

DEPARTAMENTO INMUNOLOGÍA

ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN INMUNOLÓGICA TRAS
LA ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS
ANTIRRETROVIRALES DE GRAN ACTIVIDAD EN NIÑOS
INFECTADOS POR EL VIH-1

RAFAEL SIRERA PÉREZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 23 de desembre de 2002 davant un tribunal format per:

- Dr. D. Rafael Fernández-Delgado Cerda
- Dr. D. Juan Cordoba Cortijo
- Dra. Dña. Concepción Tuset Ruiz
- Dr. D. Guillermo Saez Tormo
- Dra. Dña. Dolores Planelles Silvestre

Va ser dirigida per:

Prof. Dra. Dña. Elena Carmona Iglesias

©Copyright: Servei de Publicacions
Rafael Sirera Pérez

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5646-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Estudio de la recuperación inmunológica tras la administración de tratamientos antirretrovirales de gran actividad, en niños infectados verticalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

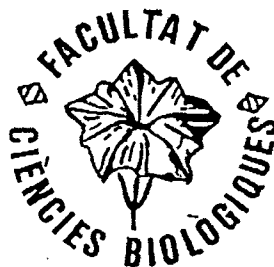
TESIS DOCTORAL

Rafael Sirera Pérez

Valencia, 2002



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE CIÈNCIES BIOLÒGIQUES



Departamento de Bioquímica
Programa de Bioquímica Clínica y Médica

TESIS DOCTORAL

Estudio de la recuperación inmunológica, tras la administración de tratamientos antirretrovirales de gran actividad, en niños infectados verticalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

HOSPITAL UNIVERSITARI LA FE
Servei Valencià de Salut



Centro de Investigación
Unidad de Inmunología Experimental

Tesis presentada por Rafael Sirera Pérez
Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Valencia. 2002



ELENA CARMONA IGLESIAS, Doctora en Ciencias Químicas y Facultativa Especialista adscrita a la Unidad de Inmunología Experimental del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe,

DECLARA:

Que la presente **Tesis Doctoral** "*Estudio de la recuperación inmunológica, tras la administración de tratamientos antirretrovirales de gran actividad, en niños infectados verticalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo I*", que presenta el Licenciado en Ciencias Biológicas Rafael Sirera Pérez, ha sido realizada bajo mi dirección y considero que reúne las condiciones necesarias para ser presentada para optar al Grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Valencia a 20 de Mayo del 2002.

Fdo. Dra Elena Carmona Iglesias



A mis padres.

*Gracias por haberme dado
una buena vida.*

*Ahora podemos cerrar ya el libro de las
enfermedades infecciosas*

El Surgeon General de los EEUU en 1969

*La mayor amenaza concreta al dominio
permanente del hombre en el planeta es un vi-
rus*

Joshua Lederberg, premio Nobel de Medicina

*Un virus es una muestra de malas noticias
envuelta en proteína*

sir Peter Medawar

*El VIH es la piedra roseta de la Inmuno-
logía*

Rafael Sirera



Justo es expresar mi agradecimiento a las personas que con su esfuerzo y apoyo han hecho posible este trabajo.

En primer lugar al Dr. Andrés González Molina, director científico del estudio, por sus cualidades humanas y profesionales y por, aparte de ser mi jefe, ser un buen amigo, noble y generoso, que ha hecho lo increíble por mí. Por haber aprendido de él y con él toda la Inmunología que sé, por haber contado siempre conmigo y por haber recorrido mucho mundo juntos. Por ser un gran maestro, que le permite enseñar tanto a los que saben mucho como a los que no saben nada, por su capacidad de abstracción y de síntesis que dejan ver la luz en el bosque frondoso, desenredar la maraña y llegar al fondo de la cuestión. Por haber vivido conmigo este estudio con la misma intensidad y porque, sin ninguna duda, sin él no lo habría conseguido. Por su espíritu infatigable, por su rigor y por su afán de perfeccionismo. Y egoístamente, porque para mí, trabajar codo a codo con él es un placer y un honor.

A la Dra. Elena Carmona, directora de la Tesis Doctoral, por su dedicación, interés y afecto en la dirección de este trabajo. Por confiar en mí y dejarme hacer las cosas a mi gusto.

A Carmen Bueno, Amparo Bayona, Ana Postigo, Amparo Oltra, Amparo Zafra, Mayte Sebastiá, el equipo del Área Celular de la Sección de Inmunología Experimental del Centro de Investigación del Hospital La Fe. Con su saber hacer y dedicación a su trabajo han sido una parte imprescindible del estudio. Con el cariño que me han tratado desde que llegué al laboratorio, han hecho sin duda que mi vida en el lugar de trabajo sea más agradable.

A los Drs. Francisco Asensi, Amparo Pérez Tamarit y María del Carmen Otero y por supuesto, a Mati y las demás personas que conforman la Sección de Enfermedades Infecciosas del Hospital Infantil La Fe, por el cariño y la magnífica asistencia que prestan al niños infectados por el VIH.

Al Dr. Francisco Carbonell, y a Teresa Riol y Casi Planells, de la Unidad de Inmuno-fenotipado del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana, por su espléndida e inestimable colaboración en las determinaciones citofluorimétricas.

A los Drs. Miguel Gobernado y Juan Córdoba, y a todo su equipo del Servicio de Microbiología del Hospital La Fe, por prestar tan necesario apoyo al paciente y por colaborar con nosotros en el seguimiento analítico de los niños infectados por el VIH.

A Magdalena Faura, que ha sido la verdadera impulsora de que finalizara el trabajo. Sus muestras de cariño, ánimo, comprensión y dedicación tanto a mí como al estudio han sido una inestimable ayuda y acicate.

A mis amigos del Centro de Investigación, Manolo Portolés, Inma Azorín, Amparo Hernández, Cristina Couchou, María Dolores Pinazo, Quique Sevilla, por haber pasado tan buenos ratos juntos. Y que sigan!!!

Al Dr. José Caffarena, por confiar en mí y ayudarme a abrirme paso en la biomedicina.

A mi tutor del tercer ciclo, el Dr. Juan Viña, por iniciarme en el precioso mundo de la Investigación.

Al Dr. Miguel Rivera, director del Centro de Investigación del Hospital La Fe, por apoyar mi permanencia en el Centro y tenerme dentro de su grupo colaborador.

A los Drs. Juan Cosín, Inmaculada Azorín, Edelmiro Réganon, José María Sánchez-Cuenca y Magdalena Faura, por sus críticos consejos tras leer partes del manuscrito.

A José Rubio, Alfonso Lozano, Teresa Arlandis y Francisco Alfonso por su tan necesario apoyo logístico.

Y a la Dra. Eliana Mesa, del Laboratorio Bristol Myers, por haber confiado en nuestro equipo y por haber financiado mi trabajo en el Centro de Investigación durante muchos años.

Índice

Abreviaturas	1
1.-Preliminar	3
1.1.- El virus de la inmunodeficiencia humana	5
1.1.1.- Ciclo biológico del VIH	7
1.2.- Inmunopatogenia viral	9
1.3.- Transmisión materno-fetal y sida pediátrico	12
1.4.- Tratamiento antirretroviral	15
2.-Introducción	19
2.1.- Poblaciones Linfocitarias	22
2.1.1.- Linfocitos de Memoria y Vírgenes	22
2.1.1.1- CD45	22
2.1.1.2.- Expresión de CD45 y VIH	24
2.1.2.- Moléculas coestimuladoras en Linfocitos	26
2.1.2.1.- La coestimulación en los linfocitos T	26
2.1.2.2.- El CD28	26
2.1.2.3.- CD28 e infección por VIH.	27
2.1.3.- Expresión de marcadores de activación linfocitaria	28
2.1.3.1.- Los marcadores de activación	28
2.1.3.2.- Marcadores de activación e infección por VIH	29
2.2.- Los ensayos de proliferación linfocitaria	32
2.2.1.- Aplicaciones clínicas de los ensayos de proliferación	34
2.2.2.- La capacidad proliferativa de los infectados por el VIH	35
2.3.- Citocinas	36
2.3.1.- La regulación de la respuesta inmune	36
2.3.2.- Citocinas de tipo Th1	37
2.3.3.- Citocinas de tipo Th2	37
2.3.4.- Citocinas proinflamatorias	38
2.3.5.- Citocinas e infección por el VIH	39
2.- Objetivo	43

4.- Material y Métodos	47
4.1.- Descripción de la cohorte	48
4.1.1.- Duración del estudio	51
4.1.2.- Agrupamiento de los niños para el estudio	51
4.2.- Determinación de la carga viral	52
4.3.- Citometría de flujo	53
4.4.- Ensayos de proliferación linfocitaria	54
4.5.- Síntesis "in vitro" de citocinas	56
4.6.- Cuantificación de citocinas	56
4.7.- Análisis estadístico	58
5.- Resultados	63
5.1.- Linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y Subpoblaciones CD45RA y CD45RO	63
5.1.1.- Controles	63
5.1.2.- Grupo de niños VIH+	69
5.2.- Expresión de CD28 en los linfocitos periféricos	69
5.2.1.- Controles	69
5.2.2.- Grupo de niños VIH+.	73
5.3.- Expresión de CD38 en los linfocitos periféricos	73
5.3.1.- Controles	73
5.3.2.- Grupo de niños VIH+.	76
5.4.- Expresión de HLA-DR en los linfocitos periféricos	76
5.4.1.- Controles	76
5.4.2.- Grupo de niños VIH+.	79
5.5.- Estudios de Proliferación:	79
5.5.1.- Controles	79
5.5.2.- Grupo de niños VIH+	82
5.6.- Citocinas plasmáticas	83
5.6.1.- Controles	83
5.5.1.- Grupo de niños VIH+	85
5.7.-Inducción de la síntesis "in vitro" de citocinas	86
5.7.1.- Secreción de citocinas en controles	88
5.7.2.- Secreción de Citocinas en niños VIH+.	93

6.- Discusión	93
6.1.- Grupo de Alta Eficacia	96
6.2.- Grupo de Baja Eficacia	101
6.3.- Grupo de Media Eficacia	104
7.- Conclusiones	107
8.- Bibliografía	113

Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
APC	Célula Presentadora de Antígeno
APC	Allofococianina
APM	Acetato de forbol miristilado
ARN	Ácido RiboNucleico
C.I.	Categoría Inmunológica
c.p.m.	Cuentas por Minuto
CD	<i>Cluster Designation</i>
CDC	Centres for Disease Control and Prevention
ConA	Concanavalina
D.O.	Densidad óptica
d.p.m.	Desintegraciones por Minuto
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GM-CSF	Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
HLA	Antígeno de los Leucocitos Humanos
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
IL	Interleucina
LCA	Antígeno Común de los Leucocitos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
OPD	O-phenylendiamine
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Ficoeritrina
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Inhibidor de la Proteasa
PWM	Pokeweed Mitogen
RT	Transcriptasa Reversa o RetroTranscriptasa
RTI	Inhibidor de la Transcriptasa Reversa
SIDA	Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida
TARGA	Tratamiento Anti-Retroviral de Gran Actividad
TCR	Receptor de la Célula T
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

1.-Preliminar

1.-Preliminar	3
1.1.- El virus de la inmunodeficiencia humana	5
1.1.1.- Ciclo biológico del VIH	7
1.2.- Inmunopatogenia viral	9
1.3.- Transmisión materno-fetal y sida pediátrico	12
1.4.- Tratamiento antirretroviral	15

1.1.- El virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1, a partir de ahora VIH), es un **retrovirus** encapsulado. Al ser un tipo de virus que persiste y que continúa su replicación sin causar problemas aparentes durante años, a este grupo de retrovirus se les denominó **lentivirus**. Los lentivirus se distinguen de los otros retrovirus por: a) su aspecto morfológico (en el virión maduro, la nucleocápside es cilíndrica o de cono truncado); b) por la presencia de ciertos genes reguladores que no se encuentran en otros retrovirus (tat y rev); c) por el curso bifásico de la expresión de sus genes (actividad y latencia)¹. Como el VIH tiene tropismo por la molécula CD4, infecta dos tipos de células mononucleares sanguíneas, a los linfocitos CD4⁺ (denominados linfocitos helper) y a los macrófagos, y tiene la capacidad de persistir en los organismos que infecta a pesar de las fuertes respuestas inmunológicas celulares y humorales que induce. El VIH es el agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA, sida).

El VIH se **transmite** por la sangre o sus derivados, por contacto sexual y de madre a hijo, bien sea durante el embarazo, el parto o la lactancia materna. No hay evidencias que mantengan que el virus se pueda transmitir por contactos casuales o por la picadura de insectos. Mientras que en los países desarrollados las formas más habituales de transmisión han sido la homosexual o el uso compartido de agujas entre los toxicómanos, en los países en vías de desarrollo la transmisión heterosexual es la más frecuente. En la actualidad, la transmisión heterosexual del VIH en los países occidentales está incrementándose llamativamente debido a las prácticas sexuales sin control preventivo, muy por encima de los niveles de incremento observado en los otros grupos. En los sujetos infectados, el virus se encuentra en forma libre en el plasma, semen y secreciones vaginales o infectando células mononucleares presentes en los mismos fluidos. Antes de que se conociera el virus y se desarrollaran métodos para su detección, una gran proporción de hemofílicos (que necesitan continuamente hemoderivados) resultaron infectados por el VIH. Debido a la gran dificultad que supone recoger datos epidemiológicos en los países en vías de desarrollo, que son los países más afectados por la infección con el VIH, la organización mundial de la salud (OMS) trabaja siempre con estimaciones de seroprevalencia y casos de sida. La OMS estima que en el año 2000 existían unos 10 millones de casos acumulados en el mundo de sida y entre 40 y 100 millones de personas infectadas por el virus.

Como todos los retrovirus, posee 3 genes: *gag*, *pol* y *env*. La forma integrada del VIH, también conocida como provirus, está flanqueada a ambos lados por una secuencia repetida denominada Long Terminal Repeats, LTR, que intervienen en la integración vírica en el cromosoma humano y en la regulación de su genoma. Como se aprecia en la figura 1.1, los genes del VIH se localizan entre estas dos regiones y codifican 9 proteínas divididas en tres clases:

- Estructurales: Gag, Pol y Env
- Reguladoras: Tat y Rev
- Accesorias: Vpu, Vpr, Vif y Nef.

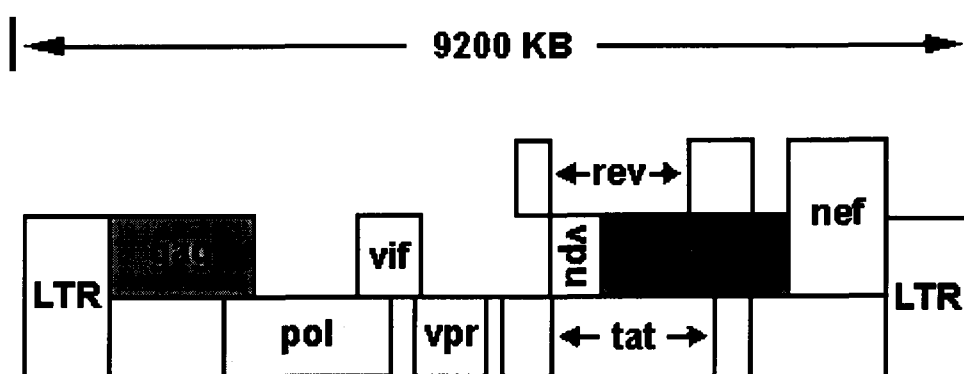


Figura 1.1. Esquema de la organización genética del VIH

Como el genoma puede ser leído en tres marcos de lectura diferentes y por el fenómeno denominado *alternative splicing*, los genes víricos se solapan, por lo que con un pequeño fragmento de ADN el VIH es capaz de codificar muchas proteínas. La proteasa viral se encarga de fragmentar las proteínas estructurales decodificadas en otras proteínas más pequeñas, pero con actividad biológica. Éstas son:

- La glicoproteína extracelular gp120 y la glicoproteína transmembranaria gp41, ambas derivadas de un precursor común, la gp160 y codificados por el gen *env*.
- Las proteínas p55, p40, p24 (antígeno del núcleo), p17 (matriz) y p7 (nucleocápside), componentes virales que forman parte de la nucleocápside y la matriz viral, codificados por el gen *gag*.
- Las enzimas, p51 (retrotranscriptasa), p11 (proteasa), p32 (integrasa) y p16 (ribonucleasa), codificada por el gen *pol*.

Además de los genes estructurales², el VIH posee otros que le diferencian de los demás retrovirus, que codifican las proteínas reguladores (tat y rev) y las acceso-

rias (nef, vpr, vpu y vif). La proteína tat es una transactivadora de la transcripción y es fundamental para la replicación del VIH, mientras que rev es una proteína con afinidad por ARN que le ayuda a salir del núcleo celular para dirigirse al citoplasma. Las proteínas accesorias no son necesarias para el ciclo vital del VIH, pero le confieren ciertas características de virulencia o latencia.

El **virus maduro**³ consiste en un núcleo proteico denso que contiene el genoma viral (dos hebras monocatenarias de ARN de unos 9.200 pares de bases) y las enzimas transcriptasa reversa, proteasa, ribonucleasa e integrasa, todo ello envuelto en una bicapa fosfolipídica que contiene 72 proyecciones del antígeno viral gp120 (figura 1.2). El tamaño aproximado del virus es de unos 90-100 nm de diámetro.

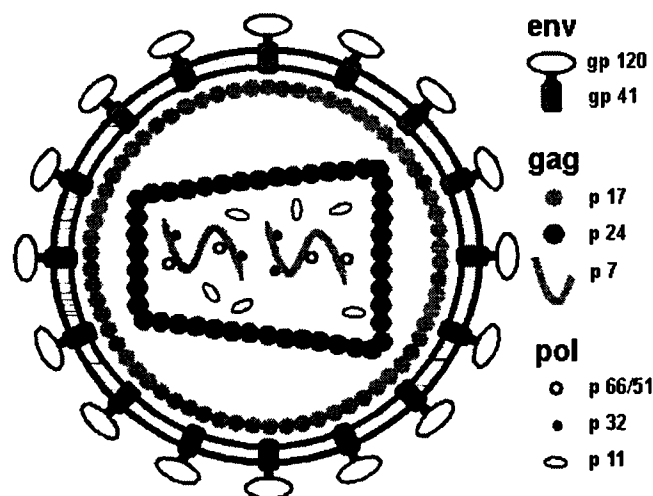


Figura 1.2. Esquema del VIH

La antigenicidad de estos componentes son la base para la formación de anticuerpos específicos contra ellos que se pueden analizar en el laboratorio. El más buscado para su detección en las pruebas serológicas es el p24.

1.1.1.- Ciclo biológico del VIH

Gracias a la glicoproteína gp120, las partículas virales se unen a los receptores celulares apropiados, las moléculas CD4 presentes en los linfocitos helper o en los monocitos y macrófagos. La virtud fusogénica de gp41 permite que por endocitosis los virus penetren al interior celular⁴. Antes de la fusión y penetración, gp120 debe unirse a correceptores en la membrana de la célula diana. Estos correceptor se ha identificado como receptores de quimiocinas, (siendo los más significativos el CCR5 y el CXCR4).

Se han descrito variantes diferentes de VIH con respecto al tipo de correceptor que utilizan. Así, las cepas de VIH macrófagotrópicas utilizan el correceptor CCR5 y son las que predominan durante la primoinfección, mientras que las cepas VIH que necesitan el CXCR4 tienen preferencia por los linfocitos CD4⁺, se les denomina linfotrópicos y predominan en las fases crónicas de la enfermedad. Los correceptores son tan importantes que de hecho se han descrito mutaciones en éstos que confieren resistencia a la infección por el VIH. La probabilidad de infección está en función del número de partículas virales infectivas y del número de células sensibles a ser infectadas. Una vez dentro de la célula, la partícula viral se desprende de su envuelta proteica y libera su ARN. La enzima retrotranscriptasa convierte una molécula de ARN en su copia complementaria de ADN, el ADN proviral, el cual se integra en el cromosoma eucariota tras la acción de la integrasa viral. Es más, las respuestas terapéuticas observadas soportan que la única forma de eliminar el virus es destruir las células infectadas que lo portan integrado, pues al formar parte de su dotación genética, tras la activación celular estas células expresarán los genes del VIH y generarán nuevas poblaciones de viriones que a su vez podrán seguir infectando a nuevas células vírgenes. Se calcula que en el sujeto infectado por el VIH, diariamente se generan unas 10¹⁰ viriones que circulan libres en el plasma (con una vida media corta de 6 horas), o integrados en unos 10⁷-10⁸ linfocitos CD4⁺ circulantes (0,1% del total del organismo). El 99% del VIH integrado se transcribe tras la activación de los linfocitos CD4⁺, cuya vida media puede llegar a ser de hasta 300 días. La producción de nuevas partículas virales por parte de los provirus integrados está regulada por los mecanismos normales de transcripción celular. Así, la activación de los linfocitos CD4⁺ induce la expresión del factor NF-κB, que se une al LTR proviral e inicia la transcripción del genoma del VIH en ARN⁵, se transcriben las proteínas víricas y se forman las nuevas partículas virales generadas, que salen de la célula huésped mediante gemaciones de la membrana plasmática, llevándose un fragmento de ésta.

