

ARTÍCULO ORIGINAL

## Efecto de las infecciones oportunistas sobre las subpoblaciones de leucocitos en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1

Zoraida Ramírez<sup>1</sup>, Juan Carlos Cataño<sup>2</sup>, Alejandro Román<sup>1</sup>, María Teresa Rugeles<sup>1</sup>, Carlos Julio Montoya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Sección de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** La presencia de infecciones por patógenos oportunistas en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida representa un coestímulo para acelerar la progresión de la infección por el VIH-1. A pesar del papel preponderante que varias subpoblaciones de leucocitos tienen en la respuesta antiinfecciosa, poco se ha estudiado el comportamiento de esas células en pacientes positivos para VIH-1 que presentan infecciones oportunistas.

**Objetivo.** Evaluar cuantitativamente las subpoblaciones celulares más importantes de la inmunidad innata y adaptativa en sangre periférica de adultos infectados con el VIH-1 (con antecedentes de infecciones oportunistas y sin ellos).

**Materiales y métodos.** El número absoluto de las diferentes subpoblaciones de leucocitos fue determinado por citometría de flujo; para cada subpoblación, este número se correlacionó con la carga viral, el recuento de linfocitos T CD4+ y la expresión de marcadores de activación inmunológica en células T CD4+ y CD8+.

**Resultados.** Los pacientes crónicamente infectados por el VIH-1 presentan deficiencia cuantitativa de varias subpoblaciones de leucocitos, que es más significativa en aquellos pacientes con una infección oportunista activa al momento de la evaluación, lo cual indica que la coinfección VIH-1/agentes oportunistas puede potenciar la inmunodeficiencia al asociarse con una reducción significativa de las diferentes subpoblaciones de leucocitos.

**Conclusiones.** Estos hallazgos sugieren la necesidad de hacer un diagnóstico temprano de la infección por el VIH-1 y un uso racional de la terapia antirretroviral de manera que se impida que los pacientes lleguen a desarrollar infecciones oportunistas, así como la necesidad de establecer estrategias de inmunoterapia para pacientes positivos para VIH-1 con el fin de reestablecer más integralmente la competencia inmune.

**Palabras clave:** infecciones oportunistas relacionadas con sida/inmunología, leucocitos, VIH-1, activación de linfocitos, células dendríticas, células asesinas naturales.

### Effect of opportunistic infections on the frequency of leukocyte subpopulations from type-1 human immunodeficiency virus infected individuals

**Introduction.** The presence of opportunistic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome favors the progression of HIV-1 infection. Despite the key role that several leukocyte subpopulations exhibit during the anti-infectious response, few studies have focused on the role of these cells in HIV-1-infected patients with active opportunistic infections.

**Objective.** The quantity of several innate and adaptive cell subpopulations was evaluated in whole peripheral blood of HIV-1-infected patients, with and without a history of opportunistic infections.

**Materials and methods.** The absolute number of each leukocyte subpopulation was evaluated by flow cytometry, and for each cell subpopulation, this number was correlated with viral load, CD4+ T cell count and the expression of activation markers on CD4+ and CD8+ T lymphocytes.

**Results.** Chronically HIV-1 infected patients exhibited a quantitative deficiency in several leukocyte subpopulations; this effect was more pronounced in individuals suffering an active

opportunistic infection. This indicated that the coinfection by HIV-1 and opportunistic microorganisms potentiated the immunodeficiency by reducing significantly the frequency of different subpopulations of leukocytes.

**Conclusions.** This finding underlines the importance of an early diagnose of HIV-1 infection, and the need for the rational use of antiretroviral medications to avoid the development of opportunistic infections. In addition, it points to the necessity of developing immunotherapy strategies for HIV-1-infected patients in order to re-establish the immune competence.

**Key words:** AIDS-related opportunistic infections/immunology, leukocytes, HIV-1, lymphocyte activation, dendritic cells, natural killer cells, natural.

En la actualidad, cerca de 40 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), lo que hace que esta infección sea considerada como una de las peores pandemias que ha enfrentado la humanidad en todos los tiempos (1). En los últimos años, la incidencia de la infección por el VIH-1 ha alcanzado proporciones alarmantes (alrededor de 5 millones de casos nuevos por año), como consecuencia del aumento en la exposición a factores de riesgo tales como el uso de drogas intravenosas y las relaciones sexuales sin protección, y el poco acceso a los servicios de salud y a la terapia antirretroviral de las poblaciones económicamente más deprimidas, en las cuales los infectados por el VIH-1 desarrollan sida más rápidamente (1).

El curso clínico típico de la infección por el VIH-1 se caracteriza por tres etapas bien definidas (2); la fase inicial, conocida como síndrome retroviral agudo, tiene manifestaciones variables de un individuo a otro, dura entre tres y seis semanas, y en ella el recuento en sangre periférica de los linfocitos T CD4+ disminuye de manera abrupta pero luego se reestablece parcialmente, coincidiendo con la aparición de la respuesta inmune antiviral. En la siguiente etapa, llamada latencia clínica, la infección por el VIH-1 es, generalmente, asintomática pero la replicación

viral permanece activa; la duración de la latencia clínica es variable (más corta en los niños, mientras que en los adultos se presentan varios patrones de progresión al sida), lo que depende tanto de factores del virus como de factores genéticos e inmunológicos del individuo (3,4). En la última fase de la enfermedad, los sujetos infectados que no reciben terapia antirretroviral o aquéllos que desarrollan resistencia a estos medicamentos evolucionan a un estado de inmunodeficiencia seria por disminución tanto en el número como en la función de varias subpoblaciones de células del sistema inmune, con gran susceptibilidad al desarrollo de infecciones por microorganismos oportunistas y a la aparición de neoplasias malignas; finalmente, el paciente con sida fallece a causa de estas complicaciones, y no directamente por un efecto letal del virus sobre el organismo (5).

Pese a que 25 años de investigación intensiva han permitido generar un amplio conocimiento sobre los aspectos básicos y clínicos de la infección por el VIH-1, muchos aspectos de la patogénesis de esta infección no son del todo claros. Diferentes estudios sugieren que las infecciones por patógenos oportunistas, además de reducir la supervivencia de los pacientes con sida, al incidir directamente en la mortalidad, también representan un coestímulo para acelerar la pérdida de la función inmune y la progresión de la infección (6,7). De hecho, la presencia de infecciones oportunistas se ha asociado con activación de las células del sistema inmune, algunas de ellas infectadas con el VIH-1, promoviendo la replicación viral (8,9). Esto se traduce en un incremento de la carga viral en la circulación sistémica y en los diferentes tejidos (8), además de favorecer la diseminación de la

Correspondencia:

Carlos Julio Montoya, Sede de Investigación, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, torre 2, laboratorio 532, Medellín, Colombia.  
Teléfono: (574) 210 6484; fax: 210 6481  
cjmonto@une.net.co

Recibido: 28/05/07; aceptado: 04/10/07

infección, la apoptosis de varias subpoblaciones de células y la aparición de mutaciones en el genoma viral (7,10). Todo esto posibilita la evasión de la respuesta inmune y se puede asociar con cambios en el tropismo, en la patogenicidad, con la aparición de cepas resistentes a la terapia antirretroviral (2,11,12).

