

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

FRECUENCIA Y ESTADO DE ACTIVACIÓN DE POBLACIONES CELULARES
DEL SISTEMA INMUNE EN INDIVIDUOS CONTROLADORES DE LA
INFECCIÓN POR EL VIH-1

ESTUDIANTE

DAVID VÁSQUEZ MURIEL

ASESORES

NATALIA TABORDA VANEGAS

MARIA TERESA RUGELES

MEDELLÍN, MARZO DE 2013

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
PALABRAS CLAVE	1
MARCO TEÓRICO	2
OBJETIVOS	13
MÉTODOS	13
RESULTADOS	16
DISCUSIÓN	21
REFERENCIAS	24

RESUMEN

La infección por el VIH-1 constituye una pandemia y un serio problema de salud pública, ya que no se ha desarrollado una vacuna ni una cura. Existen individuos denominados controladores que en ausencia de terapia y por más de un año después del diagnóstico se caracterizan por tener menos de 2000 partículas virales por mililitro de sangre periférica. El fenotipo de estos individuos indica la existencia de mecanismos naturales para controlar la replicación viral. La comprensión de estos mecanismos podría llevar al diseño de estrategias terapéuticas para esta infección. Por otro lado, se conoce que uno de los principales factores asociados a la progresión al sida es la activación inmune crónica, que conlleva el desgaste del sistema inmune afectando a todas las poblaciones celulares de este y comprometiendo la capacidad de respuesta contra otros patógenos. Con el fin de identificar algunas de las diferencias asociadas al control de la replicación, se compararon mediante citometría de flujo las frecuencias de subpoblaciones de linfocitos (T CD4⁺, T CD8⁺, T_{reg} células NK, iNKT) y de células dendríticas (mieloides y plasmacitoides), así como las frecuencias de las células activadas de éstas, entre individuos no infectados, individuos que progresan al sida típicamente y controladores. Se encontró que los controladores exhiben un aumento en la población de células NK CD16⁻CD56^{high}, una disminución de las células NK CD16⁺CD56⁻ y un aumento de células T_{reg}. Además, se evidenció en los controladores una menor frecuencia de células LT CD4⁺ activados y una mayor frecuencia de T_{reg} activados. Es necesario aumentar el tamaño muestral para lograr una mayor potencia estadística y realizar estudios funcionales para comprender mejor las diferencias halladas.

PALABRAS CLAVE:

VIH, control de la replicación, NK CD16⁻CD56^{high}, activación inmune crónica

MARCO TEÓRICO

Introducción

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) se caracteriza por la baja cantidad de los linfocitos T (LT) CD4⁺ (<200/μL de sangre) y por la consecuente susceptibilidad a diversas enfermedades: infecciones oportunistas, complicaciones neurológicas y neoplasias raramente reportadas en personas inmunocompetentes (Hutchinson, 2001).

En la década de los 80 se publicaron evidencias de que el agente etiológico del sida es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Barré-Sinoussi et al., 1983; Popovic, Sarngadharan, Read, & Gallo, 1984), que es transmitido a través del intercambio de fluidos, ya sea por vía sexual, vertical o parenteral (Hutchinson, 2001).

Se han identificado dos serotipos del VIH: VIH-1 y VIH-2, siendo el primero el causante de la actual epidemia mundial (Clavel et al., 1986; Hutchinson, 2001). También se ha descrito que la patogénesis ocasionada por ambos tipos es similar, pero que la deficiencia inmunológica es menos severa en la infección por el VIH-2. Para evaluar el estado de los individuos infectados se utilizan principalmente dos parámetros: el recuento de LT CD4⁺, usado ampliamente como una medida de la inmunocompetencia y del riesgo inmediato de sufrir enfermedades oportunistas (Hutchinson, 2001; Masur et al., 1989), y el número de partículas virales por mililitro de sangre periférica (carga viral o viremia). Entre más baja sea la carga viral y más alto el recuento de LT CD4⁺, mejor es el pronóstico del individuo infectado (Moir, Chun, & Fauci, 2011).

Existen individuos que controlan la replicación del VIH y otros que se exponen al virus pero no se infectan.

La exposición al VIH-1 no necesariamente conduce a la infección. Así lo demuestra la existencia de individuos que clínica y serológicamente no presentan evidencias de infección a pesar de exponerse frecuentemente al virus, ya sea por

vía sexual, vertical, o parenteral. Por ejemplo: los individuos no infectados que tienen sexo sin protección con su parejas seropositivas, las trabajadoras sexuales, los hemofílicos que reciben productos sanguíneos contaminados con el VIH y los hijos seronegativos de madres seropositivas (Kulkarni, Butera, & Duerr, 2003). Estos individuos han sido clasificados como expuestos seronegativos (HESN) (Piacentini, Fenizia, Naddeo, & Clerici, 2008).

Adicionalmente, se sabe que la infección por el VIH-1 progresa hacia el sida a una velocidad variable entre los individuos infectados. Los individuos infectados con el VIH-1, conocidos como progresores rápidos (~10%), desarrollan el sida en menos de 5 años, mientras que los conocidos como progresores típicos (~85%) lo hacen en un período de 5 a 10 años después de la infección. Existen también personas conocidas como no progresores a largo término (LTNP), quienes permanecen asintomáticos por más de 10 años con un recuento mayor o igual a 500 LT CD4⁺/μL en ausencia de terapia antirretroviral y corresponden entre el 5-10% de los infectados (Cao, Limo, Linqi, Jeffrey, & Ho, 1995; Haynes, Pantaleo, & Fauci, 1996).

La existencia de personas HESN y LTNP sugiere la existencia de mecanismos de defensa naturales que confieren resistencia a la infección o que permiten el control de la replicación del virus. Sin embargo, la inclusión de estos individuos en las investigaciones es cada vez más difícil debido al impacto de las campañas de prevención de la exposición, en el caso de los individuos HESN, y al seguimiento prolongado que debe hacerse para poder clasificar a los individuos como LTNP. Teniendo en cuenta la limitación que esto representa para estudiar los mecanismos anti-VIH1, dos nuevos fenotipos de individuos VIH-1 positivos fueron descritos recientemente; ambos se caracterizan por el control espontáneo y sostenido de la replicación viral al menos durante un año después del diagnóstico y en ausencia de terapia antirretroviral. El primer grupo es conocido como controladores del VIH-1 élite ya que mantienen una carga viral indetectable (< 50 partículas virales/mL), mientras que el segundo grupo es conocido como controladores del VIH-1 virémicos quienes mantienen una carga viral detectable pero menor a 2000 partículas virales/mL (Walker, 2007).

Los controladores no pueden ser distinguidos de otros pacientes VIH seropositivos con base en su género, grupo étnico, ubicación, profesión ni el modo de infección (Thèze, Chakrabarti, Vingert, Porichis, & Kaufmann, 2011).

Si bien no se han determinado claramente los mecanismos que explican el control espontáneo de la replicación del VIH, se acepta que éste es el resultado de diversos factores que involucran no sólo los asociados al virus sino también al hospedero, particularmente factores inmunológicos y/o genéticos:

Factores virales

Es posible que en algunos casos la replicación del VIH sea controlada porque la cepa infectante es poco virulenta o atenuada (Miura et al., 2010); sin embargo, esto no es fácil de demostrar ya que el virus infectante varía rápidamente, entre otras, por la presión de selección ejercida por el hospedero (Thèze et al., 2011). Sin embargo, hay pruebas de que el control se puede dar sobre cepas plenamente patogénicas (Bailey et al., 2008), lo que permitiría diseñar medidas terapéuticas para los individuos infectados a partir de los hallazgos en los controladores sin importar la cepa infecciosa.

Factores del hospedero

Los posibles mecanismos de control son todos aquellos que participan en la interacción entre el virus y el hospedero. Entre ellos cabe notar: la susceptibilidad de los LT CD4⁺ a ser infectados, determinada por la expresión del receptor CD4, correceptores (principalmente CCR5 y CXCR4) y moléculas de adhesión; la expresión de proteínas antivirales como APOBEC3G, Trim5 α , Teterina, SAM-HD1; la combinación de ciertos receptores de células asesinas naturales (NK) o de LT CD8⁺ con productos proteicos de algunos alelos del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (CMH I) que resulta en una actividad citotóxica más efectiva (Miura et al., 2008; Thèze et al., 2011).

La activación crónica del sistema inmune se asocia con la progresión al sida.