El VIH tiene la facilidad de mutar rápidamente debido a la baja fidelidad de copia de la transcriptasa reversa, la cual introduce una mutación cada 2.000 incorporaciones de nucleótidos. Esto permite la aparición de nuevas variantes que, entre otras cosas, puede transferir resistencias a los fármacos en uso y escaparse a la acción del sistema inmunológico al no poder ni los anticuerpos ni las células citotóxicas reconocer las nuevas isoformas de las proteínas virales.

1.2.- Inmunopatogenia viral

La infección por VIH se caracteriza por un deterioro progresivo del sistema inmune que conduce a una profunda inmunosupresión. La progresión de la enfermedad lleva a la aparición, en ausencia de tratamiento eficaz, de enfermedades oportunistas potencialmente letales, de tumores, y de anormalidades neurológicas y hematopoyéticas. Esta última fase de la enfermedad se denomina síndrome de inmunodeficiencia adquirida o sida.

Desde un punto de vista clínico, la enfermedad ocasionada por el VIH se puede dividir en tres fases:

a) la **primoinfección**, que se caracteriza por unas manifestaciones similares a una mononucleosis infecciosa y de severidad variable y transitoria.

b) un periodo denominado de **latencia** clínica, sin sintomatología, que tiene una duración aproximada de hasta 10 años y que cuando se manifiesta ya se puede constatar un descenso significativo de los linfocitos CD4+.

c) y por último, la fase de enfermedad manifiesta o **sida**.

Poco después de que el virus penetre en el organismo, se multiplica y se disemina por él, ocupando predominantemente los tejidos linfoides⁶. Este incremento del número de partículas virales infectivas es contrarrestado parcialmente por la respuesta inmunológica. Esta efectividad parcial no consigue erradicarlo del organismo, originándose un estado de infección crónica con una persistente replicación viral a lo largo de todo el curso de la enfermedad, incluso en los momentos de latencia clínica, que no son, y no se deben confundir, con los de latencia viral. Como se ha señalado antes, el tejido linfoide es el mayor reservorio de virus y es donde tiene lugar la replicación activa de éste. Ello queda presente, ya desde los inicios de la infección por el VIH, por la hiperplasia de los nódulos o ganglios linfáticos. Los viriones son atrapados en los centros germinales en las células dendríticas foliculares aun estando rodeados de anticuerpos neutralizantes. Así se estimula continuamente a las células linfoides y además los virus emergentes se exponen a los linfocitos CD4+, que en su paso migratorio acceden a los nódulos linfáticos.

Las respuestas anti-VIH, de tipo humoral y las mediadas por células, se detectan ya desde los primeros momentos de la infección. La inmunidad mediada por células (crítica para la erradicación de células infectadas por patógenos intracelulares, como es el caso del VIH) consiste principalmente en los linfocitos CD8+ citotóxicos, específicos

anti-VIH. Su acción efectora provoca una destrucción de las células que activamente producen nuevos virus. Por otro lado, la respuesta humoral o de anticuerpos específicos anti-VIH, también contribuye para controlar la viremia mediante la formación de inmunocomplejos de virus-inmunoglobulina-complemento que posteriormente son atrapados por la trama reticulo-endotelial.

Se han postulado muchas hipótesis para explicar la progresión de la enfermedad ocasionada por el VIH y, entre ellas, se incluyen tanto mecanismos virológicos como inmunopatogénicos^{7,8}. Dentro de los primeros destacan por su importancia la citopaticidad mediada directamente por el VIH o la inducida a través de la formación de sincitios, que son células heterocariontes no viables fruto de la fusión de muchos linfocitos CD4+. La relación entre virus y huéspedes es variable y compleja. Los virus altamente citopáticos se deben controlar eficientemente por el sistema inmune para ser erradicados. Por el contrario, los virus que no son citopáticos pueden sobrevivir y coexistir con sus huéspedes a pesar de la calidad de la respuesta inmune que induzcan. ¿Es realmente el VIH un virus citolítico *in vivo*? El VIH es un retrovirus que se integra en el genoma de la célula que infecta y la citopaticidad no es una de sus características de grupo, sino más bien la transformación neoplásica. Muchos autores sostienen que los mecanismos que conducen a la inmunosupresión son más bien inmunopatológicos que citopáticos y que son multifactoriales y multifásicos.

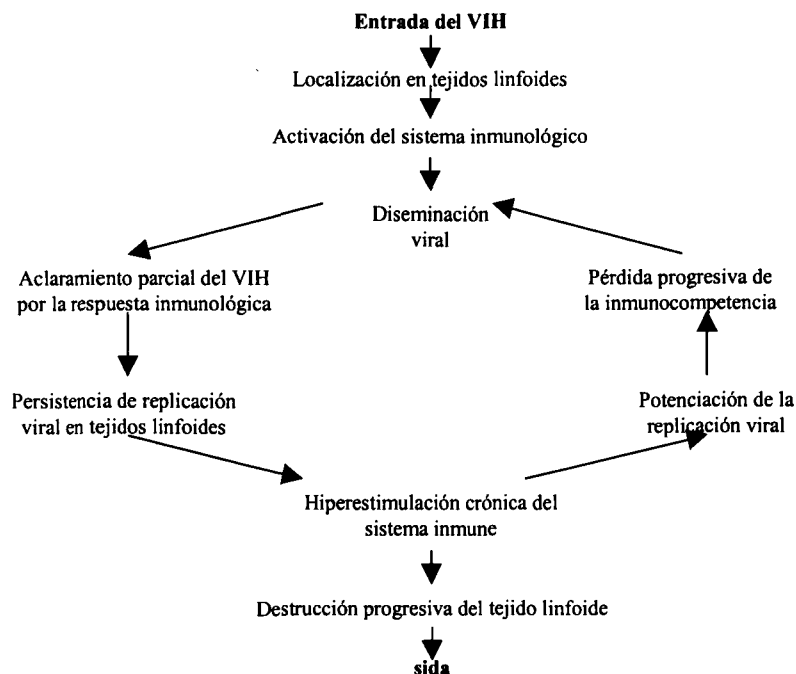


Figura 1.3. Inmunopatogénesis del VIH

Como el VIH no se llega a eliminar del organismo, su persistencia conduce a una hiperactivación crónica del sistema inmunológico, lo cual actuaría en detrimento de la homeostasis del sistema inmune (figura 1.3).

La naturaleza compleja de la enfermedad incluye varias características superpuestas entre las que se han propuesto:

1.- La persistencia de la replicación viral⁹ que provoca también una persistente y aberrante activación del sistema inmunológico y en última instancia el progresivo deterioro, tanto cualitativo como cuantitativo, del sistema inmunológico.

2.- Defectos funcionales en los linfocitos CD4 mediados por señales negativas al interaccionar gp120 con CD4.

3.- La homología que existe entre las moléculas de la envuelta del VIH y el HLA de tipo II¹⁰. Esto hace que en la respuesta normal de anticuerpos anti-VIH se originen también anticuerpos contra el HLA II. Así, estos anticuerpos pueden mermar la funcionalidad de los linfocitos CD4 e incluso la aparición de respuestas citotóxicas aloreactivas, las cuales pueden provocar descensos cuantitativos en estos linfocitos. Esta homología también puede desencadenar reacciones autoinmunes que pueden contribuir a la patogénesis del VIH.

4.- La secreción de citocinas¹¹, que es un evento estrechamente ligado a la activación celular del sistema inmunológico. Las diferentes células se comunican unas con otras a través de estas moléculas y son una parte esencial en el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmunológico. Durante la infección por el VIH, se produce una hiperexpresión y un desequilibrio en las citocinas que deben predominar, o lo que es lo mismo, un cambio de dominancia del perfil de citocinas de tipo Th1 a Th2. Aunque muchos estudios lo han sugerido, otros no han podido corroborarlo. Sin embargo lo que sí parece cierto es que algunas citocinas pueden actuar como potenciadores de las respuestas inmunológicas antivirales (IL-2, IFN- γ) mientras que otras pueden suprimir esta respuesta (IL-10) o incluso potenciar la expresión viral *per se* (TNF- α)¹².

5.- La exacerbada activación de la apoptosis en los linfocitos de estos pacientes o incluso la muerte celular masiva debido a superantígenos presentes en los individuos infectados¹³.

6.- La capacidad del VIH de infectar a los precursores hematopoyéticos¹⁴ (CD34⁺), uno de los factores más importantes que contribuyen a la pérdida y a la falta de capacidad para regenerar la población de linfocitos CD4. Los individuos infectados por el VIH presentan citopenias sanguíneas y otras anomalías hematológicas. Esta

destrucción progresiva de los tejidos linfoides es un aspecto muy importante en la inmunopatogenia del sida. Por lo tanto, se debe considerar que los infectados por el VIH, además de recibir una terapia antirretroviral eficaz necesitan, la reconstitución inmunológica de su sistema inmunitario mermado. Desde la instauración de los tratamientos actuales, la posibilidad de recuperar la biología de los tejidos linfoides (el timo, los nódulos linfáticos y su microambiente estromal) parece viable y podría ser definitiva cuando se consiguiera erradicar definitivamente el patógeno.

Los parámetros inmunológicos de laboratorio que mejor describen este deterioro del sistema inmunológico son, por un lado de índole cuantitativa (depleción de los linfocitos CD4⁺ y la linfocitosis CD8⁺) y por otro, de índole cualitativa (capacidad funcional de los linfocitos T).

1.3.- Transmisión materno-fetal y sida pediátrico

En tres momentos de la vida, los nacidos de madres VIH+ son susceptibles de ser infectados:

a) Se habla de **transmisión intrauterina** si ésta se produce durante la gestación, muy a pesar de que la placenta es una barrera impermeable a los virus. Aunque ha sido difícil de demostrar, se cree que los niños que desarrollan rápidamente la inmunosupresión y llegan a sida en los primeros doce meses de vida extrauterina, han sido infectados en su vida fetal.

b) Lo más frecuente es que se transmita el VIH **durante el parto**, al intercambiar fluidos con la madre. El canal del parto está muy vascularizado y lleno de secreciones maternas que pueden tener virus potencialmente infectivos. Una forma de disminuir la transmisión peripartum, aunque en principio controvertida, fue practicar cesáreas a todas las parturientas seropositivas.

c) La tercera forma de transmisión materno-fetal es la que se produce **postpartum**, al proporcionar a sus lactantes leche materna que contenga partículas infectivas del VIH.

Los datos epidemiológicos globales indican que la transmisión materno-fetal es la causa más común de infección por VIH en niños, representando el 90% del sida pediátrico. En los países desarrollados, la prevención de la transmisión vertical se convirtió en una realidad a partir de 1994, tras la publicación de los resultados del estudio PACTG 074 (Pediatric AIDS Clinical Trials Group protocol 074), pues anteriormente la única medida preventiva era impedir la lactancia materna –también una vía de trans-

misión-. En él se demostraba que la administración de AZT durante el embarazo y al recién nacido durante las 6 primeras semanas de vida reducía en dos tercios la transmisión materno-fetal. Posteriormente, mejoras en estos tratamientos profilácticos disminuyeron aún más esta forma de transmisión^{15,16,17,18} hasta cifras menores del 2-5%.

Hasta hace pocos años, la demostración de anticuerpos contra la molécula p24 del VIH mediante técnica de ELISA, combinado con el test confirmatorio de antígenos virales por Western blot eran las únicas formas de diagnosticar la infección en los individuos. En el caso de los niños nacidos de madres infectadas, como los anticuerpos de tipo IgG son transplacentarios y pueden durar en los recién nacidos hasta 12 ó 18 meses, las pruebas serológicas carecían de validez hasta que no hubiera pasado este periodo ventana¹⁹. De hecho, se podía observar serorreversión si los anticuerpos maternos anti-VIH se iban perdiendo a medida que el niño aumentaba de edad, o seropersistencia cuando éstos no desaparecían con el tiempo, lo que significaba que las IgG anti-VIH eran también producidas por el niño. Este periodo de incertidumbre diagnóstica se acortó significativamente mediante la detección de la IgA específica anti-VIH, la cual es cuantificable desde el tercer mes de vida. Dado que la IgA no atraviesa ni la placenta ni el intestino, su presencia en plasma es considerada de origen autólogo. Actualmente, gracias al avance de la biología molecular, la infección por el VIH puede ser diagnosticada en la mayoría de los recién nacidos durante el primer mes de vida, y casi en la totalidad de los nacidos antes de los seis meses de edad. Para ello se utilizan los test que detectan el genoma de VIH tanto en plasma (PCR de ARN, la carga viral) como en la forma de provirus integrado en los linfocitos (PCR de ADN). Generalmente los test se realizan periódicamente tras el nacimiento: a) antes de las 48 horas postpartum; b) entre el primer y segundo mes y; c) al final del primer semestre de vida. Para evitar posibles contaminaciones maternas, el uso de la sangre de cordón umbilical está totalmente desaconsejado para el diagnóstico. Otros métodos diagnósticos empleados son los co-cultivos: células del paciente con sospecha de infección cultivadas en presencia de linfoblastos normales sensibles al virus y que permiten expandir *in vitro* el VIH replicativo integrado en los linfocitos CD4+. Sin embargo han sido totalmente desbancados del ámbito del diagnóstico precoz de la infección pediátrica por ser técnicas de lenta ejecución (hasta 1 mes), de menor sensibilidad y por estar más sujetas a variaciones experimentales que pueden originar falsos negativos. Se acepta que los niños que tienen un test positivo en la muestra de 48 horas, han recibido la

infección intraútero, y los que resultan positivos en muestras posteriores la recibieron peripartum. Esta diferenciación del momento de la infección es de vital importancia porque, como ya se ha comentado, la infección durante la vida fetal está asociada con una velocidad de progresión más rápida y de peor pronóstico.

El seguimiento de los niños infectados tiene sus peculiaridades, y no es comparable en muchos aspectos al de los adultos^{20,21,22,23}. Lo primero a tener en cuenta para evaluar e interpretar el número de linfocitos CD4⁺ es que éstos cambian significativamente con la edad, es decir, hay que considerar la edad como una variable más. Sus cifras se equiparan a las de los adultos en torno a los 5 años. Aunque el número absoluto de linfocitos CD4⁺ cambia hasta esa edad, el porcentaje de éstos frente al total de linfocitos no sufre variación. Por lo tanto, en niños menores de 5 años, los cambios en el porcentaje más que las cifras absolutas por microlitro son un mejor marcador de la progresión de la enfermedad. Los Centers for Disease Control and Prevention, CDC, establecieron unos criterios²⁴ para poder estratificar en categorías inmunológicas (C.I.) los niños de acorde a su depleción de linfocitos CD4⁺:

C.I.	Grado de Inmunosupresión	< 1 año		[1-5] años		> 5 años	
		Cels/ μ l	%	Cels/ μ l	%	Cels/ μ l	%
1	No existe	>1.500	>25	>1.000	>25	>500	>25
2	Moderada	[1.499-750]	[24-15]	[999-500]	[24-15]	[499-200]	[24-15]
3	Severa	<750	<15	<500	<15	<200	<15

Como sucede con las cifras de linfocitos, el perfil de cargas virales de los niños difiere del de los adultos y puede ser en muchos casos muy superior. La carga viral es la cantidad de virus libre circulando en la sangre de los enfermos y se cuantifica mediante una PCR de ARN (RT-PCR), expresándose en copias virales por mililitro. Los límites de detección dependen del ensayo utilizado, oscilando desde 400 a 50 copias de RNA/ml. Dado que la carga viral cambia antes que el número de linfocitos CD4⁺, este parámetro es un marcador precoz para vigilar la eficacia de los tratamientos antivirales instaurados y observar la posible aparición de resistencias farmacológicas. Generalmente, en los niños infectados, las cargas son bajas al nacimiento (<1.000 copias/ml), aumentan bruscamente hasta 100.000 o 10.000.000 copias/ml en los dos primeros meses de vida, y descienden tras el primer semestre a niveles estables e inferiores a 100.000 copias/ml. La persistencia de altas cargas virales se ha asociado con una rápi-

da progresión de la enfermedad, especialmente si los linfocitos CD4+ también están por debajo del 15% (inmunosupresión severa o categoría inmunológica #3).

1.4.- Tratamiento antirretroviral

En aquellas enfermedades infecciosas en las que no se puede erradicar el organismo invasor, la recuperación del paciente se consigue mediante el desarrollo de una respuesta inmunológica potente que consiga frenar su acción perniciosa. Así, muchos virus permanecerán presentes de por vida en los organismos infectados, confinados en lugares que puedan evadir la respuesta inmune y en ocasiones originando nuevos brotes, que a su vez, serán rápidamente controlados en personas inmunocompetentes. Tanto las respuestas de tipo humoral como las celulares son las responsables de esta eficaz contención de microorganismos. En el curso natural de la infección por el VIH, aunque en un comienzo la respuesta inmunológica es relativamente eficaz, la viremia persiste y al final la enfermedad progresa. El porqué llega un momento en el que las respuestas defensivas ya no son eficaces, es una cuestión que se necesita conocer para poder elaborar inmunoterapias coadyuvantes a los tratamientos antirretrovirales.

En el momento en que aparecieron los primeros fármacos antirretrovirales, se observó que se prolongaba la supervivencia de los pacientes con sida sólo durante un breve periodo de tiempo. Cuando el arsenal terapéutico se fue ampliando, se pudo constatar que la terapia en combinación era claramente más efectiva que la monoterapia. Finalmente, la aparición de los inhibidores de la proteasa supuso una auténtica revolución en las expectativas y manejo del paciente infectado. No hay duda de que los Tratamientos Anti-Retrovirales de Gran Actividad (TARGA), que son combinaciones de al menos tres antirretrovirales incluyendo como mínimo a un inhibidor de la proteasa, tienen un efecto muy beneficioso en los infectados por el VIH, aunque adolecen de capacidad para eliminar el reservorio viral que se encuentra en forma latente integrado en células viables. Esto origina que, en sujetos infectados, cuando se interrumpe el tratamiento o aparecen resistencias a los fármacos, se observen rebrotes virales bruscos y los linfocitos CD4+ comiencen a descender de nuevo. Además, la capacidad de generar y mejorar las respuestas inmunológicas específicas tanto anti-VIH, como contra otros patógenos oportunistas, es variable y generalmente modesta. Por ello, el reto de las nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la infección por el VIH es la forma de aumentar o restaurar y preservar las respuestas mediadas por células contra el VIH, con tratamientos complementarios que incrementen la capacidad inmu-

nológica de las células efectoras en la eliminación de los reservorios virales. La mayoría de estos tratamientos se basan en el empleo de citocinas coadyuvantes, como los estimuladores de colonias de monocitos y macrófagos (GM-CSF) o la interleucina 2 (IL-2), y en las terapias con vacunas de inmunógenos del VIH.

Los tratamientos TARGA se pueden administrar a niños²⁵, independientemente de la edad que tengan, pues en ellos también se han demostrado sustanciales beneficios en la disminución de la morbilidad y mortalidad. Como su uso en la población pediátrica se ha legalizado mucho más tarde que en la población de adultos, los datos de su eficacia y forma de empleo todavía son escasos. Se estima que la administración precoz puede ser ventajosa para ellos al permitir un mejor control inmunológico de la infección, dificultando así la diseminación viral por los territorios linfoides y retrasando el deterioro progresivo del sistema inmunológico. Aún están por dilucidar los problemas teóricos de por vida que conlleva la administración temprana, de estos fármacos con muchos efectos secundarios y con escasos datos farmacológicos, farmacocinéticos, de dosificación y de seguridad en la población pediátrica.

Los fármacos antirretrovirales^{26,27,28,29} se dividen en dos grandes grupos que interfieren con enzimas virales imprescindibles para su ciclo vital. Son:

a) Inhibidores de la transcriptasa reversa (o retrotranscriptasa), RTIs. La transcriptasa reversa del VIH no es muy exigente a la hora de vigilar si los nucleótidos que está incorporando a la hebra de ADN naciente son los correctos. Por ello se han diseñado moléculas muy parecidas a los nucleósidos y nucleótidos (de adenina, guanina, citosina y timina), pero a las que les falta el radical que permite que se pueda seguir elongando la cadena de ADN, por lo que, tras la incorporación del análogo, se detiene la síntesis del ADN complementario viral. Estas moléculas son de tres tipos diferentes:

- Análogos de nucleósido, NRTI:

Abacavir	ABC
Didanosina	ddI
Estavudina	d4T
Lamivudina	3TC
Zalcitabina	DdC
Zidovudina	AZT

- Análogos de nucleótidos, NtRTI:

Adefovir	ADV
Tenofovir	ADV

- No nucleósidos, NNRTI. El mecanismo de acción es diferente. En vez de impedir que se elongue la cadena nascente de ADN proviral, inhiben la acción de la retrotranscriptasa bloqueando su sitio catalítico. Actualmente los autorizados son:

Delavirdina	DLV
Efavirenz	EFV
Nevirapina	NVP

b) Inhibidores de la proteasa, PI. Como se comentó anteriormente, las proteínas estructurales del VIH se forman por rotura proteolítica de varios precursores. Las moléculas que nos ocupan son péptido-miméticos de los substratos de la proteasa del VIH. De esta forma impiden la síntesis y evaginación de nuevas partículas virales de la célula. Son los siguientes:

Indinavir	IDV
Lopinavir	LPV
Nelfinavir	NFV
Ritonavir	RTV
Saquinavir	SQV

Dado que las resistencias cruzadas a los fármacos comentados anteriormente son frecuentes, en la actualidad se están elaborando nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra otros momentos del ciclo vital del virus, como son los inhibidores de la fusión y de la integrasa.