Un ejemplo útil para analizar el papel que cumplen otras infecciones durante la evolución de la infección por el VIH-1 es la tuberculosis. Se ha demostrado que los pacientes con la coinfección VIH-1/*Mycobacterium tuberculosis* tienen un aumento en el riesgo de muerte, que es independiente del recuento de linfocitos T CD4+ (13). También se ha observado que aunque los individuos coinfectados reciban un tratamiento antituberculoso exitoso, la supervivencia de ellos está seriamente comprometida pues el reto que *M. tuberculosis* impone al sistema inmune favorece ampliamente la replicación del VIH-1, disminuyendo aceleradamente la función inmune, lo cual se ha asociado con un aumento en la incidencia de otras infecciones oportunistas y con un incremento en la mortalidad (14).

Clásicamente se ha definido que las infecciones oportunistas aparecen luego que el recuento de linfocitos T CD4+ alcanza niveles muy bajos, siendo el valor de 200 células/ $\mu$ l una referencia universalmente aceptada que se asocia con un mayor riesgo de presentar una de estas infecciones (15,16). Sin embargo, en algunas situaciones la presencia de infecciones oportunistas no se asocia con el recuento de linfocitos T CD4+, lo cual sugiere que otras poblaciones celulares participan en el control de estas infecciones (17-19). Pese a esto, no se ha evaluado adecuadamente el comportamiento de esas subpoblaciones celulares en los pacientes positivos para VIH-1 que presentan infecciones oportunistas, por lo cual la presencia de estas enfermedades se ha atribuido exclusivamente a un estado de inmunodeficiencia dependiente de la pérdida de los linfocitos T CD4+ (5,15).

Partiendo de estos antecedentes, esta investigación evaluó cuantitativamente las subpoblaciones celulares más importantes de la inmunidad innata y adaptativa: células asesinas

naturales (NK), linfocitos T con TCR invariante y restringidos por la molécula CD1d (iNKT), monocitos, células dendríticas mieloides (DC-M) y plasmacitoides (DC-P), células T CD4+, CD8+ o CD56+, y linfocitos B en pacientes adultos infectados con el VIH-1 con antecedentes de infecciones oportunistas y sin ellas, así como en un grupo de adultos sanos. Además, se correlacionó el número absoluto de cada una de las subpoblaciones con la carga viral en plasma, con el recuento de linfocitos T CD4+ y con la expresión de marcadores de activación inmunológica en las células T CD4+ y CD8+. Los resultados muestran que la coinfección VIH-1/infecciones oportunistas tiene un impacto importante al reducir significativamente la cantidad de las diferentes subpoblaciones evaluadas de leucocitos.

## Materiales y métodos

### Población de estudio

En esta investigación se evaluaron 32 adultos infectados con el VIH-1 (cuadro 1), con edades comprendidas entre los 20 y los 60 años, atendidos en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín. Los pacientes fueron divididos en tres grupos según el objetivo del estudio: i) pacientes positivos para VIH-1 hospitalizados por padecer una infección oportunista activa demostrada por estudios de laboratorio (n=10); ii) pacientes positivos para VIH-1 con antecedentes de haber padecido una infección oportunista activa en los seis meses previos al inicio del estudio (n=12), la cual fue tratada adecuadamente, y iii) pacientes infectados crónicamente con el VIH-1 que estaban asintomáticos y no tenían antecedentes de haber padecido una infección oportunista activa (n=10). Las infecciones oportunistas se definieron de acuerdo con la lista de enfermedades de la categoría clínica C de pacientes positivos para VIH-1, según lo establecido por los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Atlanta, Estados Unidos) (20).

Como controles, se evaluaron 20 individuos adultos sanos sin factores de riesgo para la infección por VIH-1, cuyo estado seronegativo fue confirmado por una prueba presuntiva de ELISA.

**Cuadro 1.** Características de los pacientes positivos para VIH-1 y de los controles.

	Sexo	Edad (años)	Recuento LT CD4+ (células/ $\mu$ l)	Carga viral (copias/ml)	Terapia antirretroviral	Infecciones oportunistas
Positivos para VIH-1 totales (n=32)	F: 28% M: 72%	34,6 $\pm$ 1,9	255 $\pm$ 42	206.050 $\pm$ 56.194	Sí: 50% No: 50%	-----
Positivos para VIH-1 IO activa (n= 10)	F: 30% M: 70%	32,3 $\pm$ 3,9	94 $\pm$ 34	293.820 $\pm$ 100.527	Sí: 0 No: 100%	Criptococosis, tuberculosis, candidiasis, toxoplasmosis, histoplasmosis, infección por MAC
Positivos para VIH-1 IO tratada (n= 12)	F: 25% M: 75%	35,8 $\pm$ 2,7	424 $\pm$ 80	65.557 $\pm$ 35.520	Sí: 75% No: 25%	Criptosporidiosis, herpes zoster, neumonía por <i>P. jirovecii</i> , criptococosis, tuberculosis, candidiasis, linfoma por EBV, infección por CMV, infección por PVH
Positivos para VIH-1 Sin IO (n= 10)	F: 30% M: 70%	35,6 $\pm$ 3,5	214 $\pm$ 43	286.872 $\pm$ 136.513	Sí: 70% No: 30%	NA
Controles (n=20)	F: 40% M: 60%	28,3 $\pm$ 1,9	822 $\pm$ 68	NA	NA	NA

Los datos del número de individuos según el sexo y la terapia antirretroviral se presenta como porcentaje; los datos de la edad, el recuento de células T CD4+ y la carga viral se presentan como media aritmética y el error estándar.

VIH-1: virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1; IO: infecciones oportunistas; F: femenino; M: masculino; MAC: complejo *Mycobacterium avium*; EBV: virus de Epstein Bar; CMV: citomegalovirus; PVH: papilomavirus humano; NA: no aplica

A todos los individuos estudiados se les informó sobre los alcances y riesgos de esta investigación, y firmaron una copia del formato de consentimiento informado. La investigación recibió la aprobación del Comité de Ética de la Corporación Biogénesis de la Universidad de Antioquia.

#### **Anticuerpos y reactivos**

Para la detección fenotípica de las diferentes subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica se utilizaron anticuerpos monoclonales tipo IgG1 e IgG2a de ratón, marcados con diferentes fluorocromos (FITC, PE, PerCP), y específicos para las siguientes moléculas de superficie de los leucocitos humanos: CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD16, CD19, CD38, CD56, CD123, HLA-DR, y contra la cadena alfa invariante de las células iNKT humanas (clon 6B11). El reactivo

denominado Lin consta de una combinación de anticuerpos monoclonales IgG1 de ratón, específicos contra moléculas de superficie que definen linajes específicos de leucocitos humanos (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 y CD56). Además, se usaron controles de isotipo IgG1 e IgG2a de ratón. Todos estos anticuerpos son producidos por la compañía *Becton Dickinson Biosciences - Pharmingen* (San Diego, CA, Estados Unidos).

