser los grupos tan heterogéneos de pacientes y su inmunidad particular, las diferencias en las cepas virales infectantes o el estadio de la infección viral.

Otro aspecto, que parece ser importante en cuanto al establecimiento de la apoptosis en linfocitos TCD4+, es la disminución del receptor alfa de la interleucina-7 (IL-7R $\alpha$ ), ya discutido anteriormente, donde a su vez se obtuvo una correlación significativamente positiva ( $p < 0.05$ ) entre la frecuencia de apoptosis *ex vivo* y la expresión de CD127 en porcentajes, de pacientes VIH+ en general. Lo que nos sugiere que a menor expresión de esta molécula en linfocitos TCD4+ de pacientes infectados, se obtiene una mayor frecuencia de apoptosis en dichas células, en condiciones *ex vivo* (**Figura 18**).

Por otra parte, tanto la activación como la proliferación apropiada de células del sistema inmune es una medida de éxito en la respuesta ante un antígeno infeccioso. Los eventos celulares que caracterizan la respuesta linfocitaria ante un estímulo mitogénico y un antígeno específico, incluye la producción de citocinas, proliferación y apoptosis. La determinación de la proliferación linfocitaria en

respuesta a mitógenos y antígenos es un método *in vitro* convencional para evaluar la funcionalidad inmunitaria de los linfocitos T. Asimismo, la disfuncionalidad proliferativa *in vitro* de células T, es una de las propiedades características de la inmunopatología del VIH, en respuesta a la estimulación con antígenos del virus y otros patógenos (Krowka y col, 1989). Los resultados obtenidos en nuestro estudio, se observó una alta proliferación de los linfocitos TCD4 (reflejado por el alto porcentaje de células anti- BrdU+) en presencia de PHA, en relación a la condición de no estimulación, hecho observado en todos los grupos en estudio, demostrando que estas células tuvieron capacidad proliferativa en presencia de este mitógeno. Sin embargo, ambos grupos de pacientes infectados con VIH, incluyendo a los co-infectados presentaron porcentajes más bajos de proliferación de estas células con la estimulación con PHA, indicando la infección por el VIH-1 ejerce efectos defectuosos en el proceso de linfoproliferación. Estudios previos han sugerido que la replicación viral afecta a los clones específicos de células TCD4, que se dividen en la fase de expansión de la respuesta adaptativa, sin afectar a aquellas células que secretan citocinas y presentan propiedades efectoras (Palmer y col., 2002). Asimismo, se obtuvo que los pacientes co-infectados y el grupo control Tx+, presentaron una capacidad proliferativa relativamente significativa ante el antígeno del parásito (Tx) en relación a los restantes grupos, tanto infectados con VIH como con el grupo control Tx+. Sin embargo, se pudo observar que el grupo co-infectado presentó valores más bajos de proliferación en comparación al grupo control Tx+, indicando que la respuesta proliferativa contra *T. gondii* está afectada en la infección VIH. Recientes estudios han determinado en ratón, que 7 días después de la infección con *Toxoplasma gondii*, tanto la célula T, en presencia de mitógeno o antígeno asociado del parásito, las respuestas linfoproliferativas son reducidas,

sugiriendo que el protozoo está ocasionando una inhibición de la respuesta inmune específica, en particular en este parámetro inmunológico. En esos estudios se hace énfasis, en que esta reducción de la respuesta linfoproliferativa va relacionada con la reducción de la interleucina IL-2 y aumento de la citocina IL-10, las cuales parecen mediar, en parte, la regulación de *T. gondii*. Ambas se encargan de activar macrófagos, donde la IL-10 es secretada por linfocitos y los reactivos intermediarios, como el óxido nítrico (NO), inhiben la proliferación de células T en la toxoplasmosis murina (Haque y col., 1995).

Cuando colocamos las células T en presencia de ENV, se encontró que los pacientes del grupo de co-infectados presentaron mayores porcentajes de linfoproliferación en relación a los pacientes infectados solamente por VIH, lo que refleja que existe aún en estos pacientes, a pesar de tener una fase avanzada de la infección viral una capacidad proliferativa específica ante el virus, mientras que los pacientes VIH perdieron los clones específicos a este antígeno viral. Se conoce que el VIH inhibe la proliferación de las células que infecta por medio de la proteína viral Vpr, la cual afecta a la célula en la fase G2 del ciclo celular, y esto pudiera explicar la pérdida casi total de la linfoproliferación de linocitos T CD4 específicos al virus. Sin embargo, nuestros resultados de proliferación de los pacientes co-infectados, cuyos valores, son más altos que los de los pacientes VIH, son difíciles de explicar. Pareciera que estos pacientes co-infectados presenten aún en estas fases tardías de la infección viral, clones de linfocitos T CD4 específicos al virus.