2.-Introducción

2.-Introducción	19
2.1.- Poblaciones Linfocitarias	22
2.1.1.- Linfocitos de Memoria y Vírgenes	22
2.1.1.1.- CD45	222
2.1.1.2.- Expresión de CD45 y VIH	244
2.1.2.- Moléculas coestimuladoras en Linfocitos	266
2.1.2.1.- La coestimulación en los linfocitos T	266
2.1.2.2.- El CD28	2626
2.1.2.3.- CD28 e infección por VIH.	277
2.1.3.- Expresión de marcadores de activación linfocitaria	2828
2.1.3.1.- Los marcadores de activación	28
2.1.3.2.- Marcadores de activación e infección por VIH	2929
2.2.- Los ensayos de proliferación linfocitaria	32
2.2.1.- Aplicaciones clínicas de los ensayos de proliferación	34
2.2.2.- La capacidad proliferativa de los infectados por el VIH	35
2.3.- Citocinas	36
2.3.1.- La regulación de la respuesta inmune	3636
2.3.2.- Citocinas de tipo Th1	3737
2.3.3.- Citocinas de tipo Th2	3737
2.3.4.- Citocinas proinflamatorias	3838
2.3.5.- Citocinas e infección por el VIH	3939

La historia natural de la infección por el VIH se ha modificado drásticamente gracias a los grandes progresos que se han realizado en el campo de los fármacos antirretrovirales. En este sentido, se considera **tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA)** a cualquier combinación de tres o más fármacos, que incluyan generalmente a dos inhibidores de la transcriptasa reversa y un inhibidor de la proteasa. Estos regímenes terapéuticos han mostrado ser muy superiores en eficacia antiviral a la monoterapia o la biterapia convencional, frenar la progresión de la inmunodeficiencia, disminuir la morbilidad y mortalidad de los infectados y han permitido conocer mejor la etiopatogenia de enfermedad.

Dos variables analíticas diferentes predicen independientemente la progresión hacia la inmunodeficiencia en los individuos infectados por el VIH³⁰, la carga viral y el recuento de linfocitos CD4⁺. Además, estos dos parámetros también son excelentes indicadores de la evolución terapéutica de los pacientes sometidos a tratamientos antirretrovirales. Por lo tanto, el principal objetivo del TARGA es reducir la viremia hasta cifras indetectables o lo más baja posible durante la mayor cantidad de tiempo y así impedir la pérdida paulatina de los linfocitos CD4⁺. Con estos tratamientos se permite la recuperación cuantitativa y funcional del sistema inmunológico, y se evita la aparición de enfermedades oportunistas. Además, parece ser que cuanto antes se les administre a los pacientes más beneficios logran a largo plazo³¹.

El término TARGA no es más que una forma de nombrar el tipo de tratamiento que están recibiendo los infectados y es independiente de cual es su respuesta terapéutica. De hecho, la experiencia con muestreos poblacionales extensos indica que sólo un 40-50% de los sujetos tratados consiguen bajar la carga viral plasmática hasta niveles indetectables. Además, en adultos VIH+ con supresión completa de la replicación viral a corto plazo, la reconstitución inmunológica parece ser sólo parcial pues no se consigue recuperar totalmente ni el número de linfocitos CD4⁺ ni sus funciones perdidas.

La información existente en área de la infección pediátrica por el VIH, comparada con la del adulto, es aún muy escasa o poco documentada, especialmente en lo que a los TARGA (eficacia antiviral y reconstitución inmunológica) se refieren. Dos razones parecen justificar estos hechos: a) el gran retraso habido en la utilización de los TARGA en los niños VIH+, por dificultades legales y de formulación y b) la escasa existencia, nacional e internacional, de grupos técnicos y sanitarios que, por un lado concentren suficientes pacientes y, por otro lado dispongan de tecnología suficiente

para el seguimiento sanitario completo. Sin embargo, las posibilidades terapéuticas de los niños VIH⁺ han sido actualizadas y, en nuestro medio (Hospital La Fe, Valencia) se ha concentrado el seguimiento de 675 niños nacidos de madres infectadas desde el año 1987 hasta la actualidad.

Las altas respuestas a los tratamientos observadas en otras enfermedades infantiles, sugieren que la reconstitución inmunológica de los niños VIH⁺ puede ser también especialmente diferente a la de los adultos. Por ello, para comprobar si tras un largo periodo de TARGA se produce una verdadera y efectiva recuperación inmunológica, tanto cualitativa como cuantitativa hemos realizado el presente estudio longitudinal en 34 niños infectados verticalmente por el VIH y sometidos a TARGA. Para poder determinar el grado de recuperación desde el momento basal o pre-TARGA hasta cuatro años después de iniciar el TARGA, hemos agrupado nuestra población de infectados en una categoría evolutiva, su eficacia terapéutica. En ella se ha tenido en cuenta el cambio que han sufrido los valores de carga viral plasmática a lo largo del periodo retrospectivo de nuestro estudio. Así se han agrupado los niños en tres categorías, los que presentaron alta, media o baja eficacia. Y para lograr nuestro objetivo, en ellos hemos analizado en sangre periférica:

- a) diversas poblaciones y subpoblaciones linfocitarias
- b) el nivel de citocinas plasmáticas
- c) la producción de citocinas *in vitro* (síntesis inducida) y
- d) las respuestas linfocitarias proliferativas *in vitro*,

cuyas características generales se describen a continuación.

2.1.- Poblaciones Linfocitarias

2.1.1.- Linfocitos de Memoria y Vírgenes

2.1.1.1- CD45

La molécula CD45 o antígeno común de los leucocitos (LCA, Leukocyte Common Antigen) es una glicoproteína característica de la superficie de las células de estirpe hematopoyética. Además, es la molécula antigénica más prevalente en la membrana de los linfocitos T y B. Ha sido la primera molécula en ser identificada como una nueva clase de enzimas, las fosfatasa de tirosinas de las proteínas³², que juegan un papel fundamental en la transducción de señales en los linfocitos. Este proceso catalíti-

co es un evento que controla el crecimiento y la división de las células eucarióticas, y en concreto, juega un papel decisivo en la proliferación de los linfocitos inducida tras la estimulación antigénica. Dependiendo de que expresen en su membrana una u otra isoforma³³ del antígeno CD45, a saber, el CD45RA (205-220 kDa) o el CD45R0 (180 kDa) la población de linfocitos T ($CD3^+CD4^+$ y $CD3^+CD8^+$) se subdivide en dos grandes y excluyentes subpoblaciones: CD45RA y CD45R0. Es más, la expresión diferencial de estas dos isoformas identifica a los linfocitos T en dos momentos de su diferenciación celular: linfocitos vírgenes y linfocitos maduros. La isoforma **CD45RA** se expresa en las células *vírgenes*, que han sido *recientemente diferenciadas* en el timo pero que aún *no han sido primadas* mediante el contacto con el antígeno para el que están específicamente predestinadas. Sin embargo, la molécula **CD45R0** se expresa exclusivamente en células de *memoria o primadas*, que ya han sido *seleccionadas y cualificadas* por un antígeno en particular. Ambas isoformas están codificadas por el mismo ARN mensajero, pero traducido de forma diferente por *alternative splicing*. Igualmente, ambas poseen idénticas fracciones intracelulares y se distinguen por poseer diferentes masas moleculares y niveles de glicosilación en sus fracciones extracitoplasmáticas. Muchas evidencias muestran que las células CD45RA y CD45R0 tienen comportamientos funcionales y migratorios diferenciales, entre los que destacan³⁴:

- En la membrana plasmática, las moléculas CD4 y el receptor de la célula T (TCR-CD3) sólo se asocian físicamente en un *cluster* a la isoforma CD45R0, mientras que CD45RA se halla libre en la membrana. Ello repercute definitivamente en la transmisión de señales a través de este receptor, que es verdaderamente eficiente al formar complejos como los citados.

- Tras la activación *in vitro*, las células que presentan en su superficie CD45RA pierden su expresión, a la vez que aparece en las mismas la molécula CD45R0.

- Las células que presentan CD45R0 se estimulan con concentraciones mucho menores de antígenos o mitógenos y proliferan más eficientemente o producen citocinas en mayores cantidades.

- Ambas subpoblaciones celulares CD45RA y CD45R0, se diferencian por el grado y el tipo de expresión de moléculas de adhesión, las cuales son esenciales para la migración intertisular y con ello contribuir de forma eficiente tanto en la presentación del antígeno como en la actuación efectora de células específicas. Así, los linfocitos vírgenes, que muestran alta expresión de CD62L (selectina), son capaces de extravasarse hacia los órganos linfoides secundarios y en ellos esperar a ser primados en las

zonas de presentación de antígenos. Por el contrario, los linfocitos de memoria, por la alta expresión de integrinas (LFA-1 y VLA-4) emigran con facilidad hacia los lugares de inflamación y en ellos ejercer su acción como células efectoras específicas.

2.1.1.2.- Expresión de CD45 y VIH

Debido a la correlación que existe entre estas isoformas del CD45 y la funcionalidad de las subpoblaciones de linfocitos T, su análisis permite conocer los cambios en la dinámica linfocitaria producidos en las enfermedades donde el sistema inmunológico está comprometido. La inmunodeficiencia ocasionada por la infección por el VIH es un ejemplo de ello.

Los linfocitos CD4⁺ son una pieza imprescindible tanto en la generación de nuevas respuestas a antígenos, como en la persistencia de cualquier respuesta inmunológica ya iniciada. En neonatos normales, más de un 80% de los linfocitos CD4⁺ son del tipo CD45RA³⁵, células responsabilizadas de la iniciación de respuestas inmunes específicas. Con la edad, a medida que madura el sistema inmunológico de los niños, se evidencia un descenso fisiológico de esta población celular virgen y un aumento compensatorio de la proporción de células que expresan el CD45R0, sobre las que recae la responsabilidad de las acciones efectoras específicas. Con ello, hacia el 5º año de vida, ambas subpoblaciones de los linfocitos CD4⁺ se estabilizan y muestran cifras similares a las observadas en la edad adulta³⁶.

En los adultos VIH⁺, se han realizado estudios sobre los cambios de estas subpoblaciones de linfocitos a medida que progresa la inmunosupresión y sobre las diferencias detectables en su sensibilidad a la infección por el virus, su predisposición a la muerte celular programada, o a la mayor o menor capacidad para la integración del VIH. Durante la fase asintomática (crónica) de la infección por VIH, se ha encontrado que hay un descenso de la población CD4⁺CD45RA³⁷, que se asocia con un aumento relativo de los linfocitos de memoria CD4⁺CD45R0. La correlación inversa entre el incremento de CD4⁺CD45R0 y el descenso de la población CD4⁺, ha sugerido que durante la progresión hacia la inmunodeficiencia severa, las células CD4⁺CD45RA⁺ son más sensibles, que las CD4⁺CD45R0⁺, a la citólisis provocada por el VIH. Es más, en estudios sobre la presencia de los provirus integrados en los genomas de los linfocitos se ha encontrado que el VIH se localizaba predominantemente en la subpoblación de memoria^{38,8,10}

Además, en el curso de la infección por el VIH, junto al descenso progresivo en el número de linfocitos CD4⁺ se detectan defectos funcionales, precoces y persistentes, en las respuestas inmunológicas de los infectados³⁹, antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas del sida. Entre estas deficiencias funcionales, destacan la pérdida de capacidad proliferativa *in vitro* a estimulaciones con mitógenos y antígenos, y la gammapatía policlonal inducida por hiperactivación disrregulada de los linfocitos B. Dado que, los defectos proliferativos ante antígenos podían ser debidos a que hubiera una pérdida selectiva de linfocitos CD4⁺CD45R0 (células de memoria con respuestas proliferativas más intensas que las CD4⁺CD45RA), se exploró si estos disminuían a lo largo de la infección. Los resultados obtenidos en la literatura no parecen corroborar esta hipótesis y soportan, una vez más, que la linfopenia CD4⁺ que caracteriza a los VIH⁺ no es a expensas de las células de memoria⁴⁰.

Por otro lado, los linfocitos CD8⁺ o linfocitos citotóxicos y/o supresores, juegan un papel crucial en el control de la infección por el VIH, tanto por su actividad en la citolisis directa de las células infectadas como, por otro, por su capacidad de producir factores solubles con actividad antiviral⁴¹. Los linfocitos CD8⁺ se encuentran muy incrementados en los sujetos infectados por el virus en todos los momentos de la enfermedad. Durante el curso de la enfermedad se ha puesto de manifiesto que existe una marcada linfocitosis CD8⁺CD45R0, tanto en adultos⁴² como en niños⁴³, pero el control que puedan ejercer estas células maduras sobre la replicación viral, es controvertido⁴⁴. De hecho la expansión de la población CD8⁺CD45R0 que coexpresa el marcador CD38 se ha visto que predice el descenso de los linfocitos CD4⁺ en la infección por el VIH⁴⁵. Es más, los linfocitos CD8⁺ efectores, específicamente dirigidos contra el VIH, se han evidenciado aumentados desde los primeros momentos de la infección, pero disminuyen a nivel periférico a medida que la enfermedad progresa⁴⁶. De ahí que la linfocitosis CD8, asociada a la falta de control inmunológico de la infección sea un signo de mal pronóstico y se haya sugerido incluso que la linfocitosis podrían ser más representativa de la ineficacia inmunológica (por el "engaño persistente" que el VIH somete al sistema inmunológico: que generan respuestas específicas contra epítomos virales que desaparecen por mutación) que tener algún efecto deletéreo sobre el sistema inmunológico⁴⁷.

2.1.2.- Moléculas coestimuladoras en Linfocitos

2.1.2.1.- La coestimulación en los linfocitos T

La interacción de un linfocito T (linfocitos CD3⁺) a través del receptor de la célula T (T cell receptor, TCR) con un antígeno presentado en el complejo principal de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex, MHC) por cualquier célula presentadora de antígeno (Antigen Presenting Cell, APC), inicia una cascada de eventos bioquímicos que resultarán en la activación de ese linfocito T. Sin embargo, la unión del TCR al antígeno no es suficiente para que se produzca la activación completa, siendo necesaria una segunda señal independiente de la del antígeno, que se denomina señal coestimuladora⁴⁸. La señal coestimuladora resulta de la interacción de la molécula CD28 presente en la superficie de los linfocitos T (que poseen diversas moléculas coactivadoras según la función a realizar) con el CD80 ó CD86 en la superficie de las APC⁴⁹ (células B activadas, células dendríticas y macrófagos). Esta segunda señal es imprescindible para que el linfocito CD3⁺ señalizado por el antígeno sintetice y segregue interleucina 2 (IL-2), la consuma autocrinamente y se induzca la expansión proliferativa celular⁵⁰. En este sentido, la interacción CD28-CD80 proporciona a los linfocitos preactivados una segunda señal coactivadora, que por transducirse por dos vías diferentes (una ciclosporina sensible y otra resistente) potencia y garantiza las respuestas linfocitarias. Es más, en diferentes modelos *in vitro* se ha constatado que la presentación antigénica en ausencia de la señal coestimuladora, conlleva a la inactivación, anergia clonal e incluso inducción de muerte por apoptosis de las células CD3⁺CD28⁺ que reaccionaron con el antígeno⁵¹.

2.1.2.2.- El CD28

La molécula CD28 es una glicoproteína transmembranaria homodimérica de 80 kDa, que pertenece de la familia de las inmunoglobulinas⁵² y se expresa en la superficie de los linfocitos T (CD3⁺). En sangre periférica de adultos normales, el CD28 es un marcador casi exclusivo de estos linfocitos T que se expresa en aproximadamente⁵³ un 95% de los linfocitos CD4⁺ y entre un 50% y un 70% de los CD8⁺. Sin embargo, no se detecta en poblaciones linfocitarias que no son las T (linfocitos NK y B), leucocitos polimorfonucleados, monocitos ni tampoco en los macrófagos⁵⁴.

Los linfocitos CD4⁺ no pueden fenotípicamente subclasificarse en grupos funcionales por la expresión del CD28 (por ejemplo, se detecta tanto en células CD4⁺ de

memoria como en células vírgenes o no primadas), pero se ha reconocido que esta molécula juega un papel decisivo en la generación de respuestas⁵⁵ del tipo Th1 o Th2 inducidas por diferentes APC. Así, si la APC es de estirpe macrofágica o célula dendrítica, la unión CD3⁺CD28⁺/CD80⁺APC es muy fuerte y la señalización muy intensa con lo que se favorecen la generación de respuestas de tipo Th1 (responsables de la inmunidad celular adquirida). Sin embargo, si la APC es una célula B, la interacción CD28-CD80 es más débil y su coestimulación menos intensa, por lo que se facilitan la generación de respuestas de tipo Th2 (inmunidad humoral específica).

Por el contrario, la presencia del CD28 en los linfocitos CD8⁺ permite disociar éstos fenotípicamente y funcionalmente. De hecho, a los *linfocitos CD8⁺CD28⁺* se les ha relacionado con actividades citotóxicas restringidas por el MHC de clase I, mientras que funciones supresoras y/o citotóxicas pero no restringidas por el MHC de clase I, han sido detectadas en las subpoblaciones CD8⁺CD28⁻, que además muestran signos de estar altamente activadas (DR⁺, CD57⁺, CD38⁺, CD71⁺)⁵⁶ e hiperreactivas.

Por todo ello, se acepta que el CD28 es un marcador fenotípico de los linfocitos CD3⁺, que caracteriza subpoblaciones efectoras en los linfocitos CD8⁺ y que, finalmente, participa decisivamente en la generación y tipo de las respuestas efectoras de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ restringidas por el MHC II y I, respectivamente.

2.1.2.3.- CD28 e infección por VIH.

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana produce cambios dramáticos en el sistema inmunológico, siendo los más constatados el descenso de los linfocitos CD4⁺ circulantes y la pérdida de su función helper (facilitadora), aún en sujetos VIH⁺ con cifras superiores a 500 CD4⁺/μl. En este sentido, la linfopenia CD4 observada en adultos, afecta selectivamente a las células CD4⁺CD28⁺ (sin compensación cuantitativa de los CD4⁺CD28⁻) tanto numérica como funcionalmente, puesto que sus valores absolutos y la actividad CD4⁺ helper se va perdiendo secuencial y progresivamente en los infectados por el VIH⁵⁷. Sin embargo, tanto en adultos⁵⁸ como en niños⁵⁹ infectados por el VIH, ha podido observarse que la característica linfocitosis CD8 detectada desde los estadios más tempranos de la infección, es también a expensas de un descenso porcentual de células CD8⁺CD28⁺ que se compensa por incrementos significativos de los linfocitos CD8⁺CD28⁻. En el control de la infección por el VIH las células CD8⁺ son las responsables de la eliminación de las células infectadas por el

virus. En este sentido, varios autores han propuesto que las células CD8⁺CD28⁻ podrían ser las verdaderas efectoras citotóxicas anti-VIH^{60,61} o quizás, por su capacidad para producir de factores supresores solubles anti-VIH sin restricción MHC-I, las verdaderas células supresoras de la replicación viral^{62,63}. Además, estas células CD8⁺CD28⁻ supresoras no citolíticas⁶⁴ muestran también marcadores de activación (HLA-DR)⁶⁵ y se ha planteado que el factor supresor podría ser una quimiocina⁶⁶ aún no identificada.

La disminución o ausencia en la expresión de CD28 en los linfocitos CD3⁺, se traduce en un descenso de su capacidad proliferativa *in vitro* ante estímulos que utilizan ambas vías de activación (tras la adición simultánea de anti-CD3 y anti-CD28). Este parámetro es un buen marcador funcional de la progresión de la inmunodeficiencia en adultos infectados por el VIH⁶⁷. El incremento observado de células CD8⁺CD28⁻, concomitante con el descenso de linfocitos CD4⁺ podría estar en consonancia con la intención de repoblar el *pool* de linfocitos T deplecionados, los cuales al salir de los órganos linfoides primarios carecerían del marcador de coestimulación⁶⁸. O, quizás, podrían ser una expansión de la población CD8⁺CD28⁺ en células terminalmente diferenciadas, con atenuación de la expresión del CD28^{69,70}.

Otro, de los muchos mecanismos que se han propuesto para explicar los defectos funcionales en los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ sería la inducción a una anergia⁷¹ de todos los linfocitos CD3⁺CD28⁻ causada por recepción persistente señales antigénicas (frecuente en la infección por el VIH) en ausencia de la imprescindible señal coestimuladora (CD28 dependiente).

A la vista de los anteriormente expuesto, la expresión del CD28 puede jugar un papel importante tanto en la tipificación de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, como en las actividades funcionales que les compete y, por ende, el análisis de su óptima expresión y actividad puede ser decisiva en el estudio de la evolución natural de la infección del VIH.