#### **Análisis fenotípico de las subpoblaciones de leucocitos**

El fenotipo y la cantidad de las diferentes subpoblaciones de leucocitos se determinaron por citometría de flujo por medio de la combinación de anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos. Las subpoblaciones de

leucocitos se definieron de la siguiente manera: las células T ayudadoras, como células de la región de los linfocitos (definida según el tamaño y la granularidad interna) que expresaban las moléculas CD3 y CD4 (CD3+/CD4+); las células T citotóxicas, como linfocitos CD3+/CD8+; las células T con marcadores NK, como linfocitos CD3+/CD56+; las células B, como linfocitos CD3-/CD19+; las células NK, como linfocitos negativos para CD3 pero positivos para CD16, para CD56 o para ambos (CD3-/CD16+/CD56+); las células iNKT, como linfocitos CD3+/6B11+. Los monocitos se determinaron en una región que incluía todas las células mononucleares, seleccionando aquellas negativas para CD3 y positivas para CD14 (CD14+/CD3-); las DC-M se definieron como células mononucleares negativas para marcadores de linaje pero positivas para CD11c y HLA-DR (Lin-/CD11c+/HLA-DR+), mientras que las DC-P se definieron como Lin-/CD123+/HLA-DR+.

Para la tinción de las células, se depositaron 120  $\mu$ l de sangre venosa total anticoagulada con EDTA en un tubo de 12x75 mm y la mezcla de anticuerpos monoclonales correspondiente a la subpoblación a ser evaluada; esta suspensión celular se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Luego, los glóbulos rojos fueron lisados adicionando a cada tubo 1,5 ml de una solución de lisis 1X (FACS Lysis Solution, Becton Dickinson), y dejando en incubación durante otros 10 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados durante cinco minutos a 300g; el sobrenadante fue descartado y los leucocitos se lavaron dos veces con 1,5 ml de PBS frío, centrifugando el mismo tiempo y a la misma fuerza. Finalmente, las células se fijaron con 250  $\mu$ l de una solución de formaldehído al 2%. En todas las determinaciones se incluyó un tubo con los controles de isotipo y otro tubo con células sin anticuerpos monoclonales para determinar el ruido de fondo.

Para la adquisición de las células por analizar se utilizó un citómetro de flujo FACSORT (Becton Dickinson). Debido a que la cantidad de las DC-M, las DC-P y las células iNKT es habitualmente muy baja en sangre periférica, se analizaron en total 300.000 células de cada tubo. Las células

mueras se descartaron por sus características de tamaño y complejidad citoplasmática. El programa usado para la adquisición y análisis de los datos fue *Cell Quest* (Becton Dickinson).

El recuento de los leucocitos totales por  $\mu$ l de sangre venosa periférica y el diferencial se realizó de forma manual. Brevemente, para la lisis de los glóbulos rojos, se incubaron 10  $\mu$ l de sangre total con 210  $\mu$ l de solución de ácido acético al 0,3%; luego, el recuento de leucocitos se realizó en una cámara de Neubauer. Para establecer el diferencial de los leucocitos, se tiñó con el colorante de Wright un extendido de sangre periférica en una lámina portaobjetos y, posteriormente, se analizó en un microscopio de luz con un aumento de 100X.

### **Análisis estadístico**

La comparación estadística entre dos grupos diferentes de estudio se realizó con una prueba t de Student no paramétrica (Mann-Whitney), con un intervalo de confianza del 95%. La comparación estadística entre tres o más grupos diferentes de estudio se realizó con una prueba de ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis), con un intervalo de confianza del 95%. El grado de asociación entre dos variables de estudio se evaluó utilizando un análisis de correlación no paramétrico de Spearman, con un intervalo de confianza del 95%. Una diferencia estadística fue considerada como significativa cuando presentaba un valor de  $p < 0,05$ . Para estos análisis estadísticos se utilizó el programa *Graphad Prism*, versión 4.0.

### **Resultados**

Subpoblaciones de leucocitos en el total de pacientes positivos para VIH-1

Inicialmente, se analizó la cantidad de los distintos subgrupos de leucocitos de sangre periférica en el total de pacientes positivos para VIH-1 y en los controles sanos. Con respecto a las subpoblaciones de células pertenecientes a la inmunidad adaptativa, en la figura 1A se observa que el número de linfocitos T totales fue similar en los pacientes positivos para VIH-1 y en los controles sanos ( $p=0,6315$ ). Sin embargo, en los pacientes positivos para VIH-1 el número absoluto de los linfocitos T CD4+ era significativamente menor

( $p < 0,001$ ), mientras que el de los linfocitos T CD8+ estaba significativamente incrementado ( $p < 0,01$ ). No se observaron diferencias significativas en el número circulante de células T CD56+ cuando se compararon los pacientes y los controles ( $p = 0,2180$ ). Además, el número absoluto de linfocitos B fue significativamente menor en los pacientes positivos para VIH-1 ( $p < 0,05$ ; figura 1A).

El análisis cuantitativo de las diferentes subpoblaciones celulares pertenecientes a la inmunidad innata mostró que cuando se comparaban los pacientes positivos para VIH-1 y los controles sanos, el grupo de individuos infectados tenía un número significativamente menor de células NK ( $p < 0,05$ ), iNKT ( $p < 0,01$ ), DC-M ( $p < 0,001$ ) y DC-P ( $p < 0,001$ ). No hubo diferencias significativas en el número de monocitos entre los dos grupos ( $p = 0,8260$ , figura 1B).

#### Activación inmunológica en los pacientes positivos para VIH-1

Para determinar el estado de activación inmune en células de la inmunidad específica, se determinó en las células T CD4+ y CD8+ la expresión de las moléculas de activación CD38 y HLA-DR. Como se observa en la figura 2, los pacientes positivos para VIH-1 presentaban un incremento significativo en el porcentaje de células T CD4+ y CD8+ que eran CD38+/HLA-DR+ con respecto al grupo control ( $p < 0,001$  y  $p < 0,001$ , respectivamente).