## 7.- CONCLUSIONES

Una de las infecciones oportunistas más frecuente y letal que se presenta en los pacientes infectados con VIH es la toxoplasmosis, conduciendo a una encefalitis que generalmente es mortal. Una de las interrogantes aún no respondida en este cuadro inmunopatológico es qué papel juega el linfocito T CD4, principal célula blanco del VIH, que cuando llega a cantidades críticas en la sangre ( $< 200$  células T CD4/ $\mu$ l), se observa una reactivación de la infección por parte del parásito en el SNC. Es por ello de nuestro interés el de haber estudiado este linfocito T en un cuadro de co-infección VIH/Tx. Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que la co-infección VIH/Toxoplasma provoca mayores alteraciones cuantitativas y funcionales de las células TCD4+ en los pacientes co-infectados en relación a los pacientes infectados por VIH solamente.

Cuando estudiamos la expresión de diversas moléculas (CD95, CD127, CD279, HLA-DR) relacionadas con la muerte/supervivencia y funcionalidad de los linfocitos TCD4, los resultados indican que los pacientes VIH+, a medida que avanza la infección viral, presentan una mayor alteración de la misma. Pero cuando estudiamos estos parámetros inmunológicos en los pacientes co-infectados (VIH/Tx+), particularmente los más inmunodeficientes ( $<200$  CD4/ $\mu$ l), observamos que presentan una mayor alteración de la expresión de estas moléculas con respecto al grupo VIH más inmunodeficiente. Esto puede explicar el hecho que en el primer grupo de pacientes (VIH/Tx) presentan valores más bajos de células TCD4+ en sangre en relación a los pacientes VIH+ más inmunodeficientes ( $<200$  CD4/ $\mu$ l). Además, todos estos resultados sugieren que la

co-infección puede estar afectando en un mayor grado a estas células linfocitarias, lo cual ocasiona una menor protección inmunitaria del hospedador contra el parásito y conllevando a la reactivación de la infección parasitaria (a pesar que en nuestros pacientes no presentaron evidencias clínicas contundentes de la presencia de una encefalitis cerebral). Es importante destacar que la carga viral del grupo de pacientes co-infectados más inmunodeficientes presentó una tendencia a ser mayor en relación a los pacientes infectados solamente por el virus, sugiriendo otro factor importante para encontrar las mayores diferencias ya descritas.

La frecuencia de apoptosis, mecanismo celular inducido directa o indirectamente por el virus, aumenta sus valores en linfocitos T CD4 en todos los grupos de pacientes infectados, factor importante que puede estar ocasionando posiblemente una disminución de estas células en sangre. Sin embargo, los pacientes co-infectados presentan valores similares de apoptosis sobre estas células en comparación al de los pacientes VIH, a pesar que presentan las mayores diferencias de expresión de moléculas inductoras de apoptosis, tales como CD95 y/o CD279. Una posible explicación de esto es que se ha demostrado que *T. gondii* presenta efectos generales antiapoptóticos como un mecanismo que ayuda a la expansión del parásito, lo cual se reflejaría en una menor frecuencia de este fenómeno, tal como lo encontramos en este estudio.

Finalmente, la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD4 en todos los pacientes infectados o co-infectados se caracterizó por una disminución pronunciada, cuando las células fueron estimuladas por PHA, indicando que la presencia del VIH ejerce un efecto drástico sobre esta respuesta de multiplicación celular importante durante la activación linfocitaria. Sin embargo, en presencia de antígenos de *T. gondii*, los valores de proliferación en estas células tienden a

presentar valores mas bajos que los controles (Tx+), indicando que esta capacidad se encuentra afectada en estos pacientes por la presencia de la infección viral. Cuando se estudió la proliferación en presencia de antígenos virales (ENV) se constatar que esta respuesta se perdió por completo en los pacientes VIH, mientras que en los pacientes co-infectados fue parcial tal pérdida, sugiriendo que los clones de linfocitos T CD4 anti-VIH pueden perderse de forma independiente de la presencia o no de una co-infección, tal como la toxoplasmosis. Sin embargo, la infección viral sí afecta a la respuesta anti-*T. gondii*, hecho importante para comprender la inmunopatología de la toxoplasmosis en un cuadro infeccioso como el del VIH.