2.1.3.- Expresión de marcadores de activación linfocitaria

2.1.3.1.- Los marcadores de activación

La molécula HLA-DR (*Human Leukocyte Antigen*) es un antígeno de histocompatibilidad de tipo II (MHC II, *Class II Major Histocompatibility Complex*). Al pertenecer a la clase II del HLA, se expresa principalmente en las denominadas células presentadoras de antígenos. Pero además es una molécula inducible en los linfocitos T (que no

la expresan en reposo) tras ser activados por la doble señalización referida anteriormente⁷². De hecho, uno de los primeros hallazgos inmunofenotípicos en los linfocitos CD3⁺ de pacientes infectados por el VIH fue el aumento de la expresión de HLA-DR, y fue utilizado como marcador de mal pronóstico de la progresión de la enfermedad⁷³. La alta expresión de HLA-DR se observa en ambas poblaciones de linfocitos CD3⁺, los CD4⁺ y los CD8⁺, siendo mucho más significativa en la segunda⁷⁴. Habida cuenta del importante papel que juegan los linfocitos CD8⁺ citotóxicos en el control de la replicación del VIH, se ha sugerido que la sobreexpresión de marcadores de activación en su superficie podría ser una respuesta fisiológica a la infección.

La molécula CD38 es una glicoproteína transmembranaria de cadena simple de tipo II, que se expresa en precursores hematopoyéticos, se detecta en linfocitos post-tímicos recientemente diferenciados (especialmente en niños), se pierde en las células maduras en reposo, pero que se reinduce tras la activación celular⁷⁵. Además, el HLA-DR asociado a CD38 también se expresa en los progenitores linfoides^{76,77}. Las implicaciones funcionales de esta molécula no están claramente definidas. Sin embargo, recientemente se le atribuyó una función biológica como ectoenzima implicado en la regulación de los niveles de calcio intracelular a través de una vía independiente del inositol fosfato, estimulando la activación celular y la síntesis de citocinas⁷⁸. Además, el CD38 también ha sido implicado en las señales de proliferación de diversos linajes celulares y como moduladora de la adhesión entre linfocitos y células endoteliales⁷⁹ habiéndose identificado su ligando natural⁸⁰, el CD31⁸¹.

2.1.3.2.- Marcadores de activación e infección por VIH

Además de las alteraciones numéricas descritas anteriormente en los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de los infectados por el VIH, destaca la alta expresión de marcadores de activación en los linfocitos de sangre periférica (HLA-DR)⁸². En este sentido, estudiando las funciones antivirales de las distintas subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ se ha podido determinar que los linfocitos con actividad citotóxica expresarían HLA-DR⁸³ sólo o asociado el marcador CD38. Así, en la primoinfección esta población se expande y, su alta actividad citotóxica se relaciona con descensos de la viremia en esos momentos iniciales de la infección por VIH. De hecho la sobre-expresión de HLA-DR se correlaciona con fuertes viremias iniciales, mejor que ningún otro marcador celular⁸⁴ y, los incrementos más significativos de linfocitos CD8⁺HLA-DR⁺ se producen en aquellos indi-

viduos con mayor sintomatología durante este corto período de la primoinfección⁸⁵. Sin embargo, tras esta fase inicial de altas respuestas y gran eficacia inmunológica, durante el período crónico de la infección la persistencia de altas cifras de linfocitos CD8⁺HLA-DR⁺ con actividades citotóxicas, han sido correlacionada con una peor evolución de las cargas virales, e interpretado como que estas células podrían ser responsables de la continua y persistente destrucción de linfocitos CD4⁺.

La cinética de expresión de HLA-DR y CD38 en la población de linfocitos CD8⁺ durante el curso de la enfermedad es diferente. La expresión de HLA-DR aumenta bruscamente ya desde la primoinfección, manteniéndose incrementada y estable durante ésta, mientras que el CD38 aparece gradualmente⁸⁶. La simultánea expresión de HLA-DR y CD38, e incluso su detección en células no primadas (inmaduras) reflejan, tanto la intensidad, como la persistencia de la activación celular^{87,88}.

Adicionalmente, en el diagnóstico precoz de la infección pediátrica por VIH, la valoración de los Linfocitos CD8⁺HLA-DR⁺ circulantes es significativamente importante. Así, en los primeros días de vida extrauterina, un 20% a un 50% de los niños infectados muestran positividad para el VIH por técnicas de PCR o co-cultivo viral, por lo que se postuló que estos serían los que habían adquirido la infección durante la vida uterina⁸⁹. Independientemente, otros autores cuantificaron la expresión del HLA-DR en los linfocitos CD8⁺ durante la primera semana de vida y observaron que altas expresiones de HLA-DR se asociaban con positividad en los co-cultivos de VIH o en las PCR-DNA realizadas, estableciéndose que la cuantificación de linfocitos CD3⁺CD8⁺HLA-DR⁺ (ausente en recién nacidos normales) es útil como marcador, precoz y fácil de realizar, en el diagnóstico de la infección intrauterina⁹⁰.

En adultos, con infección crónica por el VIH y que no estén recibiendo tratamiento antirretroviral, se ha observado una alta correlación entre la alta expresión de marcadores de activación en los linfocitos CD4⁺ y los niveles altos de carga viral plasmática⁹¹. Sin embargo, dado que la mayor parte de la replicación viral ocurre en los tejidos linfoides es, en estos territorios, donde se ha evidenciado una mayor expresión de HLA-DR en la población⁹² CD4⁺, aunque estas células no se muestren en sangre periférica. De hecho, como el virus integrado en los linfocitos CD4⁺ precisa de la activación de la célula que lo soporta para poder expresarse y expandirse, se ha postulado que el mantenimiento de una alta tasa de activación de células CD4⁺, al menos a nivel tisular, podría ser un signo evidente de la replicación activa del VIH⁶². La existencia de VIH integrado, incluso en linfocitos CD4 en reposo (reservorio latente) es, incluso en

pacientes con muy buena supresión viral, la causa fundamental del fracaso terapéutico en la "erradicación" definitiva del virus. La activación de estas "células reservorio" genera intensos rebrotes virales y alta diseminación sistémica. De hecho tratamientos con corticoides, que disminuyen la cantidad de HLA-DR en la población CD4⁺ se ha asociado a disminuciones en los valores de carga viral o antigenemia⁹³, mientras que los tratamientos con citocinas, como la IL-2, producen rebrotes de carga viral⁹⁴. Es más, el VIH bajo fuerte presión farmacológica puede originar mutaciones y resistencias a los tratamientos^{95,96}.

Existen evidencias⁹⁷ de que en los seropositivos para el VIH hay una gran proporción de linfocitos CD8⁺CD38⁺. De hecho, destaca la relación inversa observada entre los aumentos de linfocitos CD8⁺CD38⁺ y el descenso de los linfocitos CD3⁺CD4⁺, cuya evaluación simultánea ha sido utilizada como marcador predictivo de la linfopenia y de peor pronóstico de la infección⁹⁸ y mayor riesgo de desarrollar sida⁹⁹. Más recientemente, los valores de CD8⁺CD38⁺ como parámetro analítico son útiles en las evaluaciones de las eficacias de las terapéuticas empleadas, incluso en estudios retrospectivos con linfocitos criopreservados¹⁰⁰. Así pues, en la infección por el VIH la expresión de HLA-DR y CD38 en los linfocitos periféricos es elevada tras la primoinfección, descendiendo durante la fase asintomática y luego aumenta en los momentos próximos al desarrollo del sida¹⁰¹. Por ello, cifras altas de CD8⁺CD38⁺ son un marcador de mal pronóstico y su estudio se considera útil en la evaluación de la eficacia de los TARGA en los infectados, tanto adultos como niños¹⁰².

Aunque se ha encontrado una buena correlación entre la disminución de linfocitos CD8⁺CD38⁺ y la reducción de la viremia plasmática¹⁰³, esta correlación no parece existir con los niveles de linfocitos CD4⁺CD38⁺circulantes. Es más, en niños VIH⁺, los niveles de linfocitos CD4⁺CD38⁺ parecen correlacionarse inversamente con la sobreinfección. Esto es, la sobreexpresión de CD38 en linfocitos CD4⁺ disminuye (con carácter protector) la susceptibilidad a la infección por el VIH en estas células, quizás al impedir la interacción entre gp120 y CD4^{104,105}. En este sentido, se ha constatado que los linajes de monocitos y macrófagos, que expresan abundantemente CD38, no presentan los clásicos efectos citopáticos de VIH¹⁰⁶. Estas evidencias llevaron a varios autores a postular que la sobre-expresión de CD38 podría ser un protector de la muerte celular inducida por el VIH¹⁰⁷ en algunas células inmunológicas y, por el contrario en otras, el identificador de las acciones letales que mediatizan.

Adicional a los estudios realizados con células CD38⁺, a los linfocitos que no expresan este marcador (CD38⁻) también se les ha implicado en la patogenia del VIH. En este sentido, recientemente se ha descrito que una población de linfocitos CD3⁺CD4⁺CD38⁻ obtenida de pacientes VIH⁺, muestra una gran actividad citotóxica anti-CD3 y podrían estar implicada, al menos en parte, en la depleción de linfocitos CD4⁺ (infectados o no) mediada por mecanismos apoptóticos¹⁰⁸.

2.2.- Los ensayos de proliferación linfocitaria

El recuento de las poblaciones y subpoblaciones linfocitarias en sangre periférica son las determinaciones más habituales, rápidas y sencillas, en la evaluación inmunológica de los pacientes VIH⁺. Sin embargo, al ser los linfocitos de las pocas células del organismo que son capaces de dividirse y, por ende, multiplicarse clonalmente, la medición de las respuestas linfo-proliferativas *in vitro* ante diferentes estímulos, se presenta como una técnica fundamental para evaluar la capacidad funcional del sistema inmunológico. Aún así, estos estudios funcionales distan de ser rápidos y de sencilla ejecución pues, la proliferación celular inducida es un evento muy complejo que implica el establecimiento de una señal o un conjunto secuencial de señales en la membrana celular. Ello conduce a la activación de diferentes rutas intracelulares de transducción de señales, seguidas de la activación de la transcripción de uno o varios genes, posteriormente la síntesis de ADN (único parámetro que se cuantifica, ver más adelante) y finalmente la mitosis o división celular.

Varios factores metodológicos son críticos para que las respuestas que se miden sean una buena aproximación a lo que se busca. Entre todos ellos, es importante destacar:

1.- La selección y viabilidad de las células en el momento del inicio del cultivo. De hecho, en el aislamiento de las células inmunocompetentes se pueden producir tanto la pérdida o el enriquecimiento selectivo de células, como la muerte por manipulación de algunas de ellas. Es más, si se analizan células criopreservadas, es importante cerciorarse de que se recupera una buena viabilidad celular de células no seleccionadas.

2.- Los estudios deben de garantizar que las condiciones físico-químicas empleadas sean, en todo momento las idóneas: la elección del suero empleado (que es un complemento proteico imprescindible), la presencia o no una posible contaminación microbiana (de origen exógena), así como la estabilidad ambiental de los cultivos: CO₂,

temperatura, humedad y pH. Además, al ser en algunos casos cultivos de larga duración (más de 5 días), la acumulación en el medio de detritus celulares o de productos finales del metabolismo, puede inhibir inespecíficamente (falsas deficiencias) la proliferación celular.

3.- La falta o número insuficiente de células presentadoras de antígenos. Debido a los procesos previos que se utilizan para enriquecer los cultivos en diversos tipos celulares, se pueden perder estas células accesorias, que son importantes para el mantenimiento de la viabilidad o la generación de la respuesta biológica de los linfocitos. De hecho, en ausencia de células presentadoras de antígenos no se obtienen buenas proliferaciones de linfocitos ante las estimulaciones con mitógenos o antígenos. Una forma de cortocircuitar este problema, es valorar las respuestas proliferativas mediante la adición de ésteres de forbol a los cultivos (como el APM) junto con algún ionóforo de calcio, que permite la activación directa a los linfocitos con independencia de la actividad de los monocitos.

La proliferación celular se determina generalmente mediante una estimación de la incorporación de un precursor de la síntesis de los ácidos nucleicos que ha sido marcado radiactivamente. Para ello, se utiliza un nucleósido, la timidina marcada con tritio, [³H]timidina. Dado que es el único que no forma parte del ARN, toda la radiactividad que se detecte representará al ADN que se ha sintetizado por los linfocitos cultivados tras su activación por el estimulante empleado. La sensibilidad de esta técnica es tal, que pequeñas variaciones en las concentraciones celulares sembradas pueden dar lugar a resultados difíciles de interpretar. Este método tiene la ventaja de que da información sobre la actividad funcional global en cultivos con poblaciones celulares mixtas (T, B, NK, Monocitos), pero el inconveniente de que no da información precisa de identificación de la célula sintetizadora (como podría proporcionar la citometría de flujo). El mayor inconveniente en los ensayos de proliferación referidos es el uso de isótopos radiactivos, pues su realización queda restringida a laboratorios autorizados.

Existe una gran variedad de agentes que se puede utilizar para la inducción de la proliferación de linfocitos. Técnicamente, estos deben ser evaluados previamente para determinar en cada caso la dosis adecuada, pues en general la respuesta ante estos estímulos suele ser de tipo campana: la proliferación aumenta con la concentración del estímulo, hasta llegar a un punto de máxima proliferación, a partir del cual

incrementos de concentración de mitógeno resultan tóxicos y provocan en una disminución de la síntesis de ADN. Los siguientes estimulantes, por orden decreciente de potencia mitogénica, son los más ampliamente utilizados:

- Como mitógenos destacan las lectinas, que son proteínas derivadas de vegetales que se unen a carbohidratos de la superficie de los linfocitos. Entre ellas: la Fitohemaglutinina (PHA), la Concanavalina A (ConA) y el Pokeweed Mitogen (PWM). Los dos primeros estimulan a los linfocitos T mientras que el PWM actúa tanto sobre los linfocitos T como los B.

- Anticuerpos monoclonales, dirigidos contra moléculas de la superficie celular. Entre otros, anti- μ , -CD3, -CD28, -CD69 y una combinación de -CD2/-CD2a.

- Determinantes antígenos de alérgenos y microorganismos. La toxina tetánica, el PPD, fracciones proteicas de virus o alérgenos, etc.

- Y como coestimuladores, los anteriormente citados ésteres de forbol e iónóforos del calcio.

Esta amplia dotación de agentes inductores de la proliferación linfocitaria, permite una mejor selección de los estimulantes a emplear que varía en función de las respuestas proliferativas que se deseen explorar.

2.2.1.- Aplicaciones clínicas de los ensayos de proliferación

Los ensayos de proliferación celular son especialmente útiles en diversas situaciones clínicas:

- 1.- Evaluación de la competencia inmunológica de los linfocitos T y B ante estímulos policlonales (los mitógenos o ciertos anticuerpos monoclonales contra moléculas de la superficie de las células linfoides) que son capaces de transmitir señales intracelulares. Las deficiencias proliferativas pueden ser indicativas de mecanismos alterados en las células receptoras del estímulo e implicadas en las respuestas inmunológicas o también en señales originadas en células accesorias o colaboradoras.

- 2.- Evaluación de las respuestas linfocitarias específicas (en sujetos expuestos) ante un antígeno sensibilizante. Los resultados informan sobre si la persona analizada está o no sensibilizada (si ha tenido contacto previamente con el antígeno o alérgeno) y si su nivel de respuesta es el adecuado (respuestas deficitarias o hiperreactivas).

- 3.- Determinación de la compatibilidad tisular ante el HLA en cultivos mixtos de linfocitos, como por ejemplo la fase previa a cualquier trasplante que se pueda programar con la suficiente antelación.

4.- Además, los ensayos de proliferación son una herramienta fundamental para los estudios de investigación pues permiten explorar *in vitro* la activación y la inhibición celular, sus mecanismos implicados y la influencia de diversos agente moduladores (citocinas, prostaglandinas, receptores, etc.).

2.2.2.- La capacidad proliferativa de los infectados por el VIH

Dependiendo de la velocidad de progresión de la inmunodeficiencia, la infección por el VIH provoca alteraciones **cuantitativas** en el número de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (linfopenia CD4 y linfocitosis CD8) evidenciables tiempo después de la primoinfección. Sin embargo, los defectos **cualitativos** de estos componentes celulares del sistema inmunológico, inducidos por la presencia del virus, se pueden detectar con anterioridad. Así, la capacidad proliferativa *in vitro* de las células mononucleares de sangre periférica, PBMC, ante mitógenos está seriamente mermada ántes incluso de que se evidencien otros signos celulares de la infección^{109,110,111}. Los estimulantes celulares más selectivos o "menos potentes" pueden mostrar defectos tempranos en la capacidad blastogénica de las poblaciones linfocitarias, destacando entre ellos como precoces¹¹² el PWM y los anticuerpos monoclonales anti-CD3, y especialmente los antígenos vacunales, que son los primeros en perderse¹¹³. Por otro lado, la experiencia acumulada desde el comienzo de la pandemia, muestra que respuesta ante mitógenos "más potentes" como la PHA permanece inalterada durante mucho más tiempo¹¹⁴, y sólo se hacen evidentes cuando verdaderamente existe una afectación significativa de linfocitos CD4⁺ (muchas veces por debajo de 200 células/ μ l)¹¹⁵. Por ello, la pérdida de las reactividades de los linfocitos ante las estimulaciones *in vitro* son marcadores predictivos de la severidad y progresión hacia la inmunodeficiencia, independientemente del recuento de linfocitos CD4⁺^{116,117}. Uno de los mecanismos que se han implicado en la pérdida de la capacidad proliferativa de los linfocitos de los seropositivos, es la alta tasa de producción de IL-10, una citocina con un marcado carácter inmunosupresor^{118,119}. Sin embargo, la escasa producción y/o utilización *in vitro* de IL-2 en los infectados^{120,121} son las causas más comunes que justifican las deficiencias proliferativas de estos pacientes.

Los ensayos de proliferación pueden, a la vez que valorar la pérdida de competencia inmunológica¹²², explorar la recuperación de las funciones linfoideas tras las terapias instauradas, y con ello valorar la eficacia terapéutica en su conjunto¹²³. Sería deseable que los tratamientos que reduzcan la tasa de replicación del VIH, permitan

que se recuperen la cantidad y calidad de las células inmunes¹²⁴, cuya reconstitución se evidencie no solamente en los estudios de linfo-proliferación *in vitro*, sino también en la capacidad celular para sintetizar y segregar citocinas^{125,126}.

2.3.- Citocinas

2.3.1.- La regulación de la respuesta inmune

El sistema inmunológico es una parte del organismo que comprende tanto órganos y tejidos como diversos tipos celulares que circulan libremente. El desarrollo y funcionamiento del sistema inmunológico depende, en gran medida, de que todos estos componentes estén presentes y, además, perfectamente orquestados. Para ello, las células implicadas en la respuesta inmune producen una serie de glicoproteínas que están implicadas en el crecimiento y la diferenciación celular y, decisivamente, en la regulación de la inmunidad y la inflamación. A estas proteínas, que se parecen mucho a las hormonas, se les denomina genéricamente citocinas. A diferencia de las hormonas, que ejercen su acción paracrina sistémica, las citocinas se producen y se consumen, fundamentalmente, en el ámbito tisular, tanto de forma autocrina (por la célula productora) como paracrina (por una célula próxima y no productora). Las células linfoides no las producen de forma constitutiva ni las acumulan en vesículas, pues sólo las sintetizan tras la estimulación celular. Son mediadores muy potentes (relación actividad/masa) y sus vidas medias en el plasma son muy cortas. Cada citocina sólo interacciona con su receptor específico, que se halla presente en la membrana de las células dianas. Estos receptores son de alta afinidad, se expresan en muy baja cantidad en las membranas plasmáticas y generalmente están formados por al menos 2 cadenas (en su mayoría heterodiméricas) con funciones diferentes pero complementarias: una se une a la citocina y la otra trasmite la señal de esa unión a la célula receptora. Sin embargo, todas ellas se caracterizan funcionalmente por el pleiotropismo y la redundancia, es decir, que cada una ejerce múltiples funciones dependiendo de la diana celular, y que una función concreta puede ser ejercida por varias de ellas.

Mucho del interés científico se ha centrado en el estudio de estas moléculas inmunorreguladoras, que mantienen la homeostasia del sistema inmunológico. Se han definido dos tipos de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (Th1-Th2 y Tc1-Tc2, respectivamente) en función del perfil de citocinas que son capaces de producir ante la estimulación¹²⁷. Los linfocitos Th1-Tc1 (en lo sucesivo Th1), sintetizan IL-2 e interferón gamma (IFN- γ) y

promueven la inmunidad mediada por células y la activación de los macrófagos. Por el contrario, los linfocitos Th2-Tc2 (en lo sucesivo Th2) sintetizan IL-4, IL-5 e IL-10, y proporcionan las señales biológicas necesarias para inducir la síntesis de inmunoglobulinas por los linfocitos B, es decir, promueven la aparición de las respuestas de tipo humoral^{128,129}. Las respuestas inflamatorias inducidas por los linfocitos Th1 favorecen las respuestas citotóxicas, que son necesarias para eliminar patógenos intracelulares y células tumorales, mientras que las respuestas inducidas por los linfocitos Th2 son más efectivas en el control de las enfermedades producidas por microorganismos extracelulares, como son la mayoría de las bacterias.