La forma en cómo la infección por el VIH lleva al sida ha sido objeto de intenso estudio. En un inicio se pensó que esto podía ser explicado meramente por los efectos citopáticos del virus en los LT CD4⁺, que llevarían a la disminución de esta población celular (Ostrowski, 2010). En este mismo sentido se propuso un modelo en el cuál la disminución de LT CD4⁺ se debía completamente a su interacción con el virus y la progresión al sida era el resultado de una falla en la homeostasis del sistema inmune que impedía contrarrestar la pérdida de estas células (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995). Este modelo permitía explicar el aumento de LT CD4⁺ evidenciado en individuos que iniciaban terapia antirretroviral; no obstante, obtuvo fuertes críticas porque no tenía en cuenta la compleja dinámica de las poblaciones de LT en respuesta a una infección viral crónica y ofrecía una visión simplista de la patogénesis del sida (Ascher, 1988; Grossman, Meier-Schellersheim, Sousa, Victorino, & Paul, 2002; Hazenberg, Hamann, Schuitemaker, & Miedema, 2000; Hellerstein, 2002; Lempicki et al., 2000; McCune, 2001).

La importancia de la activación crónica del sistema inmune en la patogénesis del sida fue planteada por Ascher y Sheppard, y por Grossman y colaboradores (Ascher, 1988; Grossman, Bentwich, & Herberman, 1993; Grossman & Herberman, 1997). Más tarde, Giorgi y colaboradores publicaron una serie de estudios clínicos como evidencia de que una activación inmune excesiva es un factor decisivo en el desarrollo de la disfunción inmunológica asociada al VIH (Deeks et al., 2004; Giorgi et al., 1999, 2002; Liu et al., 1997). En estos estudios se encontró que el nivel de activación de los LT CD8⁺, determinado por la coexpresión de CD38 y HLA-DR, se correlacionaba de mejor manera con el progreso de la enfermedad que la carga viral en sangre. Conjuntamente, estudios con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) dejan manifiesto que un alto grado de replicación viral no es suficiente para inducir la progresión al sida en ausencia de niveles aumentados de activación inmune (Broussard et al., 2001; Chakrabarti et al., 2000; Silvestri et al., 2003; Sumpter et al., 2007).

Entre las consecuencias de la hiperactivación inmune durante la fase crónica de la infección por el VIH están las altas tasas de recambio celular, la activación y diferenciación de los linfocitos, además de la inducción del agotamiento inmune, senescencia y bajo potencial de renovación.

Se piensa que la activación inmune durante la infección por el VIH es mediada por citocinas y quimiocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-12, IL-6, CXCL10, entre otras), interferón tipo I (IFN- α) y por productos microbianos como el lipopolisacárido (LPS), un potente activador del sistema inmune por su capacidad de unirse a macrófagos y células dendríticas (DC) e inducir la liberación de productos proinflamatorios (Moir et al., 2011). La producción de muchos de estos factores se incrementa durante la fase aguda de la infección y para algunos es mantenida en la fase crónica (McMichael, Borrow, Tomaras, Goonetilleke, & Haynes, 2010). Los niveles de LPS se incrementan en la sangre debido a la translocación que ocurre a través de la mucosa intestinal perturbada por el virus y sus efectos (Brenchley, 2006). Este incremento de LPS en el plasma sanguíneo ha sido evidenciado en las fases crónicas de la infección por el VIH y la infección patogénica por el VIS, lo que llevaría a pensar que la destrucción de la mucosa intestinal inducida por el virus y la translocación asociada a esto son claves en la inducción y mantenimiento de la activación inmune (Brenchley, Price, & Douek, 2006).

Las subpoblaciones leucocitarias en individuos infectados con el VIH-1 y la evaluación de la activación inmune en estas células

El VIH no sólo afecta a los LT CD4⁺ sino que también induce la disfunción inmunológica de los LT CD8⁺, los linfocitos B, las células NK y células no linfoides; todo esto a través de mecanismos que incluyen: la alta tasa de recambio celular, la activación, la diferenciación y respuestas homeostáticas. Juntos, estos factores llevan a cambios cualitativos y cuantitativos dentro de cada subpoblación leucocitaria que finalmente alteran la inmunocompetencia general del organismo (Moir et al., 2011).

Los linfocitos T CD4⁺

Son importantes en la respuesta inmune adaptativa porque producen una gran cantidad de citoquinas que permiten la modulación y la interacción con otras células del sistema inmune. Son el principal blanco del VIH, pues expresan el receptor CD4 y moléculas correceptoras, necesarias en el proceso de entrada a la célula (Hutchinson, 2001).

Tempranamente en el curso de la infección, los LT CD4⁺, en especial los de memoria, disminuyen en la circulación y en el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal; a medida que la enfermedad progresa los LT CD4⁺ de ambos fenotipos, vírgenes y de memoria, desaparecen progresivamente de la circulación; en los estadios más avanzados de la infección todas las poblaciones de LT CD4⁺ son afectadas (Roederer, Dubs, Anderson, Raju, & Herzenberg, 1995). La disminución de esta población celular se debe a los efectos citopáticos del VIH, la apoptosis inducida por la activación, y la actividad citotóxica de los LT CD8⁺ y de las células NK.

La progresión de la infección por el VIH se caracteriza no sólo por anomalías cuantitativas en los LT CD4⁺, sino también por anomalías funcionales. Se ha evidenciado que *in vitro* los LT CD4⁺ de personas infectadas tienen una capacidad proliferativa disminuida en respuesta a antígenos o mitógenos; se reportó que hay una pérdida secuencial de la capacidad de respuesta a antígenos, seguidos por aloantígenos y por último a mitógenos (Clerici et al., 1989). También se encontró que los LT CD4⁺ de individuos infectados expresan interleuquina 2 (IL-2) en menor cantidad (Sieg, Bazdar, Harding, & Lederman, 2001), lo cual está probablemente relacionado con la baja proliferación. En contraste, la expresión de interferón gama (IFN γ) en estas células no cambia (Sieg et al., 2001), lo que sugiere que la capacidad defectuosa de respuesta no es una consecuencia de la disminución de células reactivas contra antígenos, sino de una alteración en la respuesta después de la unión del TCR con las moléculas del CMH. Además de esto, se ha mostrado que los LT CD4⁺ específicos para el VIH son infectados preferencialmente (Douek et al., 2002).

Los linfocitos T CD8⁺

Son determinantes en el resultado de las infecciones virales, en procesos tumorales y en cualquier fenómeno que involucre la presentación de antígenos intracelulares no propios. Se caracterizan por expresar el receptor CD8 y por ser alta y específicamente citotóxicas al activarse. En la infección aguda por el VIH se presenta un aumento en el número de LT CD8⁺ concomitante con el descenso de la viremia (McMichael et al., 2010). En un inicio los LT CD8⁺ controlan el virus fundador, pero como resultado de esta presión de selección surgen mutantes de escape que constituyen posteriormente la cuasiespecie viral que se mantiene en cantidades más o menos estables durante la fase de latencia. Las expansiones de LT CD8⁺ persisten hasta estadios avanzados de la enfermedad, en los cuales la frecuencia de todos los LT tiende a disminuir (Margolick et al., 1995).

Como se ha evidenciado con los LT CD4⁺, los LT CD8⁺ de personas seropositivas que progresan al sida pierden capacidad proliferativa in vitro en respuesta a la activación mediada por el TCR (Migueles et al., 2002). Aún es desconocido si esto se debe a una anomalía propia de los LT CD8⁺, a la baja producción de IL-2 por parte de los LT CD4⁺ o a una maduración preferencial de los LT CD8⁺ hacia un fenotipo efector.

Ahora bien, la evaluación de la activación inmune en los LT puede evidenciarse a través de: i) la alta frecuencia de estas células expresando marcadores de activación y proliferación (al igual que en los linfocitos CD8⁺, la coexpresión de HLA-DR y CD38 ha sido asociada a la activación de LT CD4⁺) (Hazenberg et al., 2000; Kestens, Vanham, Vereecken, Vandenbruaene, & Vercauteren, 1994; Orendi et al., 1998; Sachsenberg et al., 1998); ii) altos niveles de apoptosis inducida por activación en LT no infectados (Estaquier et al., 1994; Finkel et al., 1995; Gougeon et al., 1996) y iii) altos niveles de proliferación de estas células medidos por marcaje directo con éster de succinimidil carboxifluorosceína (CFSE) (Hersperger et al., 2010; J. a Kovacs et al., 2001; Rosenzweig et al., 1998).