## 8.- BIBLIOGRAFIA

AIDS epidemic update: July 2008. UNAIDS/08.27E (English original, July 2008). Latin America: AIDS epidemic update: regional summary. ONUSIDA/08.12S/JC1530E (versión española, abril de 2008).

AIDS epidemic update: December 2007. ONUSIDA (versión española, diciembre de 2007).

Ahr, B., Robert, v., Devaux, C. y Biard, M. 2004. Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology*. **1**:1-12.

Alcaro, M., Peroni, E., Rovero, P. y Papini, A. 2003. Synthetic Peptides in the Diagnosis of HIV Infection. *Current protein and peptide science*. **4(4)**:285-290.

Alfonzo, M., Suárez, J., Díaz, A., Comegna, M., Valenzuela, M., Sánchez, M., Hernández, D. y Hung, A. 2008. Expresión alterada de receptores de supervivencia (CD127) y de muerte (Fas) en linfocitos T CD8 totales, vírgenes y de memoria de pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana: posibles implicaciones para la progresión de la infección. *Investigación clínica*. **49(2)**:135-284.

Aliberti, J. 2005. Host persistence: Exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nature*. 162:165.

Alimonti, J., Ball, T. y Fowke, K. 2003. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *Journal of General Virology*. **5**:1649-1647.

Bäumler, C., Böhrer, T., Herr, I., Benner, A., Krammer, P. y Debatin, K. 1996. Action of the CD95 (APO-1/Fas) System in T Cells From Human Immunodeficiency Virus Type-1- Infected Children. *Blood*. **88(5)**:1741-1746.

Benedict C, Norris, P. y Ware, C. 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nature Immunology*. **3**:1013-1018.

Benito, J., López, M. y Soriano, V. 2004. The role of CD8+ T- cell Response in HIV Infection. *AIDS*. **6**: 79-88.

Bentwich Z, Maartens G, Torten D. 1998. Concurrent infections and HIV pathogenesis. *AIDS*. **200(14)**:2071-81.

Bhopale, G.M. 2003. Pathogenesis of toxoplasmosis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis*. **26**:213-222.

- Blanco, J., Barrentina, J., Cabrera, C., Gutiérrez, A., Clotet, B., and Esté, J.A. 2001. CD4+ and CD8+ T Cell Death during Human Immunodeficiency Virus Infection *in vitro*. *Virology*. **285(2)**:356-365.
- Bosch, B., Clotet, I., Blanco, J., Paulsa, E., Coma, G., Cedeño, S., Mitjans, F. y colaboradores. 2006. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection in macrophages by an alpha-v integrin blocking antibody. *Science Direct. Antiviral Research*. **69**:173-180.
- Buzoni, D. y Werts, C. 2006. *Toxoplasma gondii* and subversion of the immune system. *Parasitology*. **22(10)**:448-450.
- Cabrera, C. 2001. Inhibición de las etapas tempranas del ciclo replicativo del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1): Mecanismo de acción y posible estrategia terapéutica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Bellaterra, España.
- Castellino, F. y Germain, R. 2006. Cooperation Between CD4+ and CD8+ T Cells: When, Where, and How. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:519-540.
- Chacín, L., Sánchez, Y., Estévez, E., Larreal, Y. y Molero, E. 2003. Prevalence of human toxoplasmosis in San Carlos Island, Venezuela. *Interciencia*. **28(8)**:457-461.
- Colombo, F., Vidal, J., Penalva, A., Hernandez, A., Bonasser, F., Nogueira, R., Focaccia, R. y Pereira, V. 2005. Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Smears. *Journal of clinical microbiology*. **43(10)**:5044-5047.
- Däubener W. y Hadding U. 1996. Cellular immune reaction directed against *Toxoplasma gondii* with special emphasis on the nervous system. 195-203.
- Denkers, E. y Gazzinelli, R. 1998. Regulation and Function of T-Cell-Mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, **11(4)**:569-588.
- Derdeyn C. y Hunter, E. 2008. Viral characteristics of transmitted HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*. **3 (1)**:16-21.
- D'Souza, M., Fontenot, A., Mack, D., Lozupone, 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. *The Journal of Immunology*. 1979-1986.
- Dubey, J., Lindsay D. y Speer, A. 1998. Structures of *Toxoplasma gondii* Tachyzoites, Bradyzoites, and Sporozoites and Biology and Development of Tissue Cysts. *Clinical microbiology reviews*. **11(2)**:267-299.