2.3.2.- Citocinas de tipo Th1

La interleucina 2 (IL-2) es una glicoproteína monomérica de 15 kDa¹³⁰ sintetizada y secretada por los linfocitos T, principalmente por los helper (CD4⁺), tras su estimulación antigénica o tras su activación *in vitro* con mitógenos¹³¹. La respuesta de los linfocitos helper a la activación es la simultánea expresión IL-2 y de su receptor, y la consecuente expansión clonal de las células estimuladas por el antígeno. La IL-2 es, por ello, un factor autocrino, aunque también actúa de forma paracrina, estimulando a las otras células que estén presentes en ese lugar. Al estímulo de la IL-2 responden también los linfocitos B¹³² y los NK¹³³, los macrófagos¹³⁴ y los neutrófilos¹³⁵. La actividad biológica de IL-2 viene mediada por la unión de esta a su receptor específico en la superficie de las células¹³⁶. La IL-2 posee un papel central en la respuesta inmune por lo que interferencias en su síntesis o la manipulación en su utilización tiene importancia fisiopatológica o terapéutica.

El interferón gamma (IFN- γ) es una proteína multifuncional que posee marcada actividad antiviral. Está producida¹³⁷ por linfocitos T y NK y se distingue de los otros interferones en su alto peso molecular, 25 kDa, y su estabilidad a cambios de pH y temperatura¹³⁸. Entre sus actividades biológicas merece ser destacado el aumentar la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC de clases I y II¹³⁹), el cual es necesario para la presentación de los antígenos intra y extracelulares y así promover la citotoxicidad¹⁴⁰ mediada por células y TNF- α .

2.3.3.- Citocinas de tipo Th2

La interleucina 4 (IL-4) es una glicoproteína de 19 kDa¹⁴¹ producida en linfocitos activados cuya actividad funcional se ejerce, por unión al receptor específico, tanto

en células de la estirpe hematopoyética, como en otros tipos celulares¹⁴². Entre todas sus pleiotrópicas funciones destacaremos el promover la síntesis de inmunoglobulinas¹⁴³ e inducir la proliferación de linfocitos B¹⁴⁴.

La interleucina 5 (IL-5) es un homodímero glicosilado con una masa molecular de 45 kDa¹⁴⁵. La IL-5 se produce en linfocitos T activados¹⁴⁶ y ejerce su actividad sobre eosinófilos, basófilos y linfocitos B. Tras la interacción con su receptor, la IL-5 promueve la síntesis de inmunoglobulinas en los linfocitos B y la proliferación y diferenciación de los eosinófilos¹⁴⁷. Al ejercer su acción sobre eosinófilos y basófilos, se le ha implicado patológicamente en procesos inflamatorios y de hipersensibilidad.

La interleucina 10 (IL-10) fue descrita en sus comienzos como un factor producido por clones de linfocitos helper que inhibía la síntesis de los demás tipos de citocinas¹⁴⁸. Es una citocina pleiotrópica que puede ejercer acciones tanto inmunosupresoras como inmunoestimuladora, dependiendo de la célula que reciba su señal. Las más importantes son la inducción de la proliferación¹⁴⁹ en clones del tipo Th2 y la inhibición de la síntesis de IFN- γ e IL-2 en los clones de tipo Th1.

2.3.4.- Citocinas proinflamatorias

La interleucina 6 (IL-6) es una proteína multifuncional de 26 kDa¹⁵⁰ producida tanto por células linfoides como no linfoides (también se le denominó interferón beta 2). Entre las primeras destacan los linfocitos T y B y los macrófagos. Los hepatocitos, fibroblastos y células endoteliales¹⁵¹ también son una fuente importante de IL-6. Su producción está inducida tanto de forma antigénica, como inespecífica por agentes inflamatorios. Sus efectos sobre las células que porten su receptor en la membrana plasmática son muy variados. Entre ellos destacaremos la estimulación de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y la síntesis de anticuerpos¹⁵². Además, en los hepatocitos, la IL-6 induce la producción de las proteínas de fase aguda¹⁵³.

El factor de necrosis tumoral alpha¹⁵⁴ (TNF- α), también denominado caquectina, es un polipéptido de 17 kDa que forma multímeros de dos o tres subunidades¹⁵⁵. El TNF- α posee actividades muy pleiotrópicas y contrapuestas, dependiendo de cual sea su célula diana. Entre las relacionadas con el sistema inmunológico destacaremos, la actividad antiviral, la citotóxica a través de receptores de muerte en la membrana celular y la activación de los neutrófilos y las respuestas de fase aguda¹⁵⁶.

2.3.5.- Citocinas e infección por el VIH

Las citocinas están implicadas en la inmunopatogenia del VIH en dos ámbitos diferentes. Por un lado, el efecto que ciertas citocinas tienen sobre la replicación viral y, por otro, el desequilibrio inducido por el VIH de la homeostasis del sistema inmunológico.

El efecto que diversas citocinas ejercen sobre la replicación de VIH¹⁵⁷ *in vitro* se ha estudiado extensivamente. Existe una correlación directa entre la activación celular y la replicación del VIH, por lo que se deduce que los mecanismos que activan a los linfocitos deben estar implicados en expresión de los genes virales. El primer agente inductor del VIH descubierto fue el TNF- α , que ejercía esta acción de forma autocrina y paracrina¹⁵⁸. Además de éste, otras citocinas incrementan o inhiben la replicación del virus *in vitro*, unas de forma autocrina y otras de forma paracrina. En este sentido, destacan como facilitadores de expansión del VIH la IL-1¹⁵⁹, IL-2¹⁶⁰, IL-4¹⁶¹ y como represoras de la misma los interferones^{162,163}.

En la infección por el VIH, la función cooperadora (helper) de los linfocitos CD4⁺ se pierde mucho antes de que se pueda evidenciar una depleción de esta población, sugiriéndose que muy diversos factores podrían estar contribuyendo a la progresión de la inmunodeficiencia. En este sentido, la producción de un perfil inapropiado de citocinas en respuesta a un insulto para el organismo puede conducir a una exacerbación de la enfermedad, más que a su control. En general, se acepta que la presencia de potentes respuestas de tipo Th1 conduce a la generación y activación de las respuestas citotóxicas (linfocitos CD8⁺) que son las acciones efectoras más efectivas para combatir a los virus.

Parece evidente que, en la infección por el VIH, un predominio de las respuestas de tipo Th1 sería lo más deseable para combatir al virus. En este sentido, la activación de los linfocitos CD8⁺, que también son productores de citocinas de tipo Th1 (denominados Tc1), pueden incrementar el predominio de este tipo de respuestas. Es más, ya desde los comienzos de la pandemia de sida se observó que muchos de los problemas relacionados con la infección por el VIH estaban mediados por las citocinas y, para intentar comprender mejor la inmunopatogenia del VIH, se estudiaron tanto los perfiles de citocinas plasmáticas como su producción *in vitro*. Las respuestas deficientes *in vitro*, no sólo resultaban en déficits proliferativos, sino también en déficits de

secreción de IL-2^{164,165}, e incrementos de producción de citocinas de tipo Th2^{166,167}. Por todas estas evidencias, se sugirió que el VIH desequilibra la homeostasis inmunobiológica y provoca un cambio en el perfil normal de citocinas (Th1>Th2) con un predominio de las Th2 sobre Th1^{141,142}. Ello podría contribuir la progresión de la enfermedad, la susceptibilidad a enfermedades oportunista y la aparición de neoplasias^{168,169,170,171,172,173}. Los mecanismos que explicarían en cambio de dominancia, y si realmente ocurre *in vivo*, aún están por dilucidar¹⁷⁴.

A la hora de estudiar las citocinas no se puede olvidar que los individuos VIH⁺, al ser inmunodeficientes, son susceptibles de coinfectarse con otros microorganismos, desde parásitos helmínticos hasta otros virus. Cualquier microorganismo invasor es capaz de inducir que las células del sistema inmunológico produzcan el patrón concreto de citocinas que sea el más efectivo para su erradicación. En muchos casos, al coincidir varios tipos de respuestas, se podrían provocar más una descoordinación funcional que una eficaz lucha orquestada.

2.- Objetivo

El objetivo del presente trabajo es estudiar la recuperación inmunológica de niños infectados verticalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana tras un periodo prolongado de TARGA.

El estudio comienza antes de iniciar la administración de los TARGA (periodo basal), lo que permite evaluar por un lado, el grado de supresión viral conseguido con los tratamientos convencionales previos y, por otro lado, las profundas alteraciones inmunológicas que presentan los pacientes en el período crónico de la infección por el VIH+.

A partir del momento basal, se analiza durante 4 años consecutivos de TARGA, la reconstitución de diversos parámetros inmunológicos deficientes o hipertrofiados, según fuera la intensidad y persistencia de la supresión viral conseguida. Para ello, tras clasificar los pacientes en grupos de eficacia terapéutica antiviral, en muestras de sangre periférica obtenidas evolutivamente, se analizaron:

- Las poblaciones linfocitarias CD4+ y CD8+.
- Las subpoblaciones de linfocitos efectores (CD28), el grado de maduración (CD45RA, CD45R0) y de activación celular (CD38, HLA-DR).
- Las respuestas proliferativas linfocitarias a estímulos policlonales.
- La secreción policlonal de citocinas Th1, Th2 y Proinflamatorias, y
- El equilibrio Th1/Th2 y Proinflamatorio en plasma.

La eficacia inmunológica de los TARGA se valoró, al comparar los resultados obtenidos en los pacientes con los valores de niños normales VIH-, teniendo en cuenta:

- El grado de recuperación: total, parcial o inexistente.
- El momento evolutivo de aparición: precoz, temprano o tardío, y
- La persistencia en el tiempo: mantenida o transitoria.

4.- Material y Métodos

4.- Material y Métodos	47
4.1.- Descripción de la cohorte	48
4.1.1.- Duración del estudio	51
4.1.2.- Agrupamiento de los niños para el estudio	51
4.2.- Determinación de la carga viral	52
4.3.- Citometría de flujo	53
4.4.- Ensayos de proliferación linfocitaria	54
4.5.- Síntesis “in vitro” de citocinas	56
4.6.- Cuantificación de citocinas	56
4.7.- Análisis estadístico	58

4.1.- Descripción de la cohorte

a) Niños controles VIH-. Al plantearse el estudio de la dinámica de subpoblaciones linfocitarias en el sida pediátrico, el primer aspecto que hay que considerar es que el sistema inmunológico de los niños es inmaduro y que cambia significativamente con la edad hasta alcanzar, hacia los 5 años, un estado de maduración y equilibrio suficiente para equipararse al de los adultos. En este estudio se han utilizado como controles las muestras procedentes de 60 niños sanos, con edades comprendidas entre los 6 y los 18 años. Sus datos inmunológicos serán utilizados como valores de referencia en este trabajo.

b) Niños infectados por el VIH. El presente estudio muestra los datos inmunológicos observados en niños infectados verticalmente por el VIH, que son atendidos en la Sección de Infecciosos, Aislamiento 2, del Hospital Infantil La Fe de Valencia. En todos ellos, el virus fue transmitido durante la gestación o el parto (transmisión materno-fetal). El plan de seguimiento del sida pediátrico del Hospital La Fe garantiza unas evaluaciones periódicas a todos los infectados, entre dos y cuatro determinaciones programadas al año, y por supuesto, en caso de necesidad entre las citaciones.

Del total de los niños en seguimiento se han seleccionado 34 pacientes, pero "sólo y exclusivamente" en función de que cada niño hubiera recibido tratamiento TARGA durante 4 años consecutivos y, se dispusieran de muestras y/o resultados analíticos en los diferentes momentos del estudio. Los datos individuales de los 34 niños en el **momento BASAL** (antes de comenzar TARGA) se detallan en la tabla 4.1:

La *distribución entre sexos* es la siguiente, 21 hombres y 13 mujeres.

La *edad media* (años) al inicio del TARGA 8,1; Rango [4,9-14,3].

Categorías Inmunológicas basales:

- en **C.I. #1**: Niños sin inmunosupresión (n=10). Mostraron medianas de linfocitos CD4+ durante el periodo basal superiores a 500 cel/ μ l o porcentajes mayores del 25% del total de linfocitos.

- en **C.I. #2** : Niños con moderada inmunosupresión (n=12). Se caracteriza por mostrar medianas basales de linfocitos CD4+ entre 200 y 500 cel/ μ l o porcentajes entre 15-25%.

- en **C.I. #3**: Niños con inmunosupresión severa (n=12). Se define por presentar medianas basales de linfocitos CD4+ menores de 200 cel/ μ l o porcentajes inferiores al 15%.

Tratamientos antirretrovirales previos (Rx):

- **1RTI** (n=17). Niños que sólo habían recibido antirretrovirales, el mismo o alternante, en monoterapia y nunca en combinación.

- **2RTI** (n=9). Niños que recibieron biterapia en forma de combinaciones de dos inhibidores de la transcriptasa reversa.

- **1RTI y 1PI** (n=8). Los pacientes que recibieron biterapia combinando un RTI y un inhibidor de la proteasa.

Cargas Virales basales:

- **baja** (n=15) cuando ésta fue inferior a 10.000 copias/ml y

- **alta** (n=19) si era superior a 10.000 copias/ml.

Pte.	Sx	Eficacia TARGA	Momento basal							
			edad (años)	Rx	Viremia (copias/ml)	C.I.	Linf. CD4		Linf. CD8	
							%	cells/ μ l	%	cells/ μ l
1	V	Alta	11,0	1RTI+ 1PI	200	2	28	396	50	1.183
2	H	Alta	10,9	1RTI+ 1PI	199	3	6	107	66	881
3	H	Alta	8,8	1RTI	312.626	3	3	31	59	604
4	H	Alta	7,8	2RTI	758	1	41	674	33	543
5	V	Alta	6,4	1RTI	20.858	2	12	307	59	1.761
6	V	Alta	8,8	1RTI+ 1PI	199	1	29	499	53	939
7	V	Alta	7,0	2RTI	9.900	1	37	1.184	40	1.281
8	H	Alta	4,9	2RTI	4.533	1	27	1.053	46	1.615
9	H	Alta	14,3	1RTI	4.789	3	4	43	69	745
10	V	Alta	7,0	1RTI	641	1	39	1.315	38	1.187
11	H	Alta	9,0	1RTI	3.414	2	17	396	63	1.399
12	V	Baja	8,1	1RTI+ 1PI	30.003	3	9	173	65	1.119
13	H	Baja	9,3	1RTI	64.897	2	19	396	62	1.262
14	V	Baja	8,7	1RTI	7.541	2	15	451	63	1.956
15	H	Baja	8,3	1RTI+ 1PI	12.708	3	8	107	64	906
16	H	Baja	10,9	1RTI	260.450	2	23	204	48	426
17	V	Baja	11,4	1RTI+ 1PI	10.319	2	13	208	57	985
18	V	Baja	8,6	1RTI	4.824	3	12	88	37	293
19	H	Baja	7,5	1RTI	14.771	1	31	1.010	43	1.383
20	H	Baja	10,7	1RTI	125.750	3	2	12	50	280
21	H	Baja	5,3	1RTI	317.073	2	13	382	52	1.350
22	H	Baja	8,0	1RTI	2.156	3	7	79	72	906
23	H	Baja	8,8	1RTI	7.236	3	15	161	47	512
24	V	Media	7,8	1RTI	29.005	2	30	434	44	619
25	H	Media	10,3	2RTI	9.940	3	13	191	67	987
26	V	Media	9,4	1RTI	12.814	3	3	16	14	66
27	H	Media	9,8	2RTI	100.001	2	13	329	73	2.156
28	H	Media	7,3	1RTI+ 1PI	14.642	1	24	577	37	1.010
29	V	Media	6,8	2RTI	32.548	2	22	458	53	1.109
30	H	Media	7,7	2RTI	15.408	1	39	990	34	854
31	H	Media	5,7	1RTI+ 1PI	111.615	3	2	40	56	1.154
32	H	Media	6,0	1RTI+ 1PI	28.827	2	23	480	40	760
33	H	Media	6,4	1RTI	24.130	1	25	578	41	878
34	V	Media	5,3	2RTI	13.322	1	47	1.434	36	1.086

Tabla 4.1. Descripción de la cohorte. La tabla muestra las características basales de los niños incluidos en el estudio. Pte, Paciente; Sx, Sexo; Rx, Tratamiento; C.I., Categoría Inmunológica; %, porcentaje sobre el total de linfocitos.

En los 34 niños VIH⁺ se ha valorado el efecto de los *tratamientos antirretrovirales de gran actividad, (TARGA)*, sobre los marcadores inmunológicos de progresión de la inmunodeficiencia. Se ha definido al TARGA como la combinación de tres o más fármacos anti-VIH siempre que se incluya como mínimo un inhibidor de la proteasa del VIH. El momento anterior al TARGA, también denominado **pre-TARGA o basal**, se considera tanto la mono como la biterapia administrada.

4.1.1.- Duración del estudio

El estudio retrospectivo tiene una duración total de cinco años consecutivos, que comienza un año antes (**basal**) de que cada paciente empiecen a recibir el TARGA y finaliza al acabar el cuarto año de TARGA. En cada uno de los periodos considerados (basal, 1º, 2º, 3º y 4º año) se muestran la medianas, rango de valores y número de determinaciones para cada parámetro y en cada grupo de estudio. Estos periodos se han considerado de dos formas distintas:

- Para los estudios de identificación celular, al disponer de suficientes determinaciones en cada año, la secuencia cronológica se ha agrupado de la siguiente forma: basal, y TARGA, dividido éste como **momentos**: 1º año, 2º año, 3º año y 4º año.

- Para los ensayos de funcionalidad linfocitaria y los análisis de citocinas, como el número de determinaciones era menor y con vistas a poder hacer estudios estadísticos, la secuencia cronológica fue la siguiente: basal y TARGA dividido en dos momentos, a saber, **temprano** (1º y 2º año) y **tardío** (3º y 4º año).

4.1.2.- Agrupamiento de los niños para el estudio

Para evaluar el efecto de los TARGA sobre la recuperación del sistema inmunológico, los niños infectados por el VIH han sido agrupados en función de su respuesta viral (carga viral) a los TARGA. El único criterio para valorar la eficacia de los TARGA en este estudio ha sido la evaluación de las modificaciones que sufre la carga viral con el tratamiento. Los tres grupos por Eficacia considerados son:

- Los niños que presentan **alta eficacia (n=11)**: muestran un descenso de sus cargas virales, desde el primer año y mantenidas durante todo el estudio, hasta valores indetectables (supresión viral efectiva y persistente). La mediana de todo el periodo TARGA fue de 199 copias/ml con un rango de 9.659 copias/ml.

- Por otro lado, los niños que presentan **eficacia media (n=11)** son aquellos en los que el TARGA consigue disminuir las cargas virales basales en al menos un lo-

garitmo, pero sin llegar a ser indetectables. Además es un efecto que se observa solamente el momentos tardíos, a partir del 3 año, de evolución del TARGA. La mediana de todo el periodo TARGA fue de 9.050 copias/ml con un rango de 749.951 copias/ml.

- Por último, los niños que muestran una **baja eficacia (n=12)** son aquellos que no consiguen disminuir significativamente sus cargas virales basales en ningún momento del estudio, a pesar de recibir los TARGA. La mediana de todo el periodo TARGA fue de 55.850 copias/ml con un rango de 749.802 copias/ml.

4.2.- Determinación de la carga viral

Estas determinaciones se realizaron sistemáticamente en el Servicio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario La Fe. En muestras sanguíneas frescas (menos de 2 horas tras la extracción) y anticoaguladas con EDTA (nunca heparina porque inhibe la PCR), se determinó la cantidad libre de viriones del VIH mediante una RT-PCR comercial, siguiendo las recomendaciones del fabricante (Amplicor HIV monitor, Roche Diagnostic Systems, Spain). Consiste en una PCR (reacción en cadena de la polimerasa), pero con un paso previo que incluye la conversión del ARN viral en ADN complementario mediante la transcriptasa reversa (RT). Se ha utilizado el método estándar de preparación de las muestras, situándose el umbral de detección de esta técnica en 200 copias de ARN viral/ml.

La técnica consta básicamente de 4 fases: a) En primer lugar, mediante un agente caotrópico lisante, se extrae el ARN de las partículas virales, y se le hace precipitar en alcohol. Como la técnica es cuantitativa, en este paso se adicionan los estándares a cada una de las muestras. b) A continuación se procede en un solo paso, gracias a la acción de la ADN polimerasa, a la síntesis de la copia de ADNc (complementario) y su amplificación con primers que están biotinilados. c) Tras este paso, las hebras dúplex de ADN son desnaturalizadas y se permite que hibriden con cadenas complementarias unidas a partículas magnéticas. d) Finalmente la detección colorimétrica (a 660 nm) de las cadenas de ADN formadas en el proceso de amplificación (que tienen biotina) y que quedan unidas al sistema magnéticamente, se realiza con la adición de estreptavidina (con afinidad por la biotina) marcada con el enzima peroxidasa de rábano y su substrato, el TMB. Los resultados se expresan como copias/ml.

4.3.- Citometría de flujo

La evaluación citofluorimétrica multicolor se ha convertido en una herramienta fundamental para el laboratorio de inmunología. Gracias a su tecnología se ha podido analizar con una precisión sin igual la expresión de diferentes moléculas presentes tanto en la membrana plasmática de los leucocitos como en diversos componentes intracelulares. Actualmente el estudio de las subpoblaciones linfocitarias se realiza con esta tecnología y nos permite, en la infección pediátrica por el VIH, identificar deficiencias numéricas en distintas subpoblaciones linfocitarias y con distintas funcionalidades o grados de maduración.