#### Parámetros de seguimiento de pacientes positivos para VIH-1 y subpoblaciones de leucocitos

En el grupo de pacientes positivos para VIH-1, los parámetros universalmente utilizados para controlar la evolución de la infección por el VIH-1 (el recuento absoluto de linfocitos T CD4+ por  $\mu\text{l}$  de sangre periférica, y la carga viral plasmática determinada como el número de copias de ARN viral por ml de plasma) se correlacionaron con el estado de activación inmune y con el número absoluto en sangre periférica de las diferentes subpoblaciones de leucocitos (cuadro 2). Como era de esperarse, en este análisis se observó una asociación negativa entre el recuento de células T CD4+ y la carga viral. De los dos parámetros

de seguimiento, el recuento de linfocitos T CD4+ fue el que presentó una mejor asociación con el número absoluto de cada subpoblación de leucocitos y con el estado de activación inmunológica (cuadro 2). En particular, el recuento de células T

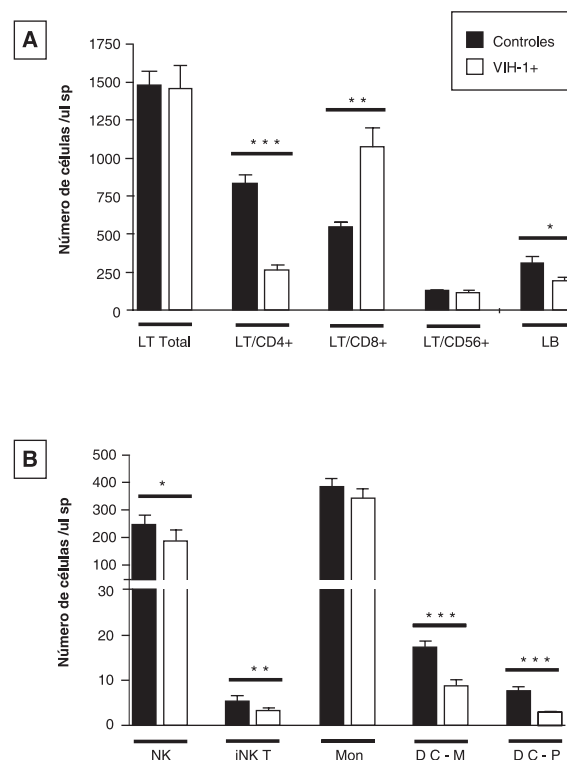
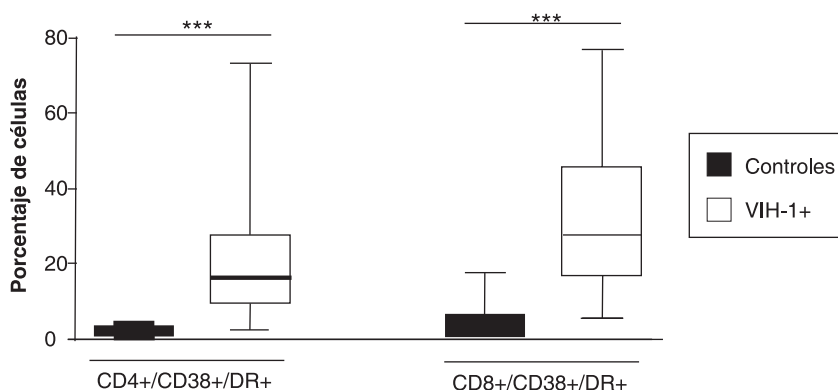


Figura 1. Subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica. La cantidad de los distintos subgrupos de leucocitos de sangre periférica de los pacientes positivos para VIH-1 y los controles sanos fue determinada por citometría de flujo. El número absoluto (células/ $\mu\text{l}$  de sangre) para cada subpoblación celular fue determinado teniendo en cuenta el recuento de leucocitos totales y el diferencial realizado en forma manual. (A) Subpoblaciones de células pertenecientes a la inmunidad adaptativa y (B) subpoblaciones celulares pertenecientes a la inmunidad innata.

Los resultados se presentan como la media aritmética y el error estándar. La comparación estadística entre dos grupos diferentes de estudio fue realizada con una prueba t de Student no pareada (Mann-Whitney), con un intervalo de confianza del 95%. Una diferencia estadística fue considerada como significativa cuando presentaba un valor de  $p < 0,05$ .

LT: linfocito T; LB: linfocito B; NK: células asesinas naturales; iNKT: linfocitos T con TCR invariante y restringidos por CD1d; Mon: monocitos; DC-M: células dendríticas mieloides; DC-P: células dendríticas plasmacitoides; SP: sangre periférica

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 2.** Activación inmunológica en los pacientes positivos para VIH-1.

En los controles sanos y los pacientes positivos para VIH-1, el estado de activación inmune de las células T CD4+ y CD8+ (coexpresión de las moléculas de activación CD38 y HLA-DR) fue determinado por citometría de flujo. Los resultados se presentan como la mediana, los percentiles 25% y 75%, y el rango. La comparación estadística entre dos grupos diferentes de estudio fue realizada con una prueba t de Student no pareada (Mann-Whitney), con un intervalo de confianza del 95%. Una diferencia estadística fue considerada como significativa cuando presentaba un valor de  $p < 0,05$ .

DR: HLA-DR; \*\*\*  $p < 0,001$

CD4+ presentó una asociación positiva más fuerte con el número absoluto de DC-M, células T CD8+, células T CD56+ y células NK.

Es interesante observar la asociación que se encontró entre estos dos parámetros y el estado de activación inmune de los pacientes positivos para VIH-1. El porcentaje de células T CD4+ positivas para CD38 y HLA-DR presentó una correlación negativa fuerte con el recuento de células T CD4+ ( $r = -0,5609$ ), y una buena correlación positiva con la carga viral ( $r = 0,5509$ ). En contraste, el porcentaje de linfocitos T CD8+ positivos para CD38 y HLA-DR tuvo una asociación débil con el recuento de células T CD4+ ( $r = -0,2383$ ) y con la carga viral plasmática ( $r = 0,0523$ , cuadro 2).

#### **Subpoblaciones de leucocitos según la presencia de infecciones oportunistas**

Para analizar el impacto de la presencia de infecciones oportunistas sobre la cantidad de las diferentes subpoblaciones de leucocitos y sobre el estado de activación inmune, los pacientes infectados con el VIH-1 se subdividieron en grupos de acuerdo con el antecedente de infección oportunista: i) con infección oportunista activa en el momento de la toma de la muestra; ii) con antecedentes en los seis meses previos de una infección oportunista tratada adecuadamente, y

iii) aquellos pacientes sin antecedentes de infección oportunista.

Aunque los diferentes subgrupos de pacientes positivos para VIH-1 presentaban un número significativamente menor de células T CD4+ que el grupo control (figura 3A), en el subgrupo de pacientes con infección oportunista activa esa diferencia fue mucho mayor. Como se observa en la figura 3B, los pacientes con infección oportunista tratada presentaban un número significativamente mayor de linfocitos T CD8+ que los pacientes con infección oportunista activa y que los controles. Los pacientes positivos para VIH-1 sin antecedentes de infección oportunista presentaron un número absoluto de células T CD8+ intermedio entre los pacientes con infección oportunista activa y con infección tratada, sin diferencias significativas al comparar estos grupos.

Las células iNKT se encontraron significativamente disminuidas en el subgrupo de pacientes con infección oportunista activa, en particular cuando se comparó con el subgrupo de pacientes sin antecedentes de infección ( $p < 0,001$ ) o con el subgrupo de los controles sanos ( $p < 0,001$ , figura 3C). De igual manera, los pacientes con infección oportunista activa presentaron una disminución significativa en el número absoluto de DC-M

**Cuadro 2.** Correlación entre el recuento de células T CD4+ o la carga viral y el número absoluto en sangre periférica de células de la inmunidad innata y adaptativa (n=32).