Las células dendríticas

Son células presentadoras profesionales que se diferencian a partir de monocitos. Las DC son un enlace entre la inmunidad innata y adaptativa, pues ellas internalizan los patógenos invasores por endocitosis y los digieren en los endolisosomas y proteasomas para después presentar los péptidos antigénicos a los linfocitos T, en el contexto del CMH (Abbas, Lichtman, & Pillai, 2001). Existen tres subtipos de DC: mieloides (mDC), plasmacitoides (pDC) y células de Langerhans. Estos se caracterizan con base en su ubicación, marcadores de superficie y perfil de secreción de citocinas (Coleman & Wu, 2009). La vida media y supervivencia de las DC dependen de su subtipo y la ubicación anatómica (Merad & Manz, 2009); en general, las DC viven unas pocas semanas, y pueden ser reemplazadas mediante la proliferación de progenitores hematopoyéticos, monocitos o células residentes del tejido (Merad & Manz, 2009).

Se ha reportado que el VIH puede infectar directamente (infección cis) DC derivadas de monocitos por hasta 45 días (Popov, Chenine, Gruber, Li, & Ruprecht, 2005). Sin embargo, la eficiencia de esta infección es muy baja, por lo que solo un pequeño porcentaje de las DC circulantes son VIH positivas en individuos seropositivos (Wu & KewalRamani, 2006). Es de notar que el VIH-2 infecta con menor eficiencia las DC que el VIH-1 (Duvall et al., 2007), lo cual podría estar relacionado con la menor patogenicidad de éste.

Se ha evidenciado que dos de las proteínas del VIH, p17 y Nef, causan algunas disfunciones en las DC como la maduración sólo parcial de las pDC (Chaudhry et al., 2005; Fiorentini et al., 2008) o la inducción de un fenotipo migrante que facilitaría el desplazamiento a los nódulos linfáticos pero que carece de la expresión aumentada de moléculas como CD80, CD86 o CMH II (Chaudhry et al., 2005; Fiorentini et al., 2008), así que las DC podrían llegar a los nódulos linfáticos, pero no podrían iniciar respuestas eficientes contra el virus. También se ha publicado que las pDC pueden inhibir la replicación del VIH en los LT cuando son cocultivadas con estos (Groot, Van Capel, Kapsenberg, Berkhout, & De Jong, 2006; Meyers et al., 2007) y que el VIH puede destruir directamente las pDC (Meyers et al., 2007), además de que hay menos pDC circulantes en los individuos infectados (Müller-Trutwin & Hosmalin, 2005).

Aparte de la infección cis, está la infección trans, que involucra el tráfico de partículas virales completas a través de las DC para infectar los LT CD4⁺ activados, pasando por uniones llamadas sinapsis virológicas (Chang, Panorchan, Dobrowsky, Tseng, & Wirtz, 2007; McDonald et al., 2003; Wang, Janas, Olson, & Wu, 2007).

Uno de los marcadores de activación de las DC es el CD86, el cual participa en las señales coestimuladoras a través de la unión con CD28 ó CTLA-4, y su expresión es inducida durante el procesamiento y la presentación de antígenos (Wieder, 2003).

Las células NK

Son linfocitos granulares de gran tamaño con actividad citolítica. Se activan contra células que tienen una expresión disminuida de moléculas del CMH clase I, de ahí su importancia en respuestas antivirales y antitumorales. Se caracterizan por no expresar CD3 y ser CD16^{+/-}CD56^{+/-}; se clasifican en subpoblaciones de acuerdo a la expresión de estos dos marcadores: CD16⁺CD56^{dim}, CD16⁺CD56^{bright} y CD16⁻CD56^{bright}. Estas subpoblaciones difieren fenotípicamente en la expresión de varios receptores de células NK (NKR) y de quimiocinas y moléculas de adhesión, lo cual tiene como consecuencia una diferencia funcional. Por ejemplo, las células NK CD56^{bright} proliferan en gran medida en respuesta a la estimulación con IL-2, mientras que las CD56^{dim} no. La población más frecuente en sangre periférica es la CD16⁺CD56^{dim} que constituye un 90% de las células NK totales (Cooper, Fehniger, & Caligiuri, 2001). Recientemente se ha evidenciado que las células NK revisten gran importancia en la respuesta anti-VIH (Ward & Barker, 2008) Desde hace más de 20 años se sabe que las células NK de individuos infectados con el VIH exhiben anormalidades funcionales (Rook et al., 1983) que han sido atribuidas a una falla en los eventos posteriores a la unión entre la célula infectada y la NK (Katzman & Lederman, 1986). Estas anormalidades son reversibles in vitro después de cultivar las células NK por una noche o de la adición de IL-2 o IFN γ (Lederman, Ratnoff, Schacter, & Shoger, 1985; Rook et al., 1983), lo que sugiere que la disfunción de los LT CD4⁺ podría explicar este defecto.

En cuanto a los marcadores de activación de estas células, se encuentra el CD69, el cual es una lectina transmembranal tipo C que se expresa temprano en la activación linfocitaria y está involucrada en vías de señalización que regulan la respuesta inmune (Marzio, Mauël, & Betz-Corradin, 1999; Ward & Barker, 2008).

Las células NKT invariantes

Son linfocitos que expresan CD3 así como marcadores de células NK (CD16, CD56, CD161 y NKR). Reconocen glicolípidos presentados en el contexto de las moléculas de la familia CD1d. Además su TCR es invariante, formado por la cadena α con rearreglo V α 24J α 18 apareada a la cadena V β 11. Se clasifican en tres diferentes grupos: CD4⁺CD8⁻, CD8⁺CD4⁻ y CD4⁻CD8⁻. El primer grupo se caracteriza por secretar citoquinas del patrón Th2 como la IL-4 y la IL-10, por lo que se postula que actúan en el control de las reacciones autoinmunes mediadas por linfocitos T, mientras que los otros dos secretan citoquinas del patrón Th1 como TNF- α e IFN- γ , además de que producen perforinas en respuesta a la estimulación con IL-2 e IL-12 (Godfrey, MacDonald, Kronenberg, Smyth, & Kaer, 2004; Minton, 2012; Omán, Ugeles, Act, Ci, & Ontoya, 2006).

Las células T reguladoras (T_{reg})

Son LT CD4⁺ que cumplen una función importante en la regulación y modulación de la respuesta inmune. Su fenotipo ha sido controvertido; el criterio más ampliamente aceptado para caracterizar estas células es la expresión del factor de transcripción FOXP3. Otras evidencias sugieren que la alta expresión de la molécula CD25 y la baja de CD107 es otro marcador de esta población celular. El papel de las T_{reg} en la infección por el VIH es bastante controversial y se ha considerado que podría ser dual; por un lado puede ser negativo ya que las T_{reg} reducen la respuesta anti-VIH, y por el otro puede ser beneficioso gracias a la disminución de la activación inmune generalizada que como ya dijimos es el principal mecanismo de daño. Estudios previos indican que durante la fase crónica de la infección, hay una mayor frecuencia y un menor número absoluto de T_{reg} en comparación con controles sanos, lo que sugiere que estas células podrían estar

involucradas en la respuesta ineficiente anti-VIH-1 a pesar de ser también un blanco del virus (Presicce et al., 2011). Uno de los principales mecanismos por los cuales las T_{reg} regulan la respuesta inmune es la inhibición de la activación linfocitaria a través de la señalización mediada por CTLA-4 y CD28; es por esto que la expresión de CTLA-4 es un indicador de la actividad de estas células (Vignali, Collison, & Workman, 2008). También existen otras moléculas asociadas a la actividad reguladora como CD39,

Planteamiento del Problema

Se sabe que los individuos controladores del VIH-1 exhiben mecanismos que evitan la replicación del virus en diferentes fases de su ciclo de vida. Entre éstos se destacan los polimorfismos en correceptores virales, células inmunes con características particulares y factores solubles con actividad anti-VIH-1 (Taborda-Vanegas, Zapata, & Rugeles, 2011). Sin embargo, las evidencias de cuál es el estado de activación inmune de estos individuos son pocas hasta la fecha y no involucran un seguimiento en el tiempo ni una gran potencia estadística. Por esta razón se hace necesaria una caracterización más completa de estos individuos que incluya la evaluación de los niveles de activación inmune para poder determinar si están directamente relacionados con la replicación viral.

Con base en estos antecedentes, en este trabajo se determinó la frecuencia y el estado de activación de mDC, pDC, células NK, células iNKT, LT $CD4^+$, $CD8^+$ y células T_{reg} en individuos controladores del VIH-1, con el fin de avanzar en la caracterización de estos pacientes. Cabe anotar que todo esto será comparado con mediciones posteriores, que no hacen parte de este trabajo de grado.