Dyrhol, A., Stent, G., Rosok, B., Voltersvik, P., Olofsson, J. y Asjö, B. 2001. The Fas/FasL System and T Cell Apoptosis in HIV-1-Infected Lymphoid Tissue during Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clinical Immunology*. **101(2)**:169-179.

Dzierszinski, F., Nishi, M., Ouko, L., y Roos, D.S. 2004. Dynamics of *Toxoplasma gondii* Differentiation. *Eukaryotic Cell*. **3(4)**:992-1003.

Eckert, D., Malashkovich, V., Hong, L. y Carr, P. 1999. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket. *Cell*. **99**:103-115.

Fauci, A. 1996. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature*. 384 (6609):529-534.

Frankel, A. y Young J. 1998. HIV-1: Fifteen proteins and RNA. *Annu Rev Biochem*. **67**:1-25.

Fortín, J., Cantin, R. y Tremblay, M. 1998. T cells expressing activated LFA-1 are more susceptible to infection with human immunodeficiency virus type 1 bearing host encoded ICAM-1. *J. Virol*. **72**:2105-2112.

Freeman, G., Wherry, E., Ahmed, R., y Sharpe, A. 2007. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1–PD-1 ligand blockade. *JEM*. 2223-2226.

Gazzinelli, R., Hakim, F., Hieny, S., Shearer, G. y Sher, A. 1991. Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *J. Immunol*. **146(1)**:286–92.

Giliani, S., Mori, L., de Saint Basile, G., Le Deist, F., Rodriguez, C., Forino, C., Mazzolari, E., Dupuis, S. y colaboradores. 2005. Interleukin-7 receptor  $\alpha$  (IL-7R $\alpha$ ) deficiency: cellular and molecular bases. Analysis of clinical, immunological, and molecular features in 16 novel patients. *Immunological Reviews*. **203**: 110-126.

Goldrath, A., Sivakumar, P., Glaccum, M., Kennedy, M., Bevan, M., Benoist, C., Mathis, D., y Butz, E. 2002. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naïve and memory CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med*. 195: 1515.

Gongora, R., González, P., Castro, C., Pavia, N., Lara, D., Alonzo, G. y Palacios, E. 1998. Anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* en pacientes con VIH en Yucatán. *Rev Invest Clin*. **50(5)**: 419-422.

Gougeon M. 2003. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nature reviews, Immunology*. **3**:392-404.

Gracia, S., Leal, M., Correa, R., Genebat, M., Campos, V. y Muñoz, M. 2005. Immune reconstitution in HIV-infected children on antiretroviral therapy. *Inmunología*. **24**:44-54.

- Grant, I., Gold, J., Rosenblum, M., Niedzwiecki, D. y Armstrong, D. (1990). *Toxoplasma gondii* serology in HIV-infected patients: the development of central nervous system toxoplasmosis. *AIDS*. **4(6)**: 519-521.
- Graziosi, C.H, Soudeyns, G.P., Rizzardi, P., Bart, P.A., Chapuis, A. y Pantaleo, G. 1998. Immunopathogenesis of HIV Infection. *Aids research and human retroviruses*.**14(2)**:135-142.
- Green D. R. 2000. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell*. **102**:1-4.
- Hanque, S., Hanque, A. y Kasper, L. 1995. A *Toxoplasma gondii*- Derived Factor (s) Stimulates Immune Downregulation: an *In Vitro* Model. *Infection and Immunity*. **63(9)**:3442-3447.
- Hunter, C.A., y Remington J.S. 1994. Immunopathogenesis of toxoplasmic encephalitis. *PubMed*. **170(5)**:1057-67.
- Israelski, D. y Remington, J. 1998. Toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Infect. Dis. Clin. North Am*. **2(2)**: 429-45.
- Jenkins M., Khoruts A., Ingulli A., Mueller D., McSorley S., Reinhardt L., Itano A. y Pape K. 2001. In Vivo Activation Of Antigen-specific CD4 T Cells. *Annu. Rev. Immunol*. **19**:23-45.
- Jeremías, I., Herr, I., Boehler, T. y Debatin, K. 1998. TRAIL/Apo-2-ligand-induced apoptosis in human T cells. *Eur J Immunol*. **28 (1)**: 143-152.
- Jonckheere, H., Witvrouw, M., De Clercq, E. y Anné, J. 1998. Lamuvidine resistance of HIV type 1 does not delay development of resistance to non-nucleoside HIV type 1-specific reverse transcriptase inhibitors as compared with wild-type HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retrovir*. **14**:249-253.
- Jones, J., Kruszon, D. y Wilson, M. 2003. *Toxoplasma gondii* Infection in the United States, 1999–2000. *CDC*. **9**:1371-1374.
- Kamoun M., Zerva L., Sloan S., Zmijewski C., Monos D., Trinchieri G. 1992. Induction of HLA class II molecules on human T cells: relationship to immunoregulation and the pathogenesis of AIDS. *DNA Cell Biol*. **11(3)**:265-268.
- Kaplan, D. and Sieg, S. 1998. Role of the Fas/Fas Ligand Apoptotic Pathway in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease. *Journal of General Virology*. **72 (8)**: 6279-6281.
- Kerr, J. y Harmon, B. 1991. Definition and incidence of apoptosis: An historical perspective. In: *The molecular basis of cell death*. Cold Spring harbor Laboratory Press. 5-29.