	Recuento de células T CD4+	Carga viral
Número de células T CD4+	NA	r=- 0,6301 ( <u>p=0,0001</u> )
Porcentaje de células CD4+CD38+DR+	r=- 0,5609 ( <u>p=0,0008</u> )	r=0,5509 ( <u>p=0,0011</u> )
Número de células T CD8+	r=0,6323 ( <u>p=0,0001</u> )	r=-0,3477 (p=0,0512)
Porcentaje de células CD8+CD38+DR+	r=- 0,2383 (p=0,1891)	r=0,0523 (p=0,7640)
Número de células T CD56+	r=0,6331 ( <u>p=0,0001</u> )	r=-0,3931 (p=0,0260)
Número de linfocitos B	r=0,3653 (p=0,0945)	r=-0,2306 (p=0,3018)
Número de células NK	r=0,5271 ( <u>p=0,0019</u> )	r=-0,3033 (p=0,0915)
Número de células iNKT	r = 0,4956 (p=0,0039)	r=- 0,3726 (p=0,0357)
Número de monocitos	r = 0,4828 (p=0,0051)	r=-0,3927 (p=0,0262)
Número de DC-M	r=0,7196 ( <u>p=0,0001</u> )	r=-0,4022 (p=0,0225)
Número de DC-P	r=0,4348 (p=0,0129)	r=-0,3257 (p=0,0689)

El grado de asociación entre dos variables se evaluó utilizando un análisis de correlación no paramétrico de Spearman, con un intervalo de confianza del 95%. Las asociaciones más fuertes ( $r>0,5$ ) están subrayadas.

NK: células asesinas naturales; iNKT: células T con TCR invariante y restringidas por CD1d; DC-M: células dendríticas mieloides; DC-P: células dendríticas plasmacitoides; NA: no aplica

cuando se compararon con el subgrupo de pacientes con antecedente de infección oportunista tratada ( $p<0,01$ ) o con el de los controles sanos ( $p<0,001$ , figura 3D). El subgrupo de pacientes sin antecedentes de infección presentaba una disminución significativa en el número absoluto de DC-M cuando se comparó con el subgrupo de los controles sanos ( $p<0,01$ , figura 3D).

Con respecto al número absoluto de DC-P, el subgrupo de pacientes con infección oportunista activa presentaba una disminución significativa cuando se comparó con el subgrupo de los controles sanos ( $p<0,001$ , figura 3E). Igualmente, el subgrupo de pacientes sin antecedentes de infección presentaba una disminución significativa en el número absoluto de DC-P cuando se comparó con el subgrupo de los controles sanos ( $p<0,01$ , figura 3E).

Cuando se comparó el número absoluto en sangre periférica de las células T CD56+, las células NK o los monocitos, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los subgrupos de pacientes positivos para VIH-1 y los controles (no se presentan los datos).

#### **Activación inmunológica según la presencia de infecciones oportunistas**

Como se observa en la figura 4A, el porcentaje de células T CD4+ que expresaban simultánea-

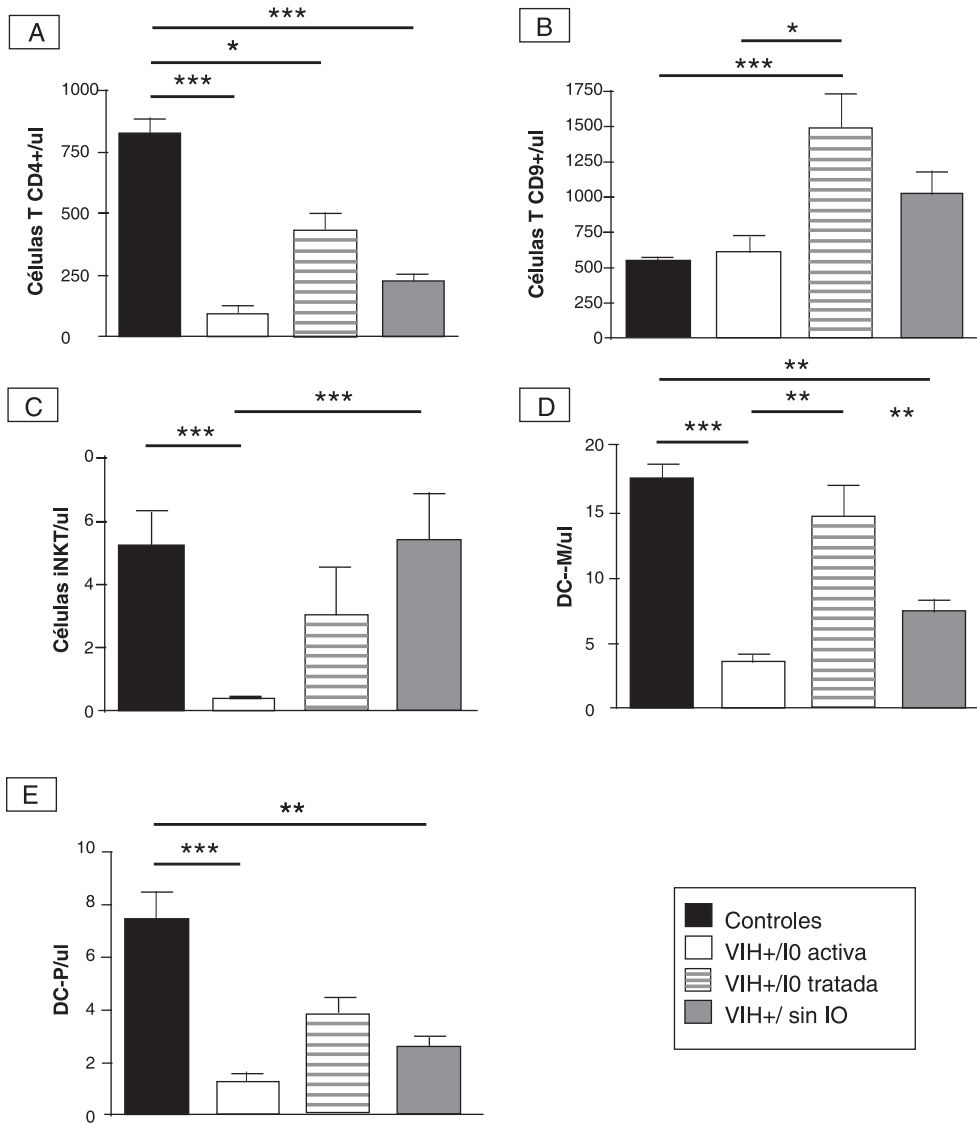
mente los marcadores de activación CD38 y HLA-DR fue significativamente menor en el subgrupo de los controles al compararlo con los pacientes positivos para VIH-1 con infección oportunista activa ( $p<0,001$ ), con infección oportunista tratada ( $p<0,001$ ) o sin antecedente de infección ( $p<0,001$ ).