OBJETIVO

Comparar la frecuencia de diferentes poblaciones leucocitarias y el porcentaje de las células activadas en estas, entre individuos controladores del VIH-1, seronegativos y seropositivos progresores.

MÉTODOS:

Población de estudio

Los pacientes que se invitaron a participar en este estudio fueron aquellos incluidos en las bases de datos de estudios previos de nuestro laboratorio y de aquellos que se captaron en las IPS y fundaciones de apoyo para los individuos infectados. Todos los datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio que puedan ser de interés en el análisis de los resultados fueron consignados en una base de datos.

Controladores del VIH-1: 8 individuos

Criterios de inclusión: Individuos mayores de 18 años, con diagnóstico de VIH-1⁺ al menos 1 año antes, que no estén recibiendo terapia antirretroviral y que presenten carga viral de VIH-1 menor a 2000 copias/mL, en dos determinaciones independientes durante el último año.

Criterios de exclusión: Individuos con hemoglobina ≤ 8.0 g/dl; individuos con recuento de neutrófilos $\leq 1,000/\text{mm}^3$; individuos que estén recibiendo algún tratamiento inmunosupresor; mujeres en embarazo o lactancia; individuos con cáncer o con alguna infección o enfermedad que requieran hospitalización.

VIH seropositivos progresores: 8 individuos

Criterios de inclusión: Individuos mayores de 18 años con un diagnóstico de infección por VIH-1 de más de seis meses, que presenten carga viral entre 10.000 y 50.000 copias de RNA viral/mL y un recuento de LT CD4⁺ mayor a 350 células/ μL y que todavía no hayan recibido tratamiento antirretroviral.

Criterios de exclusión: iguales a los del grupo 1

VIH seronegativos: 12 individuos

Criterios de inclusión: Individuos mayores de 18 años sin infección por VIH-1, confirmado por una prueba de ELISA de cuarta generación para detectar anticuerpos anti-VIH-1 y antígenos virales.

Criterios de exclusión: iguales a los del grupo 1

Todos los individuos incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado, aprobado por el comité de bioética de la Sede de Investigación Universitaria de la Universidad de Antioquia, elaborado de acuerdo a la legislación colombiana, resolución 00843 de 1993.

Muestras

La toma de la muestra fue llevada a cabo por un profesional de la salud. De cada individuo se extrajeron 10 mL de sangre periférica en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Carga viral

Las muestras fueron remitidas al Laboratorio Clínico de la Congregación Mariana para la determinación de la carga viral. Allí, se utilizó el estuche comercial “Amplicor PCR assay” (Roche, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Recuento de leucocitos y diferencial

El recuento de leucocitos totales se realizó en cámara de Neubauer, previa lisis de eritrocitos con ácido acético 2%. El recuento diferencial de leucocitos se hizo por medio de la identificación morfológica de las células en un extendido de sangre periférica sometido a la coloración de Wright.

Inmunofenotipificación de leucocitos.

La frecuencia en sangre periférica de las diferentes subpoblaciones leucocitarias, así como la expresión relativa de moléculas de activación se determinó por citometría de flujo. Para esto se utilizaron 150 μ L de sangre periférica anticoagulada para cada subpoblación y se adicionarán los siguientes anticuerpos dependiendo de la subpoblación a evaluar: anti-CD3, CD4, CD8, CD38, CD25, CD127, FoxP3, CD16, CD56, CD69, 6B11, CD86, Linaje, CD11c, HLA-DR y CD123 (Becton Dickinson, USA). Se hizo una incubación por 25 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron dos veces con 2 mL de solución buffer fosfato (PBS). Se adicionó 1 mL de solución de lisis de eritrocitos (Becton Dickinson, USA). Posteriormente se centrifugaron y se fijaron las muestras con 200 μ L de paraformaldehído (2% p/v). Se almacenó la muestra a 4°C hasta la adquisición en el citómetro de flujo (FACS CANTO II de Becton Dickinson). Los números absolutos se calcularán con base en el recuento absoluto y el diferencial.

Análisis de datos

Para comparar los datos de los controladores vs individuos seropositivos progresores o vs los controles sanos se realizó un test no paramétrico (Mann-Whitney *U* test). Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Los análisis de correlación se realizaron empleando el coeficiente de correlación de Spearman. Los análisis estadísticos se realizarán utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.0.

RESULTADOS:

Porcentaje de células en sangre periférica obtenido a partir de tinción diferencial.

A partir de la tinción diferencial con el colorante de Wright, se encontró que los controladores presentan un menor porcentaje de monocitos que los seronegativos y los progresores (figura 1). En cuanto al resto de las poblaciones de leucocitos no se hallaron diferencias

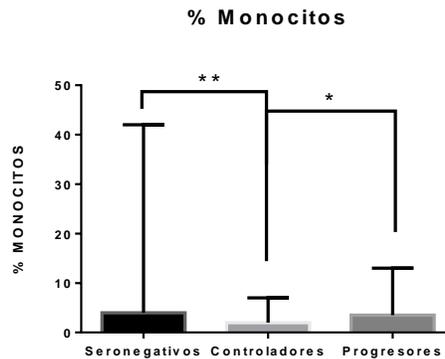


Figura 1. Porcentaje de monocitos obtenido a partir del recuento de leucocitos teñidos diferencialmente con colorante de Wright. Un asterisco representa un $p < 0,05$, dos asteriscos un $p < 0,01$ y tres asteriscos un $p < 0,001$.

Porcentaje y número absoluto de subpoblaciones celulares

Se observó un aumento en el porcentaje (figura 2) y número absoluto (no mostrado) de los LT $CD3^+$ en los individuos infectados en comparación con los seronegativos,

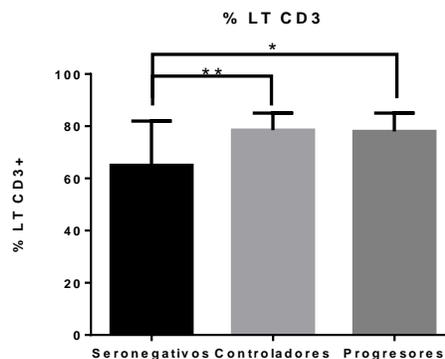


Figura 2. Porcentaje de LT $CD3^+$ obtenido por citometría de flujo. Un asterisco representa un $p < 0,05$, dos asteriscos un $p < 0,01$ y tres asteriscos un $p < 0,001$.

Hubo una mayor frecuencia de LT CD4⁺ en individuos seronegativos en comparación con individuos infectados (figura 3a). Los individuos progresores exhibieron una mayor frecuencia de LT CD4⁺ activados que los controladores y los seronegativos (figura 3b). Hubo un aumento de LT CD8⁺ en individuos infectados, y de las células activadas (figura 3c y d), en comparación con los seronegativos.