- Khaled A. R. and Durum S. K. 2002. Lymphocyte: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nature Reviews Immunology*. **2**: 817-830.
- Kitchen, S., Whitmire, J., Jones, N., Galic, Z., Kitchen, C., Ahmed, R. y Zack, J. 2005. The CD4 molecule on CD8+ T lymphocytes directly enhances the immune response to viral and cellular antigens. *PNAS*. **102(10)**:3794-3799.
- Krowka, J., Steimer K. y colaboradores. 1989. Lymphocyte proliferative responses to human immunodeficiency virus antigens in vitro. *J. Clin. Invest.* **83**:1198-1203.
- Langermans, J., Van der Hulst, M., Nibbering, P., Hiemstra, P., Franssen, L. y Van Furth, R. 1992. IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor alpha. *J Immunol.* **148(2)**: 568-74.
- Lee, G.R., Fields, P.E y Flavell, R.A. 2001. Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity*. **14**:447-459.
- Leonardo, M.J., Boehme, S., Chen, L., Combadiere, B., Fisher, G., Freedman, M., Mckarland, H., Pelfrey, C. y Zheng, L. 1995. Autocrine feedback death and the regulation of mature T lymphocyte antigen responses. *Int. Rev, Immunol.* 13:115.
- Levy, R., Bredesen, D. y Roseblum, M. 1985. Neurological manifestations of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): experience at UCSF and review of the literature. *J Neurosurg.* **62(4)**:475-95.
- Li, C., Friedman, D., Wang, C., Metelev, V., y Pardee, A. 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science*. 268:429.
- Liu Z., Cumberland W., Hultin L., Prince H., Detels R., Giogi J. 1997. Elevated CD38 expression con CD8+ T cell is stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ T cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **16**: 83-92.
- Lüder, C. y Gross, U. 2005. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: Molecular Mechanisms and role in pathogenesis. *CTMI*. 289:219-238.
- Luther S. A., Gulbranson-Judge A., Acha-Orbea H. y MacLennan ICM. 1997. Viral superantigen drives extrafollicular and follicular B cell differentiation leading to virus-specific antibody production. *J. Exp. Med.* **185**: 551-562.
- Madigan, M., Maartinko, J. y Parker, J. 2003. Biología de los Microorganismos. Editorial Pearson Prentice Hall, Décima edición. Madrid, España.
- Mahlknecht, U., Deng, C., Lu, M., Greenough, T., Sullivan, J., O'Brien, W. y Herbein, G. 2000. Resistance to Apoptosis in HIV-Infected CD41 T Lymphocytes Is Mediated by Macrophages: Role for Nef and Immune Activation in Viral Persistence. *The Journal of Immunology*. 6437-6446.

Maino, V., Suni, M., y Ruitenber, J. 1995. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry*. **20**:127.

Maubon, D., Ajzenberg, D., Brenier-Pinchart, M.P., Darde, M.L., y Pelloux, H. 2008. What are the respective host and parasite contributions to toxoplasmosis?. *Trends in Parasitology*. **24(7)**:299-303.

Mc Cune, J.M. 2001. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*. **410**:974-978.

Mueller A. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12 dependent selection. *Science*. **292**:1907-1910.

Nash, P.B., Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C. y Curiel, T.J. 1998. *Toxoplasma gondii*-Infected Cells are Resistant to Multiple Inducers of Apoptosis. *The Journal of Immunology*. 1824:1830.