En forma similar, el porcentaje de células T CD8+ que expresaban estos marcadores de activación (figura 4B) fue significativamente menor en el subgrupo de los controles al compararlo con los pacientes positivos para VIH-1 con infección oportunista activa ( $p<0,001$ ), con infección oportunista tratada ( $p<0,001$ ) o sin antecedentes de infección ( $p<0,01$ , figura 4B). Sin embargo, y en particular para las células T CD8+, los pacientes con infección oportunista activa presentaron un mayor porcentaje de células que expresaban marcadores de activación inmunológica, aunque no se observó ninguna diferencia significativa al comparar los tres subgrupos de pacientes.

#### **Discusión**

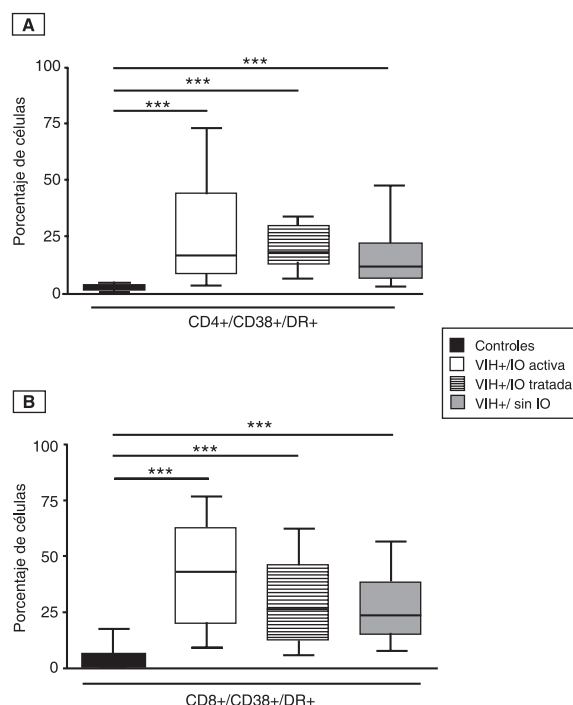
Durante la infección por el VIH-1 se han observado diversas alteraciones cuantitativas y funcionales en los distintos subgrupos de leucocitos, trastornos que progresivamente conducen a una inmunodeficiencia grave (21-23); de hecho, las





infecciones por microorganismos oportunistas pueden aparecer como consecuencia de ese deterioro inmunológico progresivo (6,15). Sin embargo, la presencia de las infecciones no es un fenómeno aislado pues se ha observado que ellas pueden influir directamente agravando el progreso de la infección por el VIH-1 (13,14). Actualmente, no se conocen suficientemente los mecanismos responsables de este efecto sinérgico entre las infecciones oportunistas y el progreso de la inmunodeficiencia observada durante la infección con el VIH-1 pero, al parecer, depende de una activación de la replicación viral inducida por las señales derivadas del reconocimiento de los microorganismos por los receptores de la inmunidad innata (7). Esta investigación se realizó para evaluar el impacto de la infección por el VIH-1, así como de la presencia simultánea de esta infección con otras infecciones oportunistas, sobre la cantidad de las diferentes subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica, con el fin de establecer si existían anomalías cuantitativas que pudieran explicar, al menos parcialmente, el mayor deterioro clínico observado en los pacientes con esas infecciones asociadas.

En primer lugar, los resultados obtenidos en esta investigación confirman las alteraciones cuantitativas en las diferentes subpoblaciones de leucocitos de la inmunidad innata y adaptativa (10,23-25) y el estado de activación inmunológica (11,26) que se observan en sangre periférica de los pacientes crónicamente infectados con el VIH-1. Estas anomalías fueron atribuidas a la capacidad que tiene el VIH-1 de infectar directamente diversas subpoblaciones de leucocitos y a la respuesta inmune específica dirigida contra ellas (24,27-31). Sin embargo, la baja cantidad de células infectadas que se han encontrado en la sangre periférica de los pacientes positivos para VIH-1 indica que otros mecanismos son responsables de las deficiencias cuantitativas en las subpoblaciones de leucocitos (32); entre ellos, se destaca un incremento en la apoptosis de las células infectadas y no infectadas (33) mediada por proteínas del virus y citocinas, como los interferones tipo I, que incrementan la expresión de moléculas proapoptóticas (34), así como la



**Figura 4.** Activación inmunológica y presencia de infecciones oportunistas

Los pacientes infectados con el VIH-1 fueron subdivididos en tres subgrupos de acuerdo con el antecedente de infecciones oportunistas. El estado de activación inmune (coexpresión de las moléculas de activación CD38 y HLA-DR) de las células T CD4+ (A) y CD8+ (B) fue determinado en los subgrupos de pacientes positivos para VIH-1 y los controles sanos por citometría de flujo.

Los resultados se presentan como la mediana, los percentiles 25% y 75% y el rango. La comparación estadística entre tres o más grupos diferentes de estudio se realizó con una prueba de ANOVA no paramétrica (Kruskal-Wallis), con un intervalo de confianza del 95%. Una diferencia estadística fue considerada como significativa cuando presentaba un valor de  $p < 0,05$ .

IO: infección oportunista; DR: HLA-DR; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

activación inmunológica crónica que puede favorecer la apoptosis o modificar el patrón de recirculación de los diferentes leucocitos, localizándolos en los sitios de mayor replicación viral, como los órganos linfoides secundarios (11,35).

No obstante que el grupo total de pacientes crónicamente infectados con el VIH-1 presentó una deficiencia cuantitativa en la mayoría de las

subpoblaciones de leucocitos de sangre periférica, es muy importante resaltar que esa deficiencia fue mucho más significativa en el subgrupo de pacientes que presentaba una infección oportunista activa. Si bien los alcances de esta investigación no permiten definir claramente los mecanismos responsables de esta anomalía, la apoptosis inducida por la activación inmune exagerada, impuesta por la coinfección VIH-1/infección oportunista, puede ser en parte responsable del menor número de las distintas subpoblaciones de leucocitos que se observa en este grupo de pacientes. También pueden estar contribuyendo para esta deficiencia factores como el efecto citopático directo del VIH-1, la destrucción mediada por reacciones autoinmunes contra esas células y una deficiencia en la producción de las diferentes líneas celulares de la médula ósea.

De otro lado, es posible que la mayor replicación viral observada en el subgrupo de pacientes con infección oportunista activa induzca la activación y migración de esas subpoblaciones celulares a los órganos linfoides, sitio anatómico en el que se desarrolla la infección por el VIH-1. Sin embargo, aunque este subgrupo de pacientes presentaba una carga viral mucho mayor que los pacientes positivos para VIH-1 con infección previamente tratada (cuadro 1), esa carga viral era similar a la de los pacientes sin antecedentes de infección oportunista; este hecho indica que, si bien el nivel de la replicación viral puede influir en el grado de deficiencia cuantitativa de las diferentes subpoblaciones de leucocitos, existen otros factores que pueden jugar un papel más determinante, como el grado de alteración en la actividad hematopoyética de la médula ósea y de destrucción de los órganos linfoides.