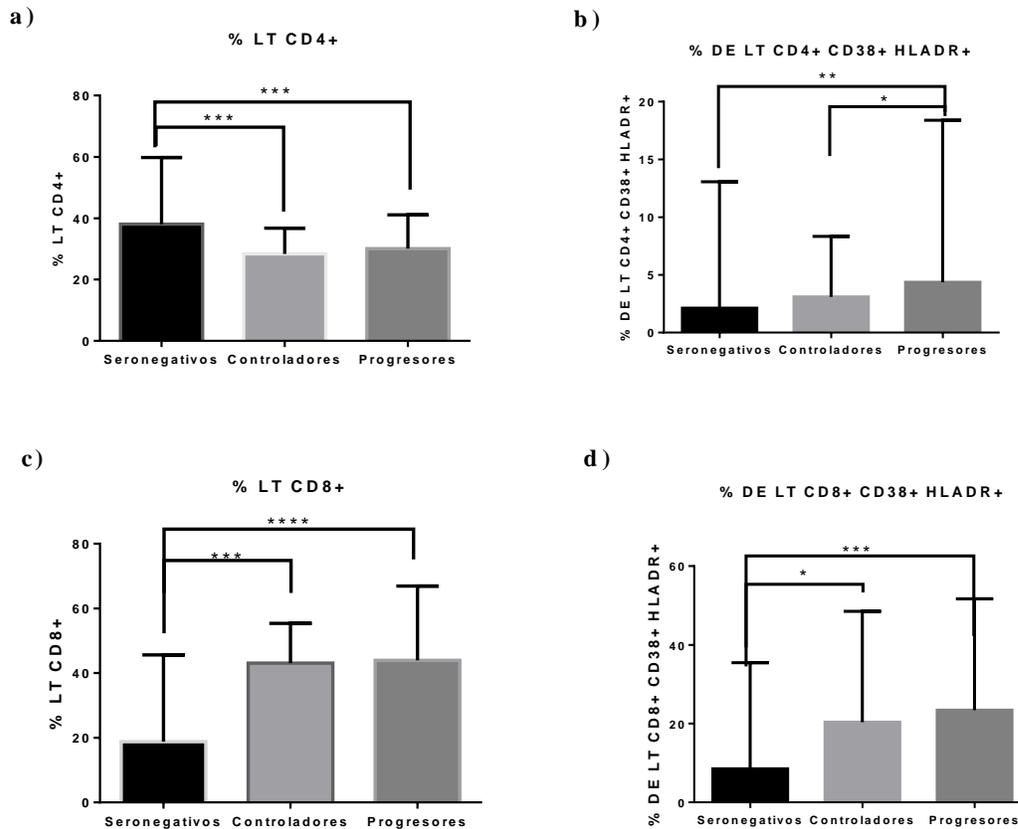


Figura 3. Frecuencias de LT obtenidas por citometría de flujo. a) LT CD4⁺, b) LT CD4⁺ activados (CD38⁺HLA-DR⁺), c) LT CD8⁺, d) LT CD8⁺ activados (CD38⁺HLA-DR⁺). Un asterisco representa un p<0,05, dos asteriscos un p<0,01 y tres asteriscos un p<0.001.

Se evidenció una mayor frecuencia (figura 4) y un mayor número de células NK CD16⁻CD56^{high} (no mostrado) en los individuos controladores en comparación con los progresores.

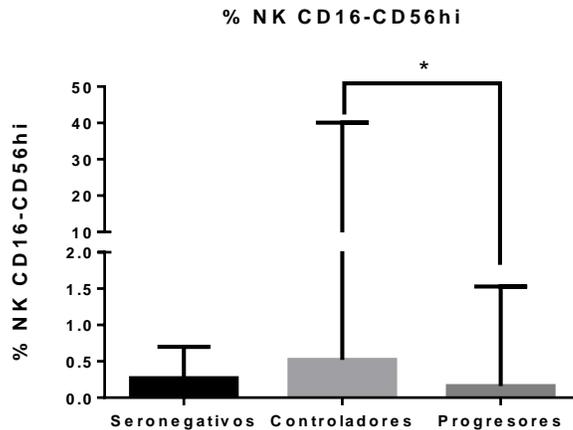


Figura 4. Porcentaje de células NK CD16⁻CD56^{high} obtenido por citometría de flujo. Un asterisco representa un p<0,05, dos asteriscos un p<0,01 y tres asteriscos un p<0.001.

También se observó un aumento en la frecuencia (figura 5) y número (no mostrado) de células NK CD16⁺CD56⁻ en los individuos progresores, en comparación con los controladores y los seronegativos.

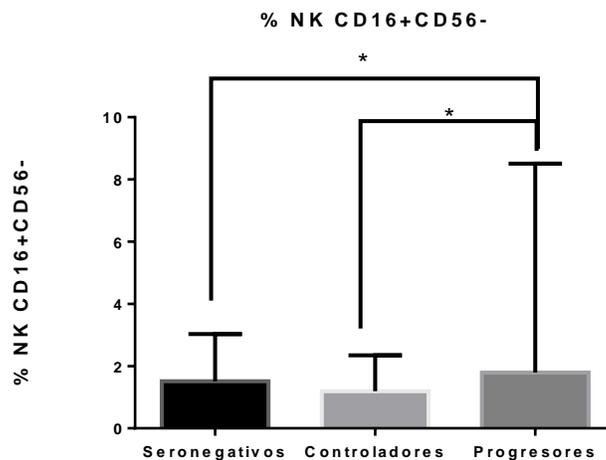


Figura 5. Porcentaje de células NK CD16⁺CD56⁻ obtenido por citometría de flujo. Un asterisco representa un p<0,05, dos asteriscos un p<0,01 y tres asteriscos un p<0.001.

En cuanto a las células T_{reg} , se encontró que no hubo diferencias entre individuos controladores y progresores, en cuanto a su frecuencia, pero sí en cuanto al número absoluto (figura 6a y b), siendo mayor en los individuos controladores respecto a los progresores. Se obtuvieron resultados similares para células T_{reg} activadas (figura 6c y d).

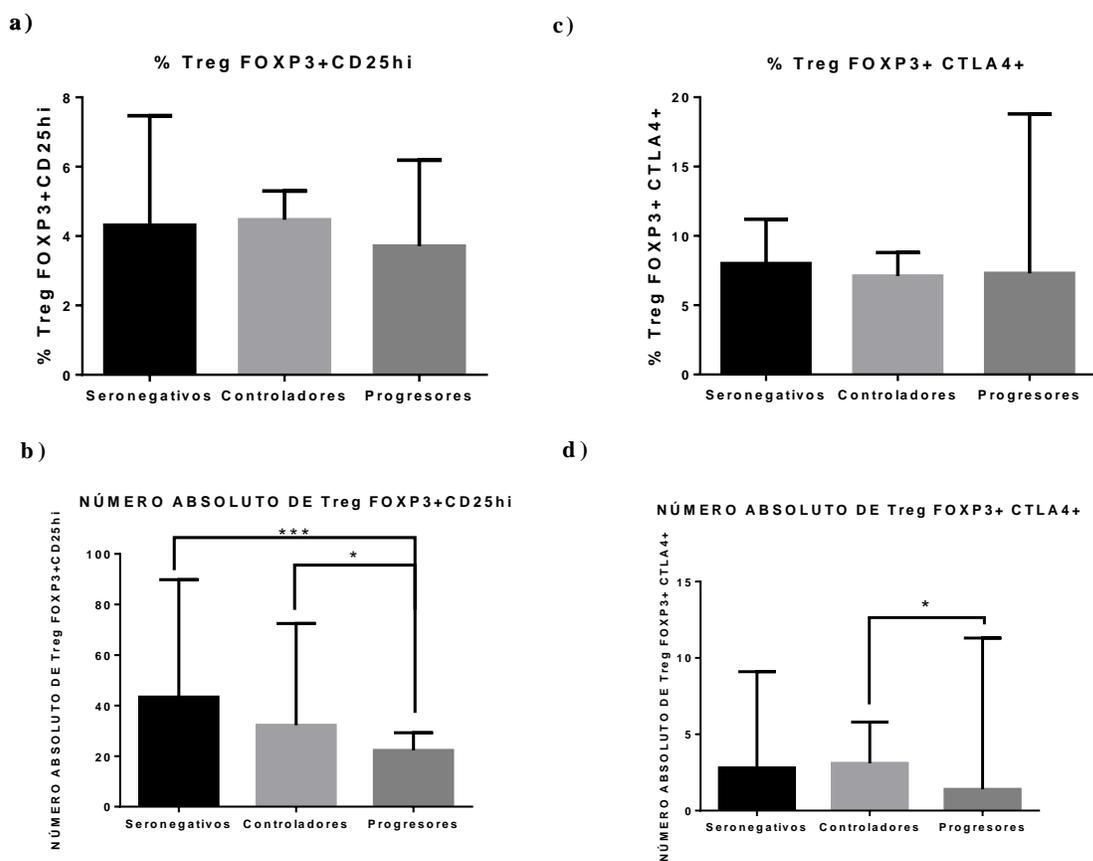


Figura 6. Porcentaje y número absoluto de T_{reg} . a) porcentaje de T_{reg} FOXP3⁺CD25^{high}, b) número absoluto de T_{reg} FOXP3⁺CTLA-4⁺, c) porcentaje de T_{reg} FOXP3⁺CTLA-4⁺, b) número absoluto de T_{reg} FOXP3⁺CTLA-4⁺. Un asterisco representa un $p < 0,05$, dos asteriscos un $p < 0,01$ y tres asteriscos un $p < 0.001$.

En los controladores se encontró una correlación de la carga viral con el porcentaje de T_{reg} FOXP3⁺ y con el número absoluto de T_{reg} activadas.