Neves, M., Anibal, F., Campos, F., Trindade G. y Reis, M. 2008. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauareté, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*. **50(1)**:17-20.

Okazaki, T. y Honjo, T. 2006. The PD-1-PD-I pathway in immunological tolerance. *Science*. **27(4)**:196-199.

ONUSIDA. Enfermedades oportunistas relacionadas con el VIH. Actualización técnica del ONUSIDA (versión española, marzo de 1999).

Palmer, B., Boritz, N. y Wilson, C. 2002. Discordance between frequency of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-producing CD4 (+) T cells and HIV-specific lymphoproliferation in HIV-1-infected subjects with active viral replication. *J Virol*. **76**:5925.

Pantaleo, G. y Fauci, A.S. 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu. Rev. Immunol.* **13**:487-512.

Pantaleo G. y A.S Fauci. 1996. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol.* **50**:825.

Petrovas, C., Mueller, Y., y Katsikis, P. 2005. Apoptosis of HIV-specific CD8+ T cells: an HIV evasion strategy. *Cell Death and Differentiation*. **12**:859-870.

Petrovas, C., Casazza, J.M., 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.* 203:2281.

Rethi, B., Fluor, C., Atlas, A., Krzyzowska, M., Mowafi, F., Grützmeier, S., De Milito, A., Belloc, R. y colaboradores. 2005. Loss of IL-7R $\alpha$  is associated with CD4 T-cell

depletion, high interleukin-7 levels and CD28 down-regulation in HIV infected patients. *AIDS*. **19**:2077-2086.

Rosenberg, E.S., Billingsley, J., 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.

Rosenberg, E., Billingsley, J., Caliendo, A., Boswell, S. et al. 1997. Vigorous HIV-1-Specific CD4+ T Cell Responses Associated with Control of Viremia. *Science*. **278**:1447-1450.

Rugeles M. y Patiño, P. 2004. Inmunología. Una ciencia activa. Tomo 2. Medellín: *Biogénesis*. **369-388**.

Salmen, S., Berrueta, L. y Montes, H. 2007. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Vol.1. N°1.

Schlüter, D., Deckert, M., Hof, H. and Frei, K. 2001. *Toxoplasma gondii* Infection of Neurons Induces Neuronal Cytokine and Chemokine Production, but Gamma Interferon- and Tumor Necrosis Factor-Stimulated Neurons Fail To Inhibit the Invasion and Growth of *T. gondii*. *Infection and Immunity*. **69(12)**:7889-7882.

Schluns, K. y Lefrançois, L. 2003. Cytokine control of memory T cell development and survival. *Nature Reviews Immunology*. **3**: 269-279.

Seder, R. y Ahmed. 2003. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. **4**:835.

Shankar, P., Russo, M., Brooke, H., Patterson, M., Skolnik, P. y Lieberman, J. 2000. Impaired function of circulating HIV-specific CD8+ T cells in chronic human immunodeficiency virus infection. *Blood*. 96 (9): 3094-3101.

Sierra, M., Juncosa, T., Matas, C. y otros. 2007. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii*. *Seimc*. 1-10.

Sin J., Kim J., Patchuk C. y Weiner D. 2000. Interleukin 7 Can Enhance Antigen-Specific Cytotoxic-T-Lymphocyte and/or Th2-Type Immune Responses In Vivo. *Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology*. **7**:751-758.

Sprent, J., y D. F. Tough. 1994. Lymphocyte life-span and memory. *Science*. **265**:1395.

Sprent J. y Tough D. 2001. T Cell Death and Memory. *Science*. **293**:245-249.

Sprent J. y Surh C. 2002. T Cell Memory. *Annu. Rev. Immunol*. **20**: 551-79.

Stein, D.S., Korvick, J.A., and Vermund, S.H. 1992. CD4+ lymphocyte cell enumeration for prediction of clinical course of human immunodeficiency virus disease: a review. *J. Infect. Dis.* 165:352.

Stevenson, M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*. **9(7)**: 853-860.

UNGASS AIDS 2008. Informacion de la Sociedad Civil: Foro UNGASS SIDA Venezuela. Págs 7-83.

Whitmire, J. y Ahmed, R. The economy of T- cell memory: CD4+ recession in times of CD8+ stability?. *Nature*. **7(8)**: 892-893.

[www.blogsida.com](http://www.blogsida.com). Consulta: Marzo, 2008.