Además, no se puede descartar un efecto directo de las infecciones oportunistas sobre la cantidad de los diferentes leucocitos en sangre periférica pues la presencia de esas infecciones se ha asociado con un mayor deterioro clínico y más rápida progresión a sida (9). Infortunadamente, los pacientes evaluados en esta investigación presentaban un grupo heterogéneo de infecciones oportunistas, y los alcances de este estudio no permitieron evaluar un número significativo de pacientes con una misma infección, de manera

que se pudiera establecer el efecto particular de una infección sobre el recuento absoluto de las diferentes subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica. Las infecciones crónicas, como las producidas por el virus de Epstein Bar, pueden conducir a la expansión policlonal de los linfocitos B, mientras que otras como la tuberculosis y las infecciones micóticas se pueden asociar con linfopenia crónica. Sin embargo, en nuestros resultados los pacientes positivos para VIH-1 con infección oportunista activa presentaron un número absoluto menor de las diferentes subpoblaciones de leucocitos que los pacientes positivos para VIH-1 con infección previamente tratada, hecho que sugiere que la presencia simultánea de una infección oportunista puede estar afectando el recuento de los diferentes leucocitos en sangre periférica.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, las anteriores consideraciones plantean un interrogante adicional relacionado con la asociación causa/efecto entre la presencia de las infecciones oportunistas y las alteraciones cuantitativas en las subpoblaciones de leucocitos en sangre periférica: ¿aparecieron las infecciones oportunistas en esos pacientes positivos para VIH-1 como consecuencia de una deficiencia significativa en las diferentes subpoblaciones de leucocitos?, o ¿fue la presencia de la coinfección con una infección oportunista la que contribuyó a agravar esa deficiencia cuantitativa? La hipótesis más viable para explicar esa relación es que los dos factores en juego, la presencia de infecciones oportunistas y las alteraciones cuantitativas en las subpoblaciones de leucocitos, forman un círculo vicioso que actúa en forma sinérgica para agravar la evolución clínica y el pronóstico de los pacientes crónicamente infectados por el VIH-1.

Se ha demostrado que durante la infección por el VIH-1 existe un estado de activación inmune persistente, denominado hiperactivación inmunológica, fenómeno que se asocia con múltiples trastornos funcionales en los leucocitos y con apoptosis acelerada de esas células (11,36). El nivel de células T CD4+ y CD8+ activadas se considera como un factor pronóstico independiente de la reducción en el recuento de linfocitos T CD4+ y de la progresión al sida

(11,36,37). En nuestros pacientes positivos para VIH-1 demostramos la presencia de un aumento significativo en la expresión de los dos marcadores más importantes de activación de los linfocitos, tanto en las células T CD4+ como en las CD8+. En el subgrupo de nuestros pacientes con infección oportunista activa, se observó una tendencia a presentar una mayor expresión de marcadores de activación que en los otros subgrupos de pacientes; se ha observado que la presencia de infección oportunista puede aumentar la activación inmune en los pacientes positivos para VIH-1 (9). Sin embargo, es importante considerar que el 100% de los pacientes positivos para VIH-1 con infección oportunista activa no estaban recibiendo terapia antirretroviral en el momento de tomar la muestra para estos estudios, hecho que puede influir en el elevado nivel de activación inmunológica encontrado en este grupo de pacientes, pues la terapia antirretroviral puede tener un efecto positivo al disminuir este fenómeno fisiopatológico (11,37).

El origen de este estado de activación aumentada persistente es aparentemente multifactorial, involucrando la exposición crónica del sistema inmune a los antígenos del VIH-1, la capacidad de mutación que tiene este virus, la respuesta a otros antígenos derivados de patógenos reactivados en los pacientes positivos para VIH-1, y la presencia sistémica de otros microorganismos debido a las alteraciones estructurales y funcionales de las mucosas, particularmente del aparato gastrointestinal. Un estado de activación inmune persistente en los afectados por el VIH-1 puede contribuir con las alteraciones funcionales observadas en las diferentes subpoblaciones de leucocitos, así como con la deficiencia cuantitativa de esas células al favorecer su apoptosis.

Otro hallazgo interesante de esta investigación es que el recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica presentó una mejor correlación con el número absoluto de las diferentes subpoblaciones de leucocitos al compararla con la observada para la carga viral. Este hallazgo es muy interesante pues se puede creer erróneamente que el esquema de terapia antirretroviral altamente activa (*highly active antiretroviral therapy*, HAART),

además de inhibir eficientemente la replicación del VIH-1, tiene un efecto restaurador de la inmunocompetencia.

Lo que realmente sucede es que cuando se reprime la replicación viral, cesa la mayoría de los efectos patogénicos del virus y el sistema inmune intenta restablecer su homeostasis. Sin embargo, las alteraciones inducidas por la infección con el VIH-1 sobre la arquitectura y función de los órganos linfoides hace que comúnmente no exista una relación directa entre inhibición de la replicación viral y recuperación cuantitativa y funcional de la respuesta inmune (38-40). Así, en muchos pacientes la evolución crónica de la infección, el diagnóstico tardío y el inicio del HAART en las etapas avanzadas de la enfermedad hacen que ya existan cambios estructurales importantes en los órganos linfoides primarios y secundarios, que impiden una reconstitución inmune adecuada; este fenómeno se traduce en un menor recuento de células T CD4+, y de otras subpoblaciones de leucocitos, en los sujetos con daños en el tejido linfoide (26,37,39,41).

Este hallazgo ratifica, entonces, la utilidad del recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica como un parámetro para determinar el estado de compromiso inmunológico y su seguimiento en los infectados por el VIH-1. Además, plantea la posibilidad de utilizar marcadores de activación inmune como complemento del recuento de linfocitos T CD4+ en el control de la evolución de la infección por el VIH-1.

La infección crónica por el VIH-1 es considerada actualmente como una enfermedad de fisiopatología muy compleja en la cual, además de una pérdida progresiva de los linfocitos T CD4+, existen también alteraciones funcionales y cuantitativas en muchas subpoblaciones de leucocitos y un deterioro progresivo de los órganos linfoides, situación que lleva a los infectados a padecer de una inmunodeficiencia multifactorial y combinada, que finalmente los predispone a padecer de infecciones oportunistas, enfermedades autoinmunes y neoplasias malignas (42). Teniendo este marco de visión más amplio sobre el grado de compromiso de la respuesta inmune

durante la infección por el VIH-1, y considerando los resultados de esta investigación sobre la asociación entre la presencia de infecciones oportunistas y mayores alteraciones cuantitativas en diversas subpoblaciones de leucocitos, surge la necesidad de establecer nuevas posibilidades de reconstitución inmune en los individuos infectados con el VIH-1 diseñando estrategias de inmunoterapia que complementen los beneficios logrados con el HAART (43).