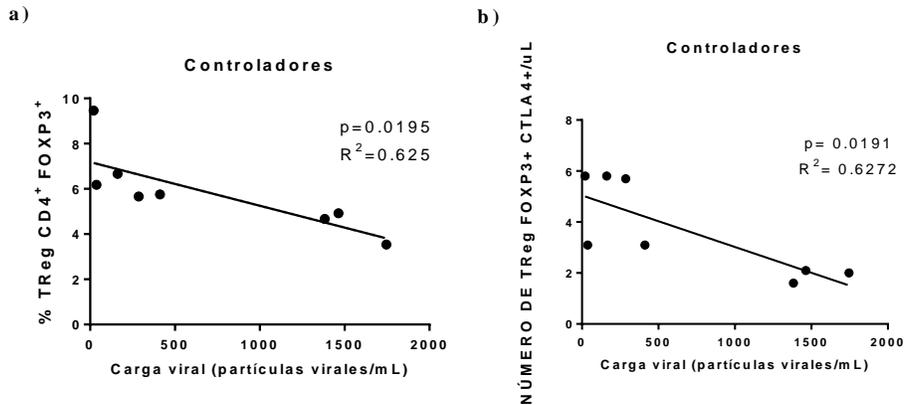


Figura 7. Correlación entre la carga viral y a) el porcentaje de T_{reg} CD4⁺FOXP3⁺ y b) el número de T_{reg} activadas (CTLA-4⁺) en individuos controladores. Un asterisco representa un p<0,05, dos asteriscos un p<0,01 y tres asteriscos un p<0.001.

En los progresores se encontró una correlación de la carga viral con el porcentaje de T_{reg} FOXP3⁺ y una tendencia al aumento de los LT CD4⁺ activados a mayor carga viral (figura 8a y b).

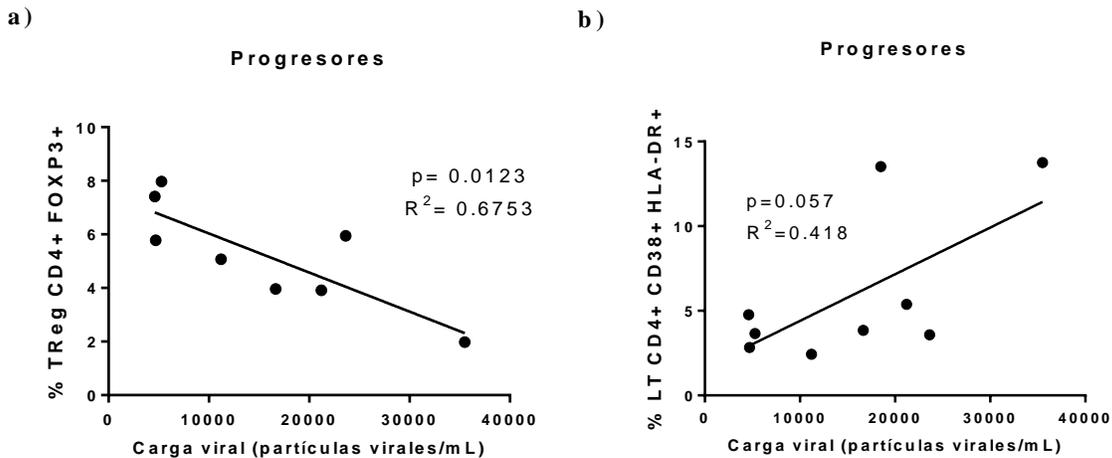


Figura 8. . Correlación entre la carga viral y a) el porcentaje de T_{reg} CD4⁺FOXP3⁺ y b) el número de LT CD4⁺ activados (CD38⁺HLA-DR⁺) en individuos progresores. Un asterisco representa un p<0,05, dos asteriscos un p<0,01 y tres asteriscos un p<0.001.

DISCUSIÓN

A partir del recuento diferencial de linfocitos se encontró que hay una frecuencia menor de monocitos en los individuos controladores respecto a los seronegativos y progresores. Dado que los monocitos son los progenitores de macrófagos y células dendríticas, esto podría significar una tasa acelerada de diferenciación hacia células presentadoras de antígenos en los tejidos, lo cual conllevaría una mayor activación de células específicas contra el virus. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario estudiar profundamente el sistema fagocítico mononuclear de individuos controladores, tanto en sangre periférica como en tejidos linfoides y mucosas, evaluando no sólo las frecuencias de las poblaciones sino también su funcionalidad.

Como era de esperar, la infección se asocia con un número menor de LT CD4⁺. Los individuos controladores presentan una frecuencia de LT CD4⁺ indistinguible de la de los progresores. Esto puede explicarse porque el criterio de inclusión de estos últimos (LT CD4⁺>350/ μ L y carga viral>2000 copias/mL) supone un sesgo, ya que los individuos no se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad. La inclusión de pacientes con menos de 350 LT CD4⁺/ μ L no es posible, pues la mayoría de estos individuos se encuentran en terapia antirretroviral.

Por otra parte, en concordancia con reportes previos, se evidenció que existe una menor frecuencia de LT CD4⁺ activados en los individuos controladores y seronegativos respecto a los progresores; sin embargo no hubo diferencia significativa entre controladores y seronegativos, contrario a estudios anteriores que reportan una frecuencia más elevada en los controladores. Lo anterior podría evidenciar un menor deterioro del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal en los individuos controladores, que no permite la translocación de productos microbianos a la circulación sistémica.

En cuanto a los LT CD8⁺, los resultados hallados son similares a los reportados previamente en la literatura (Feinberg & Ahmed, 2012). La infección por el VIH se asocia con la expansión de los LT CD8⁺, tanto de la población general como de las células activadas. Este aumento de LT CD8⁺ es tal que se ve reflejado en el aumento de los LT CD3⁺ en individuos infectados, a pesar de la disminución de los LT CD4⁺. No obstante, no se encontraron diferencias para los parámetros mencionados entre individuos controladores y progresores. Si bien la cantidad de LT CD8⁺ es similar en estos grupos, estudios anteriores muestran que su actividad citotóxica es mayor en estos últimos (Saag & Deeks, 2010).

En forma interesante se encontró los individuos controladores presentan una frecuencia mayor de células NK CD16⁻CD56⁺ respecto a los individuos progresores, resultado contrario a lo reportado previamente (Berger & Alter, 2011). Esta subpoblación se caracteriza por una alta producción de citocinas, por producir IFN- γ en respuesta a concentraciones picomolares de IL-2 y por expresar moléculas que permiten la localización en tejidos como CD62L y CCR7. De ahí que sería interesante confirmar esta diferencia aumentando el tamaño muestral y posteriormente realizar estudios funcionales que determinen la existencia de una relación entre esta subpoblación celular y los LT que sea relevante en el control de la replicación viral.

La expansión de las células NK CD16⁺CD56⁻ ha sido asociada previamente con la progresión al sida. Confirmando esto, se encontró que los individuos controladores son indistinguibles de los seronegativos en cuanto a la frecuencia de esta subpoblación, y que en ambos grupos esta frecuencia es menor que la encontrada en individuos progresores. Ahora bien, esta subpoblación celular es casi inexistente en individuos sanos y las investigaciones previas reportan una gran disfuncionalidad en la producción de citocinas y en la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos. Estudios de la interacción de esta subpoblación con otras células de la inmunidad y con el VIH son necesarios para caracterizar mejor su relación con la progresión al sida.

En cuanto a las células T_{reg} , reportes previos muestran una frecuencia igual o menor de esta población en individuos controladores (Chevalier & Weiss, 2012). En este estudio no se encontraron diferencias en cuanto a la frecuencia, mas sí en cuanto al número absoluto de T_{reg} FOXP3⁺CD25^{high} y de T_{reg} activadas, siendo este más alto en los individuos controladores respecto a los progresores. Lo anterior podría indicar que las células T_{reg} median el control de la replicación viral disminuyendo el número de células susceptibles a la infección.

Además, se halló una correlación negativa entre la carga viral y el porcentaje de células T_{reg} en sangre periférica. Reportes previos indican que la infección por el VIH induce la conversión de $LT\ CD4^+$ convencionales en T_{reg} , así que la disminución de estas células en la circulación sistémica asociada a la mayor carga viral puede deberse a su reclutamiento en tejidos linfoides y mucosas, que es donde ejercen su función reguladora.

En conclusión, se encontró que las células NK $CD16^-CD56^{high}$ y las células T_{reg} se asocian con el control de la replicación viral y las células NK $CD16^+Cd56^-$ con la progresión al sida. Estudios posteriores con un mayor tamaño muestral son necesarios para confirmar estas diferencias y para realizar investigaciones que involucren la funcionalidad y respuesta anti-VIH.

REFERENCIAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2001). Antigen Presentation to Lymphocytes. *Life Sciences*, 1–5. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1002/9780470015902.a0001227.pub2>
- Ascher, M. (1988). AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. *Clinical and experimental*, 165–167. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1541594/>
- Bailey, J. R., O'Connell, K., Yang, H.-C., Han, Y., Xu, J., Jilek, B., Williams, T. M., et al. (2008). Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 from a Patient Who Developed AIDS to an Elite Suppressor. *Journal of Virology*, 82(15), 7395–7410. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18495769>
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., et al. (1983). Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS). *Science*, 220(4599), 868–871.
- Berger, C. T., & Alter, G. (2011). Natural killer cells in spontaneous control of HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS*, 6(3), 208–13. doi:10.1097/COH.0b013e3283457798
- Brenchley, J. M. (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Retrovirology*, 3(Suppl 1), S98. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17115046
- Brenchley, J. M., Price, D. a, & Douek, D. C. (2006). HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology*, 7(3), 235–9. doi:10.1038/ni1316
- Broussard, S. R., Staprans, S. I., White, R., Whitehead, E. M., Feinberg, M. B., & Allan, J. S. (2001). Simian Immunodeficiency Virus Replicates to High Levels in Naturally Infected African Green Monkeys without Inducing Immunologic or Neurologic Disease . *Journal of Virology* , 75 (5) , 2262–2275. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/75/5/2262.abstract>
- Cao, Y., Limo, Q., Linqi, Z., Jeffrey, S., & Ho, D. (1995). VIROLOGIC AND IMMUNOLOGIC CHARACTERIZATION OF LONG-TERM SURVIVORS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 INFECTION. *Infection*, 332(4).
- Chakrabarti, L. A., Lewin, S. R., Zhang, L., Gettie, A., Luckay, A., Martin, L. N., Skulsky, E., et al. (2000). Normal T-Cell Turnover in Sooty Mangabeys

Harboring Active Simian Immunodeficiency Virus Infection . *Journal of Virology* , 74 (3) , 1209–1223. Retrieved from <http://jvi.asm.org/content/74/3/1209.abstract>

- Chang, M. I., Panorchan, P., Dobrowsky, T. M., Tseng, Y., & Wirtz, D. (2007). Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *Journal of Virology*, 79(20), 11352–62. doi:10.1128/JVI.01081-07
- Chaudhry, A., Das, S. R., Hussain, A., Mayor, S., George, A., Bal, V., Jameel, S., et al. (2005). The Nef protein of HIV-1 induces loss of cell surface costimulatory molecules CD80 and CD86 in APCs. *The Journal of Immunology*, 175(7), 4566–4574. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16177101>
- Chevalier, M. F., & Weiss, L. (2012). The split personality of regulatory T cells in HIV infection. *Blood* . doi:10.1182/blood-2012-07-409755
- Clavel, F., Guyader, M., Guétard, D., Sallé, M., Montagnier, L., & Allizon, M. (1986). Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature*, 324, 691–695.
- Clerici, M., Stocks, N. I., Zajac, R. A., Boswell, R. N., Lucey, D. R., Via, C. S., & Shearer, G. M. (1989). Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *Journal of Clinical Investigation*, 84(6), 1892–1899. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=304069&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- Coleman, C. M., & Wu, L. (2009). HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology*, 6(1), 51. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2697150&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11), 633–640. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471490601020609>
- Deeks, S. G., Kitchen, C. M. R., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narváez, A. B., Hunt, P., et al. (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load . *Blood* , 104 (4) , 942–947. Retrieved from <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/104/4/942.abstract>
- Douek, D. C., Brenchley, J. M., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Okamoto, Y., Casazza, J. P., et al. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T

cells. *Nature*, 417(6884), 95–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986671>

- Duvall, M. G., Loré, K., Blaak, H., Ambrozak, D. a, Adams, W. C., Santos, K., Geldmacher, C., et al. (2007). Dendritic cells are less susceptible to human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infection than to HIV-1 infection. *Journal of virology*, 81(24), 13486–98. doi:10.1128/JVI.00976-07
- Feinberg, M. B., & Ahmed, R. (2012). Born this way? Understanding the immunological basis of effective HIV control. *Nature immunology*, 13(7), 632–634.
- Fiorentini, S., Riboldi, E., Facchetti, F., Avolio, M., Fabbri, M., Tosti, G., Becker, P. D., et al. (2008). HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(10), 3867–3872. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268771&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Giorgi, J. V, Hultin, L. E., McKeating, J. A., Johnson, T. D., Owens, B., Jacobson, L. P., Shih, R., et al. (1999). Shorter Survival in Advanced Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Is More Closely Associated with T Lymphocyte Activation than with Plasma Virus Burden or Virus Chemokine Coreceptor Usage . *Journal of Infectious Diseases* , 179 (4), 859–870. Retrieved from <http://jid.oxfordjournals.org/content/179/4/859.abstract>
- Giorgi, J. V, Lyles, R. H., Matud, J. L., Yamashita, T. E., Mellors, J. W., Hultin, L. E., Jamieson, B. D., et al. (2002). Predictive Value of Immunologic and Virologic Markers After Long or Short Duration of HIV-1 Infection. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 29(4). Retrieved from http://journals.lww.com/jaids/Fulltext/2002/04010/Predictive_Value_of_Immunologic_and_Virologic.4.aspx
- Godfrey, D. I., MacDonald, H. R., Kronenberg, M., Smyth, M. J., & Kaer, L. Van. (2004). NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*, 4(3), 231–237. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nri1309>
- Groot, F., Van Capel, T. M. M., Kapsenberg, M. L., Berkhout, B., & De Jong, E. C. (2006). Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood*, 108(6), 1957–1964. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16705088>
- Grossman, Z., Bentwich, Z., & Herberman, R. B. (1993). From HIV Infection to AIDS: Are the Manifestations of Effective Immune Resistance Misinterpreted?

Clinical Immunology and Immunopathology, 69(2), 123–135. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0090122983711608>

- Grossman, Z., & Herberman, R. B. (1997). T-cell homeostasis in HIV infection is neither failing nor blind: Modified cell counts reflect an adaptive response of the host. *Nature Medicine*, 3(5), 486–490.
- Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A. E., Victorino, R. M. M., & Paul, W. E. (2002). CD4+ T-cell depletion in HIV infection: Are we closer to understanding the cause? *Nat Med*, 8(4), 319–323. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nm0402-319>
- Haynes, B. F., Pantaleo, G., & Fauci, a S. (1996). Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science (New York, N. Y.)*, 271(5247), 324–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8553066>
- Hazenberg, M. D., Hamann, D., Schuitemaker, H., & Miedema, F. (2000). T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat Immunol*, 1(4), 285–289. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/79724>
- Hellerstein, M. (2002). HIV tropism and CD4+ T-cell depletion. *Nat Med*, 8(6), 537–538. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nm0602-537b>
- Ho, D., Neumann, A., Perelson, A., Chen, W., Leonard, J. M., & Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 123–126. Retrieved from http://wolynes.ucsd.edu/Wolynes_Papers/HIV2.pdf
- Hutchinson, J. F. (2001). The biology and evolution of HIV. *Annu. Rev. Anthropol.*, 85–108.
- Katzman, M., & Lederman, M. M. (1986). Defective postbinding lysis underlies the impaired natural killer activity in factor VIII-treated, human T lymphotropic virus type III seropositive hemophiliacs. *Journal of Clinical Investigation*, 77(4), 1057–1062.
- Kestens, L., Vanham, G., Vereecken, C., Vandenbruaene, M., & Vercauteren, G. (1994). Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4 + CD45RO + T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clinical experimental Immunology*, 436–441.
- Kulkarni, P. S., Butera, S. T., & Duerr, A. C. (2003). Resistance to HIV-1 infection: lessons learned from studies of highly exposed persistently seronegative (HEPS) individuals. *Aids Reviews*, 5(2), 87–103. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12876898>