Los linfocitos de sangre periférica fueron inmunofenotipados mediante citometría de flujo de tres y cuatro colores en las instalaciones de la Sección de Inmunohematología del Centro de Transfusiones de la Comunidad Valenciana. El análisis se realizó con muestras de sangre completa, fresca y anticoagulada con EDTA. La citometría de tres colores se realizó hasta noviembre de 1999 y se analizó con un citómetro FACScan de la empresa Becton Dickinson (San José, CA, USA) con el software desarrollado por la misma, LYSIS II. A partir de esa fecha se realizó la citometría de cuatro colores al disponer de un citómetro FACScalibur con el software CellQuest, todo ello también producido por la empresa Becton Dickinson. Todos los anticuerpos monoclonales, adquiridos también a Becton-Dickinson, estaban directamente marcados con las moléculas fluorescentes, a saber, FITC (Isotianato de fluoresceína), PE (Ficoeritrina), PerCP y APC (Allofococianina).

Los linfocitos se tiñeron usando la técnica de lisis de eritrocitos en sangre completa^{175,176,177,178}, siguiendo las recomendaciones de Becton Dickinson, el constructor del citómetro y suministrador de los reactivos. Brevemente, de 5 a 10 μ l de combinaciones de anticuerpos marcados con fluorocromos se añadieron a 100 μ l de sangre y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras esto, se añadieron 2 ml de solución de lisis a las muestras y se mezclaron incubándose durante 10 minutos más. Las células marcadas se lavaron dos veces y se resuspendieron en PBS para su análisis en un citómetro y se recogieron los datos en list mode para su posterior análisis. Se recogió la información proporcionada al adquirir de 5.000 a 10.000 eventos (siendo 2.000 el número mínimo de células contadas requerido para formar parte del estudio), después de haber hecho un *gating* en la población linfocitaria por *forward* y *side*

scatter. El fondo del marcaje fluorescente se averiguó pasando los isotipos de los anticuerpos monoclonales usados, sin ninguna afinidad por la muestra, y con el mismo fluorocromo y se restó de los resultados. Los resultados se expresaron en valores absolutos (células/ μ l) y porcentaje sobre el total de linfocitos (%).

Dependiendo del número de fotodetectores en el citómetro, y por consiguiente del número de colores disponibles, se han realizado las siguientes combinaciones:

- Combinación de fluorocromos para tres colores

Tubo	PerCP	FITC	PE
1	CD3	CD4	CD45RA
2	CD3	CD4	CD45R0
3	CD3	CD8	CD45RA
4	CD3	CD8	CD45R0

Tubo	PerCP	FITC	PE
1	CD3	CD4	CD28
2	CD3	CD8	CD28

Tubo	PerCP	FITC	PE
1	CD3	CD4	HLA-DR
2	CD3	CD4	CD38
3	CD3	CD8	HLA-DR
4	CD3	CD8	CD38

- Combinación de fluorocromos para cuatro colores

Tubo	PerCP	APC	FITC	PE
1	CD3	CD4	CD45RA	CD45R0
2	CD3	CD8	CD45RA	CD45R0

Tubo	PerCP	APC	PE
1	CD3	CD4	CD28
2	CD3	CD8	CD28

Tubo	PerCP	APC	FITC	PE
1	CD3	CD4	HLA-DR	CD38
2	CD3	CD8	HLA-DR	CD38

4.4.- Ensayos de proliferación linfocitaria

Los cultivos se han realizado con muestras de sangre fresca anticoagulada procedentes de los sanos y de los niños VIH+ (no pasan más de tres horas desde su extracción hasta que comienza su procesado). Se ha utilizado la técnica de sangre total que se ha desarrollado en nuestro laboratorio frente a los cultivos clásicos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Brevemente, los estudios inmunológicos generalmente implican la separación de PBMC. Por un lado, esto requiere mucha cantidad de muestra para obtener un gran número de células purificadas, y por otro, éstas quedan aisladas de su ambiente natural *in vivo*, no pudiendo descartarse un sesgo poblacional. Dado que en los niños (especialmente los recién nacidos) el volumen de sangre obtenido es un factor crítico a tener en cuenta, hemos adoptado los cultivos de sangre total intentando además mimetizar las condiciones naturales de cada individuo, variando al mínimo el número y la proporción de células inmunocompetentes circulantes^{179,180,181,182}. Para realizar los cultivos celulares de sangre total, las células de la sangre libres de plasma, se lavaron suavemente 2 veces (250 g x 10 min) con solución salina fisiológica 0,9% (Laboratorios Grifols, España). Se suspendió el pellet en un volumen pequeño y se contaron las poblaciones celulares en un hematocitómetro biparamétrico (Coulter, USA). Una vez conocido el número de células de que se disponía, éstas se resuspendieron a una concentración final de 10^6 leucocitos/ml en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, UK) complementado con un 5% de suero bovino fetal (FBS, Sigma, USA), L-glutamina (Sigma, USA) y antibióticos (cóctel de estreptomina y fungizona). Los cultivos se mantuvieron en incubadores (Assab, Suecia) a 37°C con un 5% de CO₂ y un 100% de humedad. Como nos referiremos a estímulos mitogénicos potentes, los cultivos que se han realizado son de corta duración, 4 días, y para ellos las placas de 96 pocillos (Nunc, Dinamarca), con un volumen de cultivo de 200 µl/pocillo, son las apropiadas al ser poco significativa la evaporación. Cada pocillo contenía 2×10^5 leucocitos. La capacidad blastogénica se indujo, por triplicado, con los siguientes mitógenos (y a las siguientes concentraciones finales): PHA (20 µg/ml, Sigma, USA), ConA (20 µg/ml, Sigma, USA), PWM (5 µg/ml, Sigma, USA). También se estimuló con el anticuerpo monoclonal anti-CD3 (20 ng/ml, Ortho, USA), pues se utiliza casi universalmente en este tipo de ensayos y no necesita la coactivación con APM.

Las concentraciones óptimas de mitógenos y timidina se establecieron en el laboratorio en estudios preliminares. Está ampliamente aceptado que este tipo de cultivo presenta un máximo de incorporación de [³H]timidina al tercer día. Por ello, a los cultivos se les adicionó 0,5 µCi/pocillo de [³H]timidina (Amersham, UK) a las 72 horas de haberlos iniciado y se recogieron las células 24 horas después sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman, UK) en un cell-harvester multicanal de fabricación propia. Se lisaron las células con agua destilada y el ADN, con la [³H]timidina, se fijó a los filtros con ácido tricloroacético al 5% (Scharlau, España). Después de secarse los filtros en aire seco

a 45 °C se sumergieron en el líquido de centelleo apolar, Biogreen 111 (Scharlau, España) y se midió la radiactividad incorporada al ADN en un contador β de centelleo líquido (LKB, Dinamarca). Una vez conocido el rendimiento teórico de nuestro isótopo en nuestro sistema de contaje, las cuentas por minuto que rinde el aparato se transformaron en desintegraciones por minuto y se halló la media de cada triplicado.

4.5.- Síntesis "in vitro" de citocinas

En paralelo a los cultivos de proliferación, y siempre que la muestra rindiera suficiente número de células para realizar las siembras, se realizaron las inducciones de secreción de citocinas in vitro. A continuación se describen exclusivamente las diferencias respecto a los cultivos de proliferación. Las células obtenidas de sangre total se sembraron en macroplacas de 24 pocillos, que permiten un volumen de cultivo de 2 ml. Como se disponía de una resuspensión a una concentración final de 10^6 leucocitos/ml, cada pocillo contenía 2×10^6 leucocitos. La producción de citocinas se indujo con dos mitógenos, la PHA (20 μ g/ml, Sigma, USA) y el PWM (5 μ g/ml, Sigma, USA) adicionados inmediatamente tras la siembra celular. Como la síntesis de citocinas es un evento cinético independiente, cada una presenta su máximo de producción en momentos diferentes. Por ello se recogieron los sobrenadantes, de pocillos independientes, en dos momentos distintos, 48 y 96 horas. Datos cinéticos previos del laboratorio indicaban que las citocinas cuantificadas en este estudio seguían el siguiente patrón:

- citocinas de síntesis temprana (48 h): **IL-2, IL-4, IL-10 y TNF- α**
- citocinas de síntesis tardía (96 h): **IL-5, IL-6 e IFN- γ** .

Los sobrenadantes acelulares (ultracentrifugados a 13.000 r.p.m., 180") recogidos en cada caso, se almacenaron a -80° C para su posterior análisis.

4.6.- Cuantificación de citocinas

Debidos su alta sensibilidad, especificidad y accesibilidad, los inmunoensayos con enzimas conjugados se han convertido en la herramienta más extendida para la determinación de sustancias solubles en los fluidos biológicos o los sobrenadantes de los cultivos celulares. En nuestro caso, las citocinas plasmáticas y las de los sobrenadantes de cultivos celulares se analizaron por duplicado mediante ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays) específicos de tipo sándwich. Para su realización se han utilizado pares de anticuerpos comerciales y su empleo se ha protocolizado en

nuestro laboratorio siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Son los siguientes:

- R&D Systems (MN, USA): IL-2, IL-4 e IL-5. Para los plasmas, la curva patrón permitió las siguientes sensibilidades 10, 5 y 4 pg/ml respectivamente, mientras que para los sobrenadantes de cultivo fueron 25, 5 y 4 pg/ml respectivamente.

- Genzyme (MA, USA): IFN- γ e IL-10. Para los plasmas, la curva patrón permitió las siguientes sensibilidades 15 y 8 pg/ml respectivamente, mientras que para los sobrenadantes de cultivo fueron 25 y 8 pg/ml respectivamente.

- Endogen (MA, USA): IL-6 y TNF- α . Para los plasmas, la curva patrón permitió las siguientes sensibilidades 2 y 8 pg/ml respectivamente, mientras que para los sobrenadantes de cultivo fueron 200 y 8 pg/ml respectivamente.

Los ELISAs constan de varias fases:

1.- El coating o sensibilización de las placas de microtitración de 96 pocillos Maxisorb[®] (Nunc, Dinamarca) se realizó siempre con anticuerpos monoclonales (5 μ g/ml) en PBS 0,15 M (pH=7,4), durante 24 horas a temperatura ambiente (TA).

2.- Tras lavar las placas, se adicionaron por duplicado los plasmas o las muestras de los sobrenadantes, los controles negativos y los estándares recombinantes de referencia (curvas patrón específicas para cada citocina) y se incubaron 24 horas a TA. Todos los lavados se realizaron con PBS y Tween 20 (Sigma, USA) al 0,05%.

3.- A continuación se lavaron las placas, para eliminar la fracción de la muestra que no se hubiera unido específicamente al anticuerpo de captura. Entonces se adicionaron los anticuerpos de detección (entre 200 y 2.000 ng/ml), todos disueltos en PBS con Tween 20 al 0,05% y caseína (Merck, Alemania) al 1%. Se incubaron 1 hora a 37°C. Los anticuerpos secundarios de R&D (policlonales) y Endogen (monoclonales) estaban biotinilados mientras que los de Genzyme eran policlonales de conejo.

4.- Después de lavar las placas se adicionó, o bien la estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano (para detectar los anticuerpos biotinilados), o bien el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo también marcado con peroxidasa (detección de los policlonales de Genzyme). Ambos disueltos también en PBS con Tween 20 al 0,05% y caseína al 1% (p/v) y se incubaron 1 hora a 37°C.

5.- Tras lavar se pasó al revelado de las placas. El color se obtuvo al adicionar la O-phenyldiamine (OPD a la concentración de 0,4 mg/ml; Sigma, USA), que es el sustrato de la peroxidasa, en tampón citrato-fosfato 0,05 M (Sigma, USA) con H₂O₂

(0,014%) a los pocillos. Después de mantenerlos 30 minutos en la oscuridad, se paró la reacción con H₂SO₄ 3,6 N (Scharlau, España).

6.- El análisis de la densidad óptica (D.O.) a 492 nm (filtro de referencia a 690 nm) se realizó con un lector TECAN y el software Magellan para su interpretación (Tecan, Austria).

7.- Las D.O. de las muestras obtenidas en cada ensayo de citocina se extrapolaron de acuerdo con las obtenidas en cada curva de referencia específica y los resultados se expresaron en pg/ml.

4.7.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la ayuda de programa SPSS 10.0. La distribución de cada variable en cada grupo se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov, el cual demostró que casi ninguna seguían una distribución normal. Por ello se han utilizado métodos no paramétricos para analizar las diferencias entre cada una de las variables y cada uno de los grupos. Se ha usado el test de Kruskal-Wallis para valorar las diferencias entre medias de varios grupos y el test de Mann-Whitney para valorar las diferencias cuando se comparan dos grupos.

Como las variables no siguen una distribución normal los resultados se muestran como mediana, rango y número de determinaciones. Una $p < 0,05$ se consideró significativa.

5.- Resultados

5.- Resultados	61
5.1.- Linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y Subpoblaciones CD45RA y CD45RO	63
5.1.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de Referencia	63
5.1.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio	633
5.2.- Expresión de CD28 en los linfocitos periféricos	69
5.2.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de referencia	69
5.2.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio	69
5.3.- Expresión de CD38 en los linfocitos periféricos	73
5.3.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de referencia	73
5.3.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio	73
5.4.- Expresión de HLA-DR en los linfocitos periféricos	76
5.4.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de referencia	76
5.4.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio	76
5.5.- Estudios de Proliferación linfocitaria "in vitro"	79
5.5.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de Referencia	79
5.5.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio	79
5.6.- Citocinas plasmáticas	82
5.6.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de Referencia	83
5.5.1.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio	83
5.7.-Inducción "in vitro" de la síntesis de citocinas	855
5.7.1.- Secreción de citocinas en niños normales VIH-	866
5.7.2.- Secreción de Citocinas en cultivos celulares de niños VIH+.	88

5.1.- Linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ y Subpoblaciones CD45RA y CD45RO

5.1.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de Referencia

En la tabla 5.1, se detallan los valores (medianas, rangos y número de casos) observados en la distribución de los linfocitos circulantes CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en el grupo control de niños VIH-, y que sirven de referencia para la evaluación de los pacientes VIH+ en seguimiento. Las cifras porcentuales y absolutas de las medianas detectadas en los linfocitos CD4⁺ son significativamente más altas (cociente CD4/CD8>1,5) que las detectadas en la población de linfocitos CD8⁺ circulantes (medianas de 41 vs 25%; 1.102 vs 600 cel/ μ l). El desequilibrio poblacional CD4<CD8 no se observó en ninguno de los controles analizados.

En la tabla 5.2, se expresan los valores porcentuales y absolutos de las subpoblaciones CD45RA y CD45RO de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ de estos niños de referencia. Tanto en los linfocitos CD4⁺ como en los CD8⁺, la subpoblación CD45RA es predominante sobre la CD45RO. Este predominio es especialmente significativo en la población CD8⁺(cocientes RA/R0 de CD4⁺=1,5; cociente RA/R0 de CD8⁺=3,4).

5.1.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio

Los niños VIH+ han sido agrupados en tres categorías de respuestas, de acuerdo con la evolución de sus cargas virales tras la instauración de los TARGA. La tabla y figura 5.1, muestran las medianas anuales de cargas virales que han permitido estas agrupaciones. Así, los niños que presentan **Alta Eficacia** al TARGA (*Alta*, en tablas y figuras), muestran un descenso de sus cargas virales hasta cifras indetectables ya desde el primer año y mantenidas durante todo el estudio evolutivo. Por otro lado, los niños que presentan **Eficacia Media** al TARGA (*Media*) son aquellos en los que se consigue disminuir tardíamente sus valores de cargas virales en al menos un logaritmo, sin llegar a ser indetectables, pero a partir del 3 año de evolución con TARGA (momento tardío). Ya por último constatar que los niños que muestran una **Baja Eficacia** al TARGA (*Baja*) no consiguen disminuir significativamente sus cargas virales a pesar de recibir tratamientos combinados anti-VIH.

Eficacia TARGA	momento	estadística	carga viral (copias/ml)	CD4		CD8	
				%	cells/ μ l	%	cells/ μ l
Controles		Mediana		41	1.102	25	600
		Rango		34	1.827	32	1.268
		n		66	66	66	66
Alta	basal	Mediana	2.348	23	458	54	1.183
		Rango	590.362	42	1.426	48	1.873
		n	34	31	31	31	31
	1	Mediana	199	28	642	46	901
		Rango	9.508	44	1.684	51	2.239
		n	39	34	34	34	34
	2	Mediana	199	33	898	37	938
		Rango	950	28	1.082	33	1.750
		n	36	36	36	36	36
	3	Mediana	199	37	814	37	759
		Rango	595	23	1.149	28	1.396
		n	26	24	24	24	24
4	Mediana	199	32	859	38	818	
	Rango	827	23	820	28	1.432	
	n	13	23	23	23	23	
Media	basal	Mediana	27.758	22	388	42	903
		Rango	396.244	37	1.040	66	2.359
		n	37	32	32	32	32
	1	Mediana	10.815	26	513	45	909
		Rango	299.931	46	1.429	49	2.498
		n	56	37	37	37	37
	2	Mediana	19.162	24	655	46	1.105
		Rango	749.801	35	1.294	41	2.598
		n	44	30	30	30	30
	3	Mediana	5.943	26	777	43	1.250
		Rango	401.801	33	784	40	2.322
		n	42	24	24	24	24
4	Mediana	4.595	29	733	43	1.046	
	Rango	20.051	30	648	33	1.897	
	n	20	23	23	23	23	
Baja	basal	Mediana	10.207	13	197	56	955
		Rango	748.999	31	1.238	47	2.862
		n	33	44	44	44	44
	1	Mediana	39.262	16	238	51	886
		Rango	749.802	34	1.136	43	1.814
		n	62	40	40	40	40
	2	Mediana	72.005	20	262	53	821
		Rango	749.801	32	1.033	45	2.883
		n	69	34	34	34	34
	3	Mediana	55.750	19	307	54	892
		Rango	749.801	25	399	34	2.889
		n	70	34	34	34	34
4	Mediana	45.600	24	414	52	915	
	Rango	749.802	24	678	36	2.832	
	n	49	32	32	32	32	

Tabla 5.1. Linfocitos CD4, CD8 y cargas virales. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Claves: %, porcentaje sobre el total de linfocitos; Basal, pre-TARGA; 1, 1º año de TARGA; 2, 2º año de TARGA; 3, 3º año de TARGA; 4, 4º año de TARGA.

La tabla y figura 5.1, muestran los valores (mediana, rango y número de estudios) observados en la población de niños VIH+ de las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ en **momentos basales**, previos al TARGA, y el efecto que sobre estas tienen los tratamientos TARGA administrados durante cuatro años consecutivos. En la parte izquierda de las figuras se muestran los valores de referencia observados en la población de niños normales VIH-. La eficacia del tratamiento TARGA sobre las cargas virales plasmáticas se muestra en la figura 5.1, y permite definir a los niños VIH+ por los 3 tipos de respuesta terapéutica descrita en material y métodos (descripción de la cohorte).

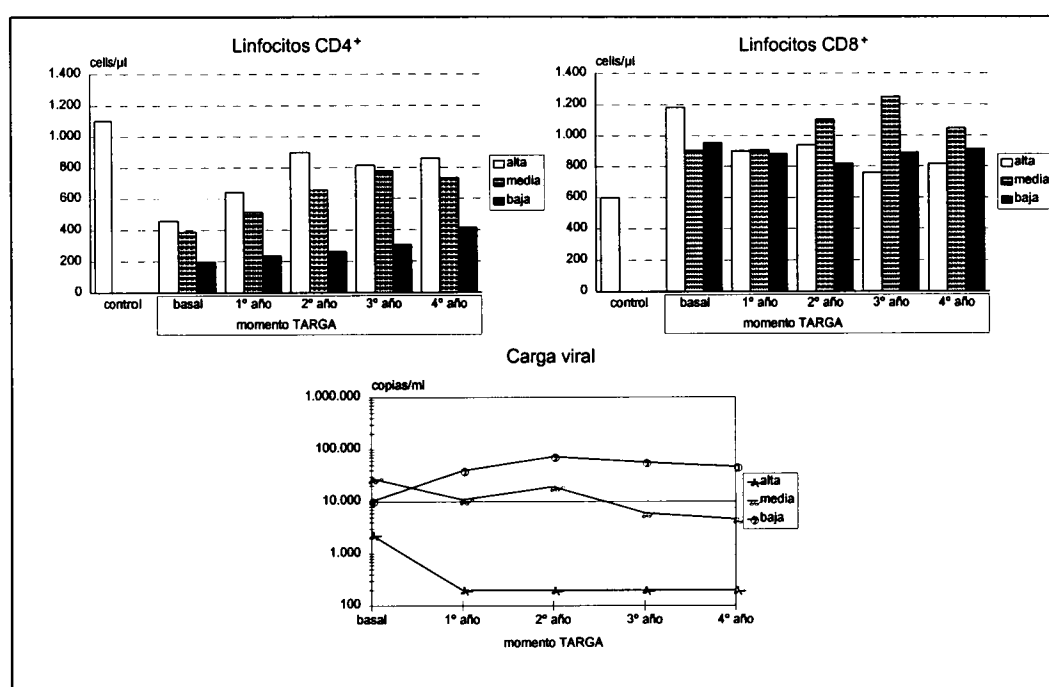


Figura 5.1. Linfocitos CD4, CD8 y cargas virales. La figura representa las medianas, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.

Al analizar los **linfocitos CD4⁺** lo primero a señalar es que los niños VIH+ de los tres grupos muestra, en condiciones basales, linfopenia respecto a la normalidad, y significativamente diferentes entre sí ($p < 0,05$). Es este sentido, los niños del grupo Alta Eficacia presentan valores superiores de linfocitos CD4⁺ a los demás. Su grado de linfopenia, aunque es moderada se diferencia claramente de los que responden con Eficacia Media (458 vs 388 cel/ μ l). Los niños que responden con Eficacia Baja al TARGA, iniciaron el tratamiento con cifras basales de linfocitos CD4⁺ más bajas (CD4 < 200 cel/ μ l), dentro de lo que se denomina linfopenia severa de grado 3 (C.I.#3).

Eficacia TARGA	momento	estadística	CD4				CD8				ratio RA/R0	
			CD45RA		CD45R0		CD45RA		CD45R0		CD4	CD8
			%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l		
Controles		Mediana	26	629	19	387	19	441	5	123	1,5	3,4
		Rango	28	991	27	569	19	723	15	311	5,0	97,9
		n	42	42	42	42	42	42	42	42	42	42
Alta	basal	Mediana	12	288	8	167	22	416	28	593	1,5	0,9
		Rango	32	1.055	17	845	45	1.028	57	1.376	6,3	9,0
		n	30	30	30	30	31	31	31	31	30	31
	1	Mediana	18	394	10	208	24	516	27	416	1,8	0,9
		Rango	35	1.295	13	621	25	1.074	43	1.169	4,1	3,7
		n	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
	2	Mediana	25	649	10	242	25	633	12	268	2,7	2,2
		Rango	32	966	8	407	22	1.367	26	691	3,6	3,5
		n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
	3	Mediana	26	626	11	266	26	581	11	261	2,4	2,3
		Rango	19	848	10	390	29	1.331	17	341	3,0	5,1
		n	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
4	Mediana	22	586	11	270	23	543	11	288	2,0	2,2	
	Rango	19	667	11	322	26	1.310	17	583	2,7	5,0	
	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	
Media	basal	Mediana	13	245	7	151	21	378	21	503	1,5	0,9
		Rango	27	749	13	321	30	922	49	1.453	3,0	1,7
		n	31	31	31	31	32	32	32	32	31	32
	1	Mediana	17	342	7	169	21	470	25	495	1,9	0,8
		Rango	38	1.167	13	280	24	1.360	45	1.382	3,9	2,7
		n	37	37	37	37	37	37	37	37	37	37
	2	Mediana	16	429	8	209	24	680	19	505	2,1	1,4
		Rango	35	1.093	9	486	39	2.408	55	1.553	3,6	4,9
		n	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	3	Mediana	17	482	8	248	25	643	16	466	2,1	1,4
		Rango	24	669	12	339	25	1.009	23	1.321	5,1	4,1
		n	22	22	22	22	22	22	22	22	22	22
4	Mediana	21	522	9	213	24	588	17	450	2,1	1,4	
	Rango	21	508	10	301	25	981	26	1.174	2,9	2,9	
	n	23	23	23	23	23	23	23	23	23	23	
Baja	basal	Mediana	7	90	6	96	22	324	30	542	1,2	0,8
		Rango	22	942	9	293	32	1.268	40	1.673	3,2	1,4
		n	44	44	44	44	44	44	44	44	44	44
	1	Mediana	9	113	7	109	18	304	29	564	1,2	0,6
		Rango	25	848	11	364	20	888	54	1.512	2,7	2,1
		n	36	36	36	36	36	36	36	36	36	36
	2	Mediana	10	144	8	101	26	363	27	386	1,2	1,1
		Rango	26	853	21	296	38	1.188	52	2.105	4,4	2,5
		n	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34
	3	Mediana	10	184	7	113	29	428	27	476	1,6	1,1
		Rango	23	378	11	174	34	1.631	42	1.598	4,0	4,7
		n	33	33	33	33	33	33	33	33	33	33
4	Mediana	15	265	9	146	29	519	23	436	1,8	1,2	
	Rango	23	561	6	199	23	1.344	50	1.805	3,9	7,0	
	n	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	

Tabla 5.2. Linfocitos vírgenes (CD45RA) y de memoria (CD45R0). La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Claves: %, porcentaje sobre el total de linfocitos; Basal, pre-TARGA; 1, 1º año de TARGA; 2, 2º año de TARGA; 3, 3º año de TARGA; 4, 4º año de TARGA.

Al analizar la evolución de las cifras de linfocitos $CD4^+$ tras el TARGA se observa que los niños que responden con Alta Eficacia al TARGA, ya a partir del primer año mejoran de su linfopenia y, desde el segundo año del inicio del TARGA, muestran valores significativamente superiores y mantenidos durante los tres años siguientes del estudio. Los niños con Eficacia Media al TARGA muestran el mismo perfil que el grupo anterior con aumentos de linfocitos $CD4^+$ circulantes, pero retrasado un año en el tiempo. En ambos grupos no se alcanzan finalmente los valores de linfocitos $CD4^+$ observados en los sujetos normales. Los niños que no responden al TARGA (grupo de Baja Eficacia) muestran incrementos anuales progresivos en sus valores de linfocitos $CD4^+$ y, aunque al cuarto año de TARGA consiguen duplicar sus cifras basales (mejorando su categoría inmunológica de CI#3 a CI#2), aún son muy bajas e inferiores (un 50%) a las observadas en ese momento terapéutico en los otros dos grupos de VIH+.

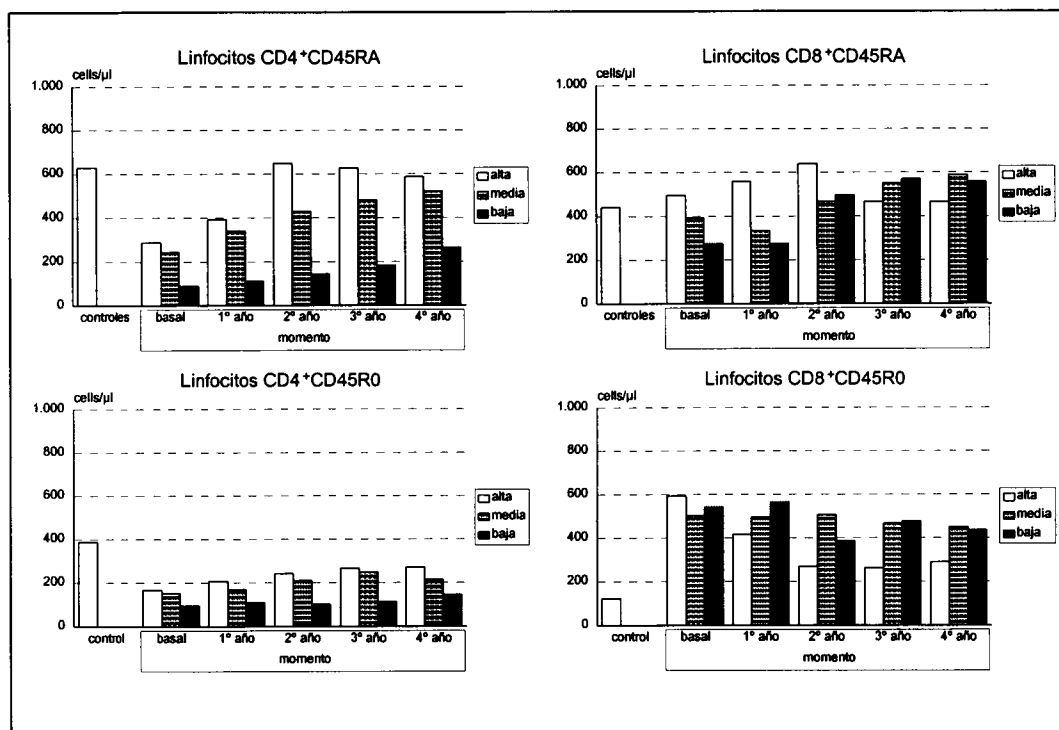


Figura 5.2. Linfocitos $CD3^+$ vírgenes ($CD45RA$) y de memoria ($CD45R0$). La figura representa las medianas, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.

En la tabla y figura 5.2 se muestran los datos observados en la subpoblaciones $CD45RA$ y $CD45R0$ en los linfocitos $CD4^+$. La linfopenia basal inicial en los tres grupos de infectados es de tipo global y afecta, tanto a la población de células vírgenes ($CD45RA$) como a las de memoria ($CD45R0$), siendo los niños del grupo de baja eficacia los que muestran la linfopenia $CD4^+CD45RA$ más intensa y significativa. En los ni-

ños que responden con Alta y Media eficacia al TARGA se observa un significativo incremento de las células CD4⁺CD45RA desde el primer año de tratamiento, que se acentúa y mantiene en los tres años siguientes. La recuperación de las CD4⁺CD5RA circulantes es total en los niños que muestran Alta Eficacia desde el segundo año de tratamiento mientras que en los de Eficacia Media esta normalidad también la adquieren pero al tercer año. La citopenia CD4⁺CD45RA de los niños que muestran Baja Eficacia al TARGA se corrige parcialmente (hasta un 50% del valor normal) tras cuatro años de TARGA. Sin embargo, la subpoblación CD4⁺CD45R0 cuantitativamente deficiente en los momentos basales en los 3 grupos de niños, se incrementa ligeramente a lo largo del TARGA, aunque sin alcanzar los valores observados en los controles sanos.

Por lo que respecta al estudio de los **linfocitos CD8⁺** en condiciones basales, todos los grupos de niños VIH⁺ muestran una intensa linfocitosis, muy similar entre sí y, respecto a los valores normales, significativamente alta ($p < 0,005$). En ninguno de estos grupos, ni a largo de los 4 años de TARGA, se observa una disminución de las medianas de linfocitos CD8⁺ hasta la normalidad. Al estudiar la distribución de las subpoblaciones CD45 en linfocitos CD8⁺, llama la atención que la linfocitosis referida, en los 3 grupos de niños, es a expensas del incremento exclusivo de la subpoblación de células de memoria (**CD8⁺CD45R0**), con diferencias evolutivas entre ellos según la eficacia terapéutica. Así, los niños del grupo con alta eficacia, muestran una disminución significativa ($p < 0,05$) de los linfocitos CD8⁺CD45R0 (no detectable en los otros 2 grupos de pacientes) a partir del 2º año de tratamiento TARGA, cuyos valores se mantienen bajos hasta el final del estudio, aunque superiores a la normalidad. Sin embargo, en los otros dos grupos de niños (eficacia Media y Baja) los 4 años de TARGA no disminuyen los altos valores de CD8⁺CD45R0 circulantes, ni muestran diferencias significativas entre sí. Por el contrario, el perfil de las células **CD8⁺CD45RA** (vírgenes, no primadas) muestra que, en condiciones basales, sólo en los pacientes con Baja eficacia se detectan las CD8⁺CD45RA disminuidas, mientras que en los que responden con Alta y Media Eficacia al TARGA, se observan valores similares a los de los controles. Tras el TARGA, las células CD8⁺CD45RA aumentan progresivamente en todos los grupos, aunque de forma más marcada en los niños con respuesta media o baja al TARGA, y valores estabilizados desde el 2º-3º año del mismo.

5.2.- Expresión de CD28 en los linfocitos periféricos

5.2.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de referencia

En la **tabla y figura 5.3** se detallan las medianas, rangos y número de estudios observados en la distribución de los linfocitos circulantes CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ que expresan la molécula o antígeno coactivador CD28, en el grupo control de niños VIH-, y que sirven de referencia para la evaluación de los pacientes VIH+ en seguimiento. Las medianas porcentuales y absolutas de los linfocitos CD4⁺CD28⁺ muestran que esta subpoblación representa el 98,35% de la totalidad de los linfocitos CD4⁺ periféricos en niños y adolescentes con edades comprendidas entre 6 y 18 años. Menos de un 2% de los linfocitos CD4⁺ circulantes no expresan el CD28.

Por el contrario, en la población CD8⁺ no se observan esta desproporción, pues casi un 30% de los linfocitos CD8⁺ son CD28⁻ (medianas 159 cel/ μ y un 7% del total de linfocitos CD3⁺). En los niños sanos, el cociente CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28⁻ es generalmente superior a 2.

5.2.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio

Los niños VIH+ han sido agrupados por sus tres categorías de respuestas terapéuticas, de acuerdo con la evolución de sus cargas virales tras la instauración de los TARGA. En la **tabla y figura 5.3** se muestran los valores observados en la población de niños VIH+ de las subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ que expresan (CD28⁺) o no (CD28⁻) la molécula coestimuladora. Se detallan las medianas, rangos y número de estudios realizados en cada uno de los momentos del estudio retrospectivo y agrupados por años, desde el momento basal (pre-TARGA) hasta la finalización del cuarto año de TARGA.

En el momento basal, todos los grupos de infectados (con alta, media y baja eficacia del TARGA) muestran una intensa citopenia de linfocitos CD4⁺CD28⁺, tanto en valores porcentuales como absolutos respecto a la normalidad (para ambos $p < 0,001$). La mediana del grupo que presentó baja eficacia al TARGA (179 cel/ μ l), es significativamente más baja que la de los otros grupos infectados (276 y 364 cel/ μ l).

La subpoblación CD4⁺CD28⁻ no representa, al igual que ocurre en la población de niños sanos, más en un 1% de los linfocitos CD4⁺ totales, y fue en muchos casos indetectable.

Eficacia TARGA	momento	estadística	CD4				CD8			
			CD28+		CD28-		CD28+		CD28-	
			%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l
Controles		Mediana	41	1.077	1	18	15	349	7	159
		Rango	29	1.133	9	237	13	571	17	397
		n	35	35	35	35	43	43	43	43
Alta	basal	Mediana	9	276	1	1	16	386	36	702
		Rango	26	923	4	143	19	910	52	1.583
		n	12	12	12	12	31	31	31	31
	1	Mediana	24	449	3	92	20	410	29	524
		Rango	35	1.440	5	199	27	1.124	64	2.007
		n	8	8	8	8	33	33	33	33
	2	Mediana	36	771	4	115	19	445	21	430
		Rango	20	714	19	477	20	668	30	1.231
		n	7	7	7	7	31	31	31	31
	3	Mediana	35	729	3	84	22	507	15	273
		Rango	23	907	6	137	15	771	21	766
		n	17	17	17	17	22	22	22	22
4	Mediana	28	789	3	85	21	499	16	262	
	Rango	22	771	6	92	17	672	24	924	
	n	23	23	23	23	23	23	23	23	
Media	basal	Mediana	12	364	1	1	15	289	24	515
		Rango	27	684	2	43	21	615	64	2.215
		n	19	19	19	19	31	31	31	31
	1	Mediana	41	1.013	3	54	19	430	22	377
		Rango	40	1.323	6	103	21	658	49	2.158
		n	9	9	9	9	36	36	36	36
	2	Mediana	33	997	3	60	19	515	27	617
		Rango	27	989	7	218	13	593	37	2.065
		n	7	7	7	7	30	30	30	30
	3	Mediana	24	739	3	88	18	585	22	627
		Rango	34	712	4	190	22	469	45	1.956
		n	14	14	14	14	17	17	17	17
4	Mediana	25	667	3	71	19	484	21	572	
	Rango	30	609	5	141	19	634	38	1.568	
	n	23	23	23	23	23	23	23	23	
Baja	basal	Mediana	14	179	1	1	13	162	44	707
		Rango	21	744	4	167	17	609	54	2.424
		n	31	31	31	31	44	44	44	44
	1	Mediana	8	115	1	25	16	258	36	635
		Rango	8	255	4	70	20	564	58	1.750
		n	6	6	6	6	40	40	40	40
	2	Mediana					18	246	35	527
		Rango					19	539	55	1.445
		n					33	33	33	33
	3	Mediana	12	265	3	54	18	308	34	610
		Rango	18	340	4	241	30	353	48	2.672
		n	11	11	11	11	25	25	25	25
4	Mediana	19	348	4	64	15	328	34	614	
	Rango	27	671	6	294	22	616	45	2.705	
	n	31	31	31	31	31	31	31	31	

Tabla 5.3. Expresión de CD28 en los linfocitos CD3+. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Claves: %, porcentaje sobre el total de linfocitos; Basal, pre-TARGA; 1, 1º año de TARGA; 2, 2º año de TARGA; 3, 3º año de TARGA; 4, 4º año de TARGA.

En el primer año del tratamiento TARGA, se observa un incremento frente al valor basal muy significativo de las medianas de los linfocitos CD4⁺CD28⁺ en los pacientes que respondieron con alta ($p < 0.05$) y media ($p < 0.001$) eficacia al TARGA, especialmente en estos últimos. Frente a los valores de referencia, los pacientes con eficacia alta muestran medianas significativamente inferiores ($p < 0.001$), mientras que los niños con eficacia media normalizaron ya sus medianas de esta subpoblación linfocitaria. Sin embargo, la linfopenia CD4⁺CD28⁺ persiste, en el primer año TARGA, con los mismos valores que durante el momento basal.

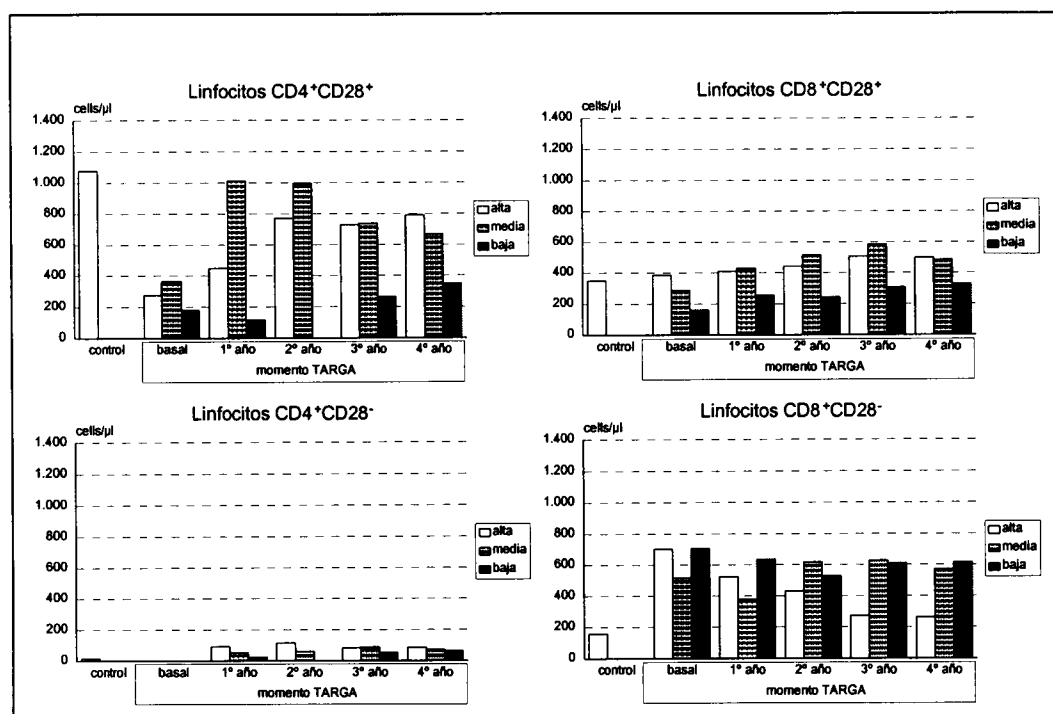


Figura 5.3. Expresión de CD28 en Linfocitos CD3+. La figura representa las medianas, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.

En los niños con alta eficacia en la supresión viral la recuperación de las células CD4⁺CD28⁺ es más intensa en el segundo año de tratamiento, se mantiene al mismo nivel hasta el cuarto y último año de seguimiento, pero es un 20% inferior que la normalidad (aunque no significativa). En los niños con eficacia media se observa, en el periodo tardío TARGA, una disminución de la mediana de los linfocitos CD4⁺CD28⁺ alcanzada en los dos primeros años de tratamiento, con valores similares a los del grupo anterior, que se mantiene hasta el cuarto año. En ambos grupos de niños, más del 95% de los linfocitos CD4⁺ son CD28⁺ y próximos a la normalidad.

En el tercer y cuarto año de tratamiento TARGA, el grupo de niños con baja eficacia antiviral muestra incrementos significativos ($p < 0.05$) de la subpoblación de linfocitos $CD4^+CD28^+$ respecto a sus valores basales. A pesar de este incremento, estos valores continúan mostrando una linfopenia severa de esta subpoblación, y son significativamente menores que los alcanzados por los otros grupos. Este valor al cuarto año es similar al que mostraron los niños de los otros grupos en el momento basal.

La recuperación de los linfocitos $CD4^+CD28^-$ es total en todos los grupos de infectados ya desde el primer año de TARGA. Sus medianas muestran valores que llegan a superar los observados en la población normal.

Sólo en el grupo de niños que no responden al TARGA muestran medianas significativamente menores que la normalidad de **linfocitos $CD8^+CD28^+$** , en el momento basal ($p < 0.05$; 162 vs 349 cel/ μ l). En los tres grupos de respuesta terapéutica, tras la instauración de los TARGA, y durante los cuatro momentos evolutivos del estudio, las medianas de los linfocitos $CD8^+CD28^+$ circulantes se incrementan gradual y proporcionalmente a sus valores basales respectivos. En el cuarto año, los linfocitos $CD8^+CD28^+$ de todos los grupos, muestran valores que no se diferencian significativamente de la normalidad.

En el momento basal, todos los grupos de niños infectados, mostraron una intensa linfocitosis de la subpoblación $CD8^+CD28^-$ ($p < 0.001$) indiferenciables entre sí mismos. Sólo los niños que presentan alta eficacia al TARGA, muestran una disminución gradual de esta subpoblación desde el primer año de tratamiento, consiguiendo valores en la normalidad en el tercer año y manteniéndolos hasta el último año de seguimiento. En este grupo de infectados, el cociente $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ al cuarto año es 1,9.

Sin embargo, en los otros dos grupos de infectados (media y baja eficacia) no se observa una disminución significativa de la subpoblación $CD8^+CD28^-$.

5.3.- Expresión de CD38 en los linfocitos periféricos

5.3.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de referencia

En la tabla y figura 5.4 se detallan las medianas, rangos y número de determinaciones realizadas sobre la expresión del marcador CD38 en la población control del estudio. Estos valores sirven de referencia para la evaluación de la recuperación inmunológica en los niños VIH+ en seguimiento. Los resultados muestran que en los linfocitos CD4⁺, la subpoblación CD38⁺ es predominante sobre la CD38⁻, llegando a duplicar a esta última ($p < 0,05$). Los linfocitos CD4⁺CD38⁺ representan un 28% sobre el total de linfocitos, mientras que la subpoblación CD4⁺CD38⁻ es el 14%, ó lo que es lo mismo 698 vs 382 cel/ μ l respectivamente.

En la población de linfocitos CD8⁺ aunque también predominan las células que expresan CD38⁺, esta desproporción no es tan marcada ni significativa. La subpoblación CD8⁺CD38⁺ representa el 13% de los linfocitos circulantes frente al 9% de las CD8⁺CD38⁻ (288 vs 236 cel/ μ l respectivamente).

5.3.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio

La tabla y figura 5.4 también muestra los valores observados en los niños infectados por el VIH y que han sido agrupados en función de la capacidad de los TARGA de suprimir la viremia a corto y largo plazo. La evolución tras el tratamiento se muestra como los resultados obtenidos en ese marcador celular durante cuatro años. Como en el caso de los controles, también se muestran las medianas, los rangos y el número de determinaciones realizadas en cada momento, desde el periodo basal o pre-TARGA hasta la finalización del cuarto año de tratamiento.

En los niños infectados, no disponemos de datos de la expresión de CD38 en los linfocitos CD4⁺ para el momento basal, pero sí a partir del primer año de TARGA. Lo que si que se puede constatar es que los infectados que responden con eficacia alta y media a los TARGA ya desde el primer año de tratamiento muestran valores similares a los controles en el número de linfocitos CD4⁺CD38⁺. Estas cifras las mantienen sin cambios significativos durante todos los años del estudio. Sin embargo, los niños que no responden al TARGA, muestran una linfopenia muy significativa ($p < 0,001$) de esta subpoblación. Se observa que con los años de tratamiento aumenta esta subpoblación

sobre sus niveles anteriores, pero sin alcanzar valores como la normalidad o los otros grupos de infectados ($p < 0,001$).

Eficacia TARGA	momento	estadística	CD4				CD8			
			CD38+		CD38-		CD38+		CD38-	
			%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l
Controles		Mediana	28	698	14	382	13	288	9	236
		Rango	18	1.236	18	621	18	571	29	922
		n	54	54	54	54	41	41	41	41
Alta	basal	Mediana					37	792	13	350
		Rango					57	1.849	33	1.193
		n					30	30	30	30
	1	Mediana	34	762	6	206	30	580	14	321
		Rango	18	979	7	113	62	1.634	59	1.859
		n	5	5	5	5	33	33	33	33
	2	Mediana	32	723	7	192	28	613	12	289
		Rango	20	568	8	196	31	1.207	25	695
		n	12	12	12	12	36	36	36	36
	3	Mediana	31	683	6	183	25	495	11	272
		Rango	20	700	8	303	24	1.145	16	621
		n	19	19	19	19	24	24	24	24
	4	Mediana	24	669	7	199	22	482	16	407
		Rango	20	620	11	301	25	1.042	15	596
		n	23	23	23	23	23	23	23	23
Media	basal	Mediana					30	606	16	339
		Rango					41	1.173	66	1.611
		n					28	28	28	28
	1	Mediana	37	892	5	178	34	702	8	186
		Rango	25	934	5	152	47	2.311	67	1.951
		n	9	9	9	9	36	36	36	36
	2	Mediana	34	959	7	180	35	829	12	334
		Rango	24	990	3	129	28	1.930	29	1.223
		n	7	7	7	7	30	30	30	30
	3	Mediana	22	630	4	145	34	997	8	225
		Rango	28	613	6	265	34	1.134	24	1.238
		n	19	19	19	19	22	22	22	22
	4	Mediana	25	579	5	148	28	670	11	307
		Rango	26	568	6	254	23	1.071	24	1.161
		n	23	23	23	23	23	23	23	23
Baja	basal	Mediana					33	417	22	340
		Rango					50	2.365	47	1.054
		n					42	42	42	42
	1	Mediana					36	619	15	204
		Rango					50	1.082	60	1.179
		n					40	40	40	40
	2	Mediana					44	633	9	122
		Rango					57	2.782	31	637
		n					34	34	34	34
	3	Mediana	14	202	3	87	44	699	8	156
		Rango	16	318	4	147	34	2.283	25	646
		n	18	18	18	18	33	33	33	33
	4	Mediana	19	309	4	112	34	605	15	249
		Rango	22	613	8	209	40	1.959	24	1.174
		n	32	32	32	32	32	32	32	32

Tabla 5.4. Expresión de CD38 en los linfocitos CD3+. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Claves: %, porcentaje sobre el total de linfocitos; Basal, pre-TARGA; 1, 1º año de TARGA; 2, 2º año de TARGA; 3, 3º año de TARGA; 4, 4º año de TARGA.

Por el contrario, al observar los valores de la subpoblación $CD4^+CD38^-$ se aprecia que durante el primer año de tratamiento, los tres grupos de infectados son similares e igualmente linfopénicos sobre la normalidad ($p < 0,001$). Esta significativa linfopenia se mantiene durante todos los momentos del estudio evolutivo en todos los grupos, pero con discretas diferencias con respecto a la eficacia del TARGA. La población $CD4^+CD38^-$ no consigue aumentar, ni tan siquiera mínimamente, incluso cuatro años después de haber mostrado eficacia terapéutica y repoblar efectivamente a los linfocitos $CD4^+$.

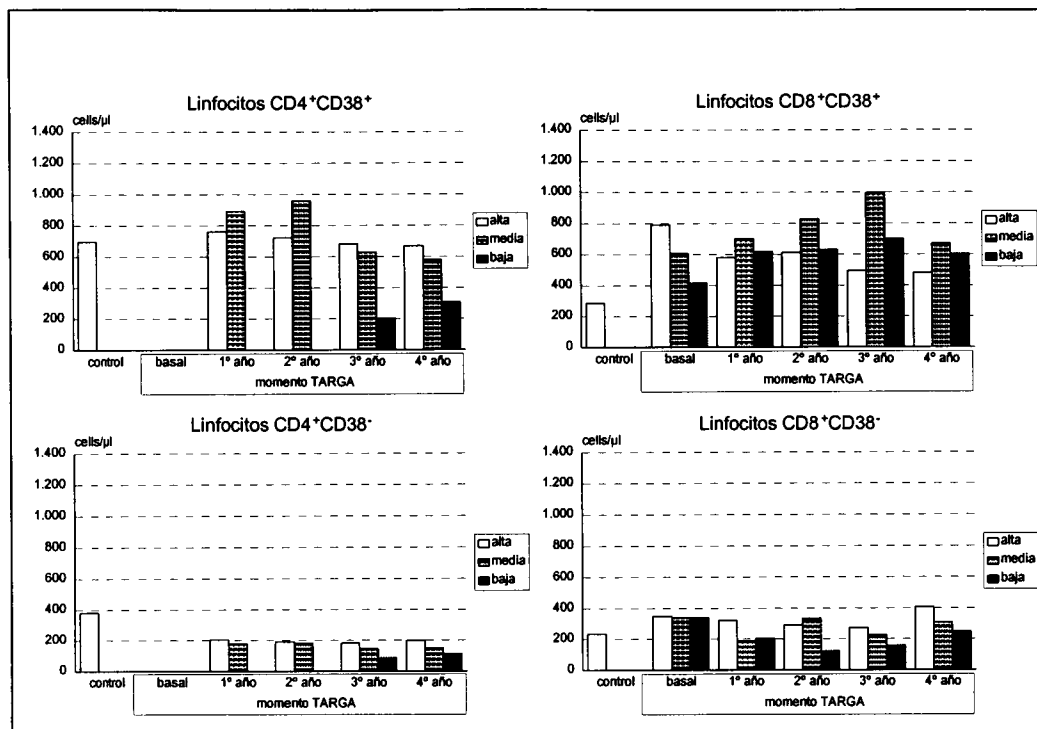


Figura 5.4. Expresión de CD38 en Linfocitos CD3+. La figura representa las medianas, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.

Los resultados obtenidos en la población de linfocitos $CD8^+$ nos muestran que en condiciones basales, en los infectados se evidencia una linfocitosis $CD8^+$, la cual está asociada a una expansión de la subpoblación $CD8^+CD38^+$. Esta linfocitosis basal es diferente entre los tres grupos de infectados ($p < 0,05$), y de mayor envergadura en los niños que muestran o bien alta o bien media eficacia al TARGA. A pesar de discretas variaciones durante los años de TARGA, este predominio de linfocitos $CD8^+CD38^+$ no revierte con el tratamiento en ninguno de los grupos de niños infectados por el VIH.

Por otro lado, es apreciable que en los tres grupos de infectados, en condiciones basales también acontece una significativa ($p < 0,05$) expansión de la subpoblación $CD8^+CD38^-$. En todos los grupos de infectados, esta subpoblación si que sufre cambios

tras el primer año de administración de los TRAGA, alcanzando valores próximos a la normalidad y manteniéndose en ese nivel durante todo el tiempo de duración del estudio.

5.4.- Expresión de HLA-DR en los linfocitos periféricos

5.4.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de referencia

En la **tabla y figura 5.5** se detallan las medianas, rangos y número de estudios observados en el grupo referencia para la evaluación de los pacientes infectados por el VIH, sobre la distribución de los linfocitos T periféricos, CD4⁺ y CD8⁺, que expresan el marcador de activación HLA-DR. En la población CD4⁺, llama la atención la baja expresión del marcador HLA-DR (35 cel/ μ l y un 2%). Las medianas muestran que los linfocitos CD4⁺HLA-DR⁻ suponen casi el 100% de los linfocitos CD4⁺ periféricos en los niños control ($p < 0,001$).

En la población CD8⁺, aunque las células CD8⁺HLA-DR⁻ son también las predominantes (404 cel/ μ l), no se observa esta desproporción, pues casi un 25% de los linfocitos CD8⁺ son HLA-DR⁺ (mediana 91 cel/ μ).

5.4.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio

Como en los estudios de expresión del CD38 antes descritos, en la población CD4⁺ carecemos de datos de expresión del HLA-DR en el momento basal. En los niños infectados por el VIH, la subpoblación CD4⁺HLA-DR⁺ es muy baja, como en los sujetos normales, y con ese mismo perfil se mantienen durante el estudio evolutivo realizado. A pesar de la linfopenia que presentan los niños VIH+ de diversos grados, y en diversas fases del estudio, no se observan diferencias significativas ni entre los infectados, ni éstos con respecto a los controles.

La subpoblación CD4⁺HLA-DR⁻ sí que diferencia las diversas agrupaciones de infectados entre sí y con respecto a los controles. Desde el primer año de TARGA, los niños que responden al tratamiento con alta y media eficacia presentan un perfil similar a los controles. A partir del tercer año de tratamiento estabilizan el número de linfocitos CD4⁺HLA-DR⁻ con medianas que no muestran diferencias significativas con respecto a los controles. Por el contrario, los niños que presentan una eficacia baja al TARGA presentan una linfopenia muy marcada ($p < 0,001$) de la población que es CD4⁺HLA-DR⁻, que persiste hasta los momentos tardíos del tratamiento.

Eficacia TARGA	momento	estadística	CD4				CD8			
			DR+		DR-		DR+		DR-	
			%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l	%	cells/ μ l
Controles		Mediana	2	35	40	1.136	4	91	18	404
		Rango	5	114	21	970	27	708	26	929
		n	54	54	54	54	40	40	40	40
Alta	basal	Mediana					19	384	26	620
		Rango					69	1.581	51	1.715
		n					31	31	31	31
	1	Mediana	4	41	33	873	19	276	28	683
		Rango	3	85	17	1.083	55	1.157	53	2.375
		n	5	5	5	5	33	33	33	33
	2	Mediana	2	30	37	885	8	192	29	712
		Rango	6	124	22	652	27	835	39	1.662
		n	12	12	12	12	36	36	36	36
	3	Mediana	1	17	36	764	5	122	30	705
		Rango	6	131	22	873	32	646	26	1.446
		n	19	19	19	19	24	24	24	24
	4	Mediana	1	19	31	831	4	93	32	749
		Rango	3	59	22	819	17	650	27	1.310
		n	23	23	23	23	23	23	23	23
Media	basal	Mediana					18	233	26	576
		Rango					47	785	56	2.091
		n					32	32	32	32
	1	Mediana	2	29	40	1.044	18	348	28	651
		Rango	9	190	25	903	39	1.453	29	1.087
		n	9	9	9	9	37	37	37	37
	2	Mediana	2	14	38	1.160	18	469	29	734
		Rango	2	45	28	1.105	39	1.491	33	1.630
		n	7	7	7	7	30	30	30	30
	3	Mediana	3	35	24	790	11	325	31	898
		Rango	4	117	31	645	28	855	31	1.874
		n	19	19	19	19	22	22	22	22
	4	Mediana	2	22	26	715	7	170	34	780
		Rango	3	51	31	629	20	582	30	1.669
		n	23	23	23	23	23	23	23	23
Baja	basal	Mediana					31	333	28	502
		Rango					69	1.181	67	2.676
		n					44	44	44	44
	1	Mediana					27	374	27	386
		Rango					46	912	50	1.217
		n					40	40	40	40
	2	Mediana					28	427	23	362
		Rango					52	2.278	31	1.088
		n					34	34	34	34
	3	Mediana	3	20	14	283	22	365	30	492
		Rango	3	46	16	352	51	1.677	43	1.890
		n	18	18	18	18	33	33	33	33
	4	Mediana	3	20	21	400	14	276	37	610
		Rango	5	56	24	671	62	1.323	47	2.118
		n	32	32	32	32	32	32	32	32

Tabla 5.5. Expresión de HLA-DR en los linfocitos CD3+. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Claves: %, porcentaje sobre el total de linfocitos; Basal, pre-TARGA; 1, 1º año de TARGA; 2, 2º año de TARGA; 3, 3º año de TARGA; 4, 4º año de TARGA.

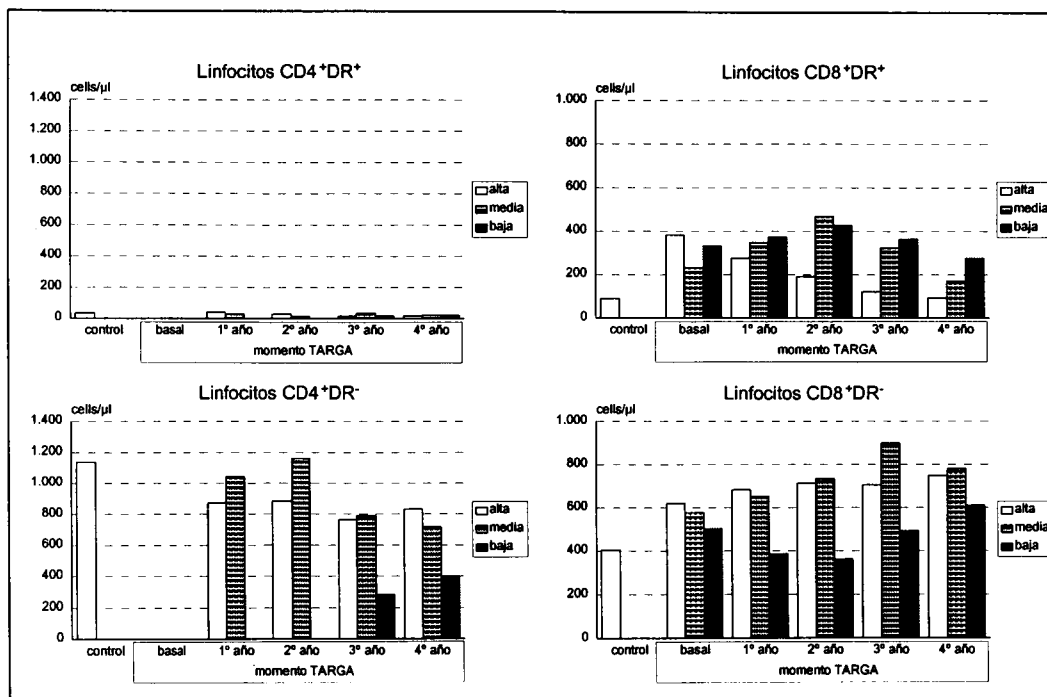


Figura 5.5. Expresión de HLA-DR en Linfocitos CD3⁺. La figura representa las medianas, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.C

En la población de linfocitos CD8⁺, en condiciones basales se aprecia que los niños infectados muestran una significativa linfocitosis y se objetiva que la expresión de HLA-DR es muy alta en todos los grupos de infectados con respecto a los controles ($p < 0,001$). Tras instaurar los TARGA se observa una disminución de esta población, pero sólo en el grupo de niños que muestran alta eficacia al tratamiento. En esta población de infectados a partir del tercer año la expresión de HLA-DR es similar a los controles. Por otro lado, los restantes dos grupos de niños infectados muestran valores de linfocitos CD8⁺HLA-DR⁺ que aumentan en paralelo hasta el segundo año de TARGA y que a partir del 3º año de tratamiento comienzan a disminuir. A pesar del descenso, en el cuarto año de tratamiento siguen estando significativamente elevadas en ambos grupos aunque en mayor medida en los niños que no muestran alta eficacia al TARGA (frente a los valores normales, $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente).

En condiciones basales, el número de linfocitos CD8⁺HLA-DR⁻ también es significativamente más alto que la normalidad en los infectados que muestran eficacias altas y medias al TARGA ($p < 0,05$). En ellos, tras comenzar el tratamiento aún se evidencian incrementos progresivos y significativos de esta subpoblación. Los niños infectados que presentan baja eficacia al TARGA parten en condiciones basales de cifras ligeramente superiores a la normalidad, pero no diferenciables significativamente. A lo

largo de la evolución del TARGA muestran variaciones los niveles de esta subpoblación sin alejarse de la normalidad, a excepción del cuarto año de tratamiento, momento en el cual presentan una linfocitosis CD8⁺HLA-DR⁺ significativa ($p < 0,05$) aunque menor que los otros grupos de infectados.

5.5.- Estudios de Proliferación linfocitaria "in vitro"

5.5.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de Referencia

En la tabla y figura 5.6, se muestran los valores (mediana, rango y número de estudios realizados) de las respuestas proliferativas linfocitarias observados en los pacientes VIH+ y en los sujetos normales. En las figuras, las medianas de estas respuestas a la PHA, ConA, CD3 y PWM detectadas en los controles se representan en la parte izquierda de las mismas. En ellos, las respuestas proliferativas son de diferente intensidad ante cada uno de los estímulos, siendo la PHA y la ConA las de mayor potencia mitogénica (45.213 y 39.442 cpm respectivamente) y las de menor envergadura el CD3 (25.877 cpm) y el PWM (11.871 cpm).

5.5.2.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio

También se muestran los datos obtenidos en los niños VIH+ estudiados y agrupados según los diferentes grupos de eficacia anti-VIH del TARGA que se han valorado en este estudio.

Dado que la recuperación funcional es previsiblemente más lenta que la recuperación cuantitativa de los efectores linfocitarios circulantes (descritos anteriormente), y con el objeto de aumentar el número de casos de forma que nos permitiera el estudio estadístico, el efecto de estos tratamientos TARGA sobre las respuestas linfoproliferativas se valoró agrupando las medianas en dos momentos evolutivos:

- a) efecto funcional temprano: medianas de los dos primeros años de TARGA y
- b) efecto funcional tardío: medianas del tercer y cuarto año de TARGA.

Los resultados referidos al momento basal se detallan en la tabla 5.6. Los tres grupos de pacientes VIH+ considerados (con alta, media y baja eficacia respuesta al TARGA) muestran, respecto a los valores del grupo control, marcados déficits proliferativos linfocitarios ante todos los estímulos empleados. Estas deficiencias funcionales

son especialmente intensas en las respuestas proliferativas inducidas por el CD3 y PWM. Es más, en este momento pre-TARGA, los déficits proliferativos son más intensos en los niños VIH+ en los que se observa una respuesta media o baja a los TARGA. Es decir, en condiciones basales las mejores respuestas proliferativas se observan, aunque deficitarias en los niños en los que el TARGA se mostró altamente eficaz en la supresión viral.