### Agradecimientos

Los autores agradecen la valiosa colaboración del Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín por permitir el acceso a las muestras de los pacientes.

### Conflictos de interés

Los autores manifiestan que no se presentaron conflictos de interés durante el desarrollo de esta investigación y la publicación de los resultados.

### Financiación

Esta investigación se logró gracias al apoyo del Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia y de *Rush University Medical Center* (Chicago, Estados Unidos).

### Referencias

1. **The Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, World Health Organization.** AIDS epidemic update 2006. Geneva: UNAIDS, WHO; 2007.
2. **Cohen DE, Walker BD.** Human immunodeficiency virus pathogenesis and prospects for immune control in patients with established infection. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1756-68.
3. **Clerici M, Clivio A, Shearer GM.** Resistance to HIV infection: the genes are only part of the solution. *Trends Microbiol.* 1997;5:2-4.
4. **O'Brien SJ, Nelson GW.** Human genes that limit AIDS. *Nat Genet.* 2004;36:565-74.
5. **Touloumi G, Hatzakis A.** Natural history of HIV-1 infection. *Clin Dermatol.* 2000;18:389-99.
6. **Chaisson RE, Bishai W.** No news is good news: opportunistic infections. *Hopkins HIV Rep.* 1998;10:2-11.
7. **Equils O, Schito ML, Karahashi H, Madak Z, Yarali A, Michelsen KS, et al.** Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication. *J Immunol.* 2003;170:5159-64.
8. **Rotchford K, Strum AW, Wilkinson D.** Effect of coinfection with STDs and of STD treatment on HIV shedding in genital-tract secretions: systematic review and data synthesis. *Sex Transm Dis.* 2000;27:243-8.
9. **Sulkowski MS, Chaisson RE, Karp CL, Moore RD, Margolick JB, Quinn TC.** The effect of acute infectious illnesses on plasma human immunodeficiency virus (HIV) type 1 load and the expression of serologic markers of immune activation among HIV-infected adults. *J Infect Dis.* 1998;178:1642-8.
10. **Rodriguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, et al.** Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA.* 2006;296:1498-506.
11. **Hazenbergh MD, Otto SA, van Benthem BH, Roos MT, Coutinho RA, Lange JM, et al.** Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS.* 2003;17:1881-8.
12. **Letwin NL, Walker BD.** Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat Med.* 2003;9:861-6.
13. **Leroy V, Salmi LR, Dupon M, Sentilhes A, Texier-Maugein J, Dequae L, et al.** Progression of human immunodeficiency virus infection in patients with tuberculosis disease. A cohort study in Bordeaux, France, 1988-1994. The Groupe d'Epidemiologie Clinique du Sida en Aquitaine (GECSA). *Am J Epidemiol.* 1997;145:293-300.
14. **Whalen C, Horsburgh CR, Hom D, Lahart C, Simberkoff M, Ellner J.** Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151:129-35.
15. **Crowe SM, Carlin JB, Stewart KI, Lucas CR, Hoy JF.** Predictive value of CD4 lymphocyte numbers for the development of opportunistic infections and malignancies in HIV-infected persons. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1991;4:770-6.
16. **Nissapatorn V, Lee CK, Rohela M, Anuar AK.** Spectrum of opportunistic infections among HIV-infected patients in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2004;35 (Suppl 2):26-32.
17. **Levy JA.** The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Immunol.* 2001;22:312-6.
18. **Levy JA, Mackewicz CE, Barker E.** Controlling HIV pathogenesis: the role of noncytotoxic anti-HIV activity of CD8+ cells. *Immunol Today.* 1996;17:217-24.
19. **Levy JA, Scott I, Mackewicz CE.** Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin Immunol.* 2003;108:167-74.

20. **Centers for Disease Control and Prevention.** 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep.* 1992; 41:1-19.
21. **Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, Patterson S.** Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood.* 2003;101:4505-11.
22. **Cohen O, Weissman D, Fauci AS.** The immunopathogenesis of HIV infection. En: Paul WE, editor. *Fundamental immunology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p.1455-98.
23. **Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B, Qazi N, Gilmour J, Gotch F, et al.** Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood.* 2001;98:2574-6.
24. **Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, et al.** HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature.* 2002;417:95-8.
25. **Unutmaz D.** NKT cells and HIV infection. *Microbes Infect.* 2003;5:1041-7.
26. **Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R.** Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993;6:904-12.
27. **Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, Lebon P, Deveau C, Goujard C et al.** Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood.* 2001;98:3016-21.
28. **Fleuridor R, Wilson B, Hou R, Landay A, Kessler H, Al-Harhi L.** CD1d-restricted natural killer T cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection. *Immunology.* 2003;108:3-9.
29. **Rubbert A, Combadiere C, Ostrowski M, Arthos J, Dybul M, Machado E, et al.** Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol.* 1998;160:3933-41.
30. **Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al.** Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol.* 2002;3:975-83.
31. **Valentin A, Rosati M, Patenaude DJ, Hatzakis A, Kostrikis LG, Lazanas M, et al.** Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99:7015-20.
32. **Shearer GM.** HIV-induced immunopathogenesis. *Immunity.* 1998;9:587-93.
33. **Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al.** Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med.* 1995;1:129-34.
34. **Herbeuval JP, Grivel JC, Boasso A, Hardy AW, Chougnet C, Dolan MJ, et al.** CD4+ T cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type I interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood.* 2005;106:3524-31.
35. **Sousa AE, Carneiro J, Meier-Schellersheim M, Grossman Z, Victorino RM.** CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol.* 2002;169:3400-6.
36. **Bofill M, Mocroft A, Lipman M.** Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T-cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS.* 1996;10:827-34.
37. **Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, et al.** T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* 2003;187:1534-43.
38. **Carcelain G, Debre P, Autran B.** Reconstitution of CD4+ T lymphocytes in HIV-infected individuals following antiretroviral therapy. *Curr Opin Immunol.* 2001;13:483-8.
39. **Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait-Mohand H, Autran B.** Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet.* 1998;351:1682-6.
40. **Gorochov G, Neumann AU, Kereveur A, Parizot C, Li T, Katlama C, et al.** Perturbation of CD4+ and CD8+ T-cell repertoires during progression to AIDS and regulation of the CD4+ repertoire during antiviral therapy. *Nat Med.* 1998;4:215-21.
41. **Connors M, Kovacs JA, Krevat S, Gea-Banacloche JC, Sneller MC, Flanigan M, et al.** HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med.* 1997;3:533-40.
42. **Montoya CJ, Moreno ME, Rugeles MT.** Reacciones y alteraciones del sistema inmune durante la infección por el VIH-1. *Infectio.* 2006;10:250-65.
43. **Montoya CJ, Rugeles MT, Landay AL.** Innate immune defences in HIV-1 infection: prospective for a novel immune therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2006;4:767-80.