- Lederman, M. M., Ratnoff, O. D., Schacter, B., & Shoger, T. (1985). Impaired cell-mediated immunity in hemophilia. II. Persistence of subclinical immunodeficiency and enhancement of natural killer activity by lymphokines. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 106(2), 197–204. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/2410523>
- Lempicki, R. A., Kovacs, J. A., Baseler, M. W., Adelsberger, J. W., Dewar, R. L., Natarajan, V., Bosche, M. C., et al. (2000). Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4+ and CD8+ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13778–13783. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/97/25/13778.abstract>
- Liu, Z., Cumberland, W. G., Hultin, L. E., Prince, H. E., Detels, R., & Giorgi, J. V. (1997). Elevated CD38 Antigen Expression on CD8+ T Cells Is a Stronger Marker for the Risk of Chronic HIV Disease Progression to AIDS and Death in the Multicenter AIDS Cohort Study Than CD4+ Cell Count, Soluble Immune Activation Markers, or Combinations of HLA-DR. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 16(2). Retrieved from http://journals.lww.com/jaids/Fulltext/1997/10010/Elevated_CD38_Antigen_Expression_on_CD8__T_Cells.3.aspx
- Margolick, J. B., Muñoz, A., Donnenberg, A. D., Park, L. P., Galai, N., Giorgi, J. V., O’Gorman, M. R. G., et al. (1995). Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. *Nature Medicine*, 1(7), 674–680. doi:10.1038/nm0795-674
- Marzio, R., Mauël, J., & Betz-Corradin, S. (1999). CD69 and Regulation of the Immune Function. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 21(3), 565–582. doi:10.3109/08923979909007126
- Masur, H., Ognibene, F. P., Yarchoan, R., Shelhamer, J. H., Baird, B. F., Travis, W., Suffredini, A. F., et al. (1989). CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Annals of Internal Medicine*, 111(3), 223–231. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2546472
- McCune, J. M. (2001). The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature*, 410(6831), 974–979. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/35073648>
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S. M., KewalRamani, V. N., Unutmaz, D., & Hope, T. J. (2003). Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science*, 300(5623), 1295–1297. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730499>

- McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., & Haynes, B. F. (2010). The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature Reviews Immunology*, *10*(1), 11–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20010788>
- Merad, M., & Manz, M. G. (2009). Dendritic cell homeostasis. *Blood*, *113*(15), 3418–3427. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2668851&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Meyers, J. H., Justement, J. S., Hallahan, C. W., Blair, E. T., Sun, Y. A., O’Shea, M. A., Roby, G., et al. (2007). Impact of HIV on Cell Survival and Antiviral Activity of Plasmacytoid Dendritic Cells. (P. Sommer, Ed.) *PLoS ONE*, *2*(5), 10. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1866176&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Migueles, S. A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Sabbaghian, M. S., Rabin, R., Hallahan, C. W., Van Baarle, D., et al. (2002). HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature Immunology*, *3*(11), 1061–1068. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12368910>
- Minton, K. (2012). Natural killer T cells: Defining iNKT cell subpopulations. *Nat Rev Immunol*, *12*(3), 151. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nri3184>
- Miura, T., Brockman, M. a, Brumme, C. J., Brumme, Z. L., Carlson, J. M., Pereyra, F., Trocha, A., et al. (2008). Genetic characterization of human immunodeficiency virus type 1 in elite controllers: lack of gross genetic defects or common amino acid changes. *Journal of virology*, *82*(17), 8422–30. doi:10.1128/JVI.00535-08
- Miura, T., Brumme, Z. L., Brockman, M. A., Rosato, P., Sela, J., Brumme, C. J., Pereyra, F., et al. (2010). Impaired Replication Capacity of Acute/Early Viruses in Persons Who Become HIV Controllers. *Journal of Virology*, *84*(15), 7581–7591. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2897600&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
- Moir, S., Chun, T.-W., & Fauci, A. S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annual review of pathology*, *6*, 223–48. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130254
- Müller-Trutwin, M., & Hosmalin, A. (2005). Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. *Immunology and Cell Biology*, *83*(5), 578–583. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174110>

- Omán, A. L. R., Ugeles, M. A. T. E. R., Act, B., Ci, D. S., & Ontoya, C. A. J. U. M. (2006). Papel de las células NKT invariantes en la respuesta inmune anti-viral Colombia Médica, 37, 159–168.
- Orendi, J. M., Bloem, A. C., Borleffs, J. C. C., Wijnholds, F.-J., De Vos, N. M., Nottet, H. S. L. M., Visser, M. R., et al. (1998). Activation and Cell Cycle Antigens in CD4+ and CD8+ T Cells Correlate with Plasma Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) RNA Level in HIV-1 Infection . *Journal of Infectious Diseases* , 178 (5) , 1279–1287. Retrieved from <http://jid.oxfordjournals.org/content/178/5/1279.abstract>
- Ostrowski, S. R. (2010). Immune activation in chronic HIV infection. *Danish medical bulletin*, 57(3), B4122. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3413683&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
- Piacentini, L., Fenizia, C., Naddeo, V., & Clerici, M. (2008). Not just sheer luck! Immune correlates of protection against HIV-1 infection. *Vaccine*, 26(24), 3002–7. doi:10.1016/j.vaccine.2007.11.062
- Popov, S., Chenine, A.-L., Gruber, A., Li, P.-L., & Ruprecht, R. M. (2005). Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells. *Journal of Virology*, 79(1), 602–608. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15596853
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., & Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science (New York, N. Y.)*, 224(4648), 497–500. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6200935>
- Presicce, P., Orsborn, K., King, E., Pratt, J., Fichtenbaum, C. J., & Chougnet, C. A. (2011). Frequency of Circulating Regulatory T Cells Increases during Chronic HIV Infection and Is Largely Controlled by Highly Active Antiretroviral Therapy. *PLoS ONE*, 6(12), e28118. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0028118>
- Roederer, M., Dubs, J. G., Anderson, M. T., Raju, P. A., & Herzenberg, L. A. (1995). CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *Journal of Clinical Investigation*, 95(5), 2061–2066. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7738173>
- Rook, A. H., Masur, H., Lane, H. C., Frederick, W., Kasahara, T., Macher, A. M., Djeu, J. Y., et al. (1983). Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 72(1), 398–403.

- Saag, M., & Deeks, S. G. (2010). How Do HIV Elite Controllers Do What They Do? *Clinical Infectious Diseases*, 51 (2), 239–241. doi:10.1086/653678
- Sachsenberg, N., Perelson, A. S., Yerly, S., Schockmel, G. A., Leduc, D., Hirschel, B., & Perrin, L. (1998). Turnover of CD4+ and CD8+ T Lymphocytes in HIV-1 Infection as Measured by Ki-67 Antigen . *The Journal of Experimental Medicine*, 187 (8), 1295–1303. Retrieved from <http://jem.rupress.org/content/187/8/1295.abstract>
- Sieg, S. F., Bazdar, D. A., Harding, C. V., & Lederman, M. M. (2001). Differential expression of interleukin-2 and gamma interferon in human immunodeficiency virus disease. *Journal of Virology*, 75(20), 9983–9985.
- Silvestri, G., Sodora, D. L., Koup, R. A., Paiardini, M., O’Neil, S. P., McClure, H. M., Staprans, S. I., et al. (2003). Nonpathogenic SIV Infection of Sooty Mangabeys Is Characterized by Limited Bystander Immunopathology Despite Chronic High-Level Viremia. *Immunity*, 18(3), 441–452. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761303000608>
- Sumpter, B., Dunham, R., Gordon, S., Engram, J., Hennessy, M., Kinter, A., Paiardini, M., et al. (2007). Correlates of Preserved CD4+ T Cell Homeostasis during Natural, Nonpathogenic Simian Immunodeficiency Virus Infection of Sooty Mangabeys: Implications for AIDS Pathogenesis . *The Journal of Immunology*, 178 (3), 1680–1691. Retrieved from <http://jimmunol.org/content/178/3/1680.abstract>
- Thèze, J., Chakrabarti, L. A., Vingert, B., Porichis, F., & Kaufmann, D. E. (2011). HIV controllers: a multifactorial phenotype of spontaneous viral suppression. *Clinical immunology Orlando Fla*, 141(1), 15–30. doi:10.1016/j.clim.2011.07.007
- Vignali, D. A. A., Collison, L. W., & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7), 523–532. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nri2343>
- Walker, B. D. (2007). Elite Control of HIV Infection : Implications for Vaccines and Treatments. *Topics in HIV Medicine*, 15(4), 134–136.
- Wang, J., Janas, A. M., Olson, W. J., & Wu, L. (2007). Functionally Distinct Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Mediated by Immature and Mature Dendritic Cells. *Society*, 81(17), 8933–8943. doi:10.1128/JVI.00878-07
- Ward, J., & Barker, E. (2008). Role of Natural Killer Cells in HIV Pathogenesis. *HIV Medicine*, 46, 44–50.

Wei, X., Ghosh, S. K., Taylor, M. E., Johnson, V. A., Emini, E. A., Deutsch, P., Lifson, J. D., et al. (1995). Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature*, 373(6510), 117–122. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/373117a0>

Wieder, E. (2003). Dendritic Cells : A Basic Review. *International society for cellular therapy*. Retrieved from http://www.celltherapysociety.org/files/PDF/Resources/OnLine_Dendritic_Education_Brochure.pdf

Wu, L., & KewalRamani, V. N. (2006). Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature Reviews Immunology*, 6(11), 859–868. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1796806&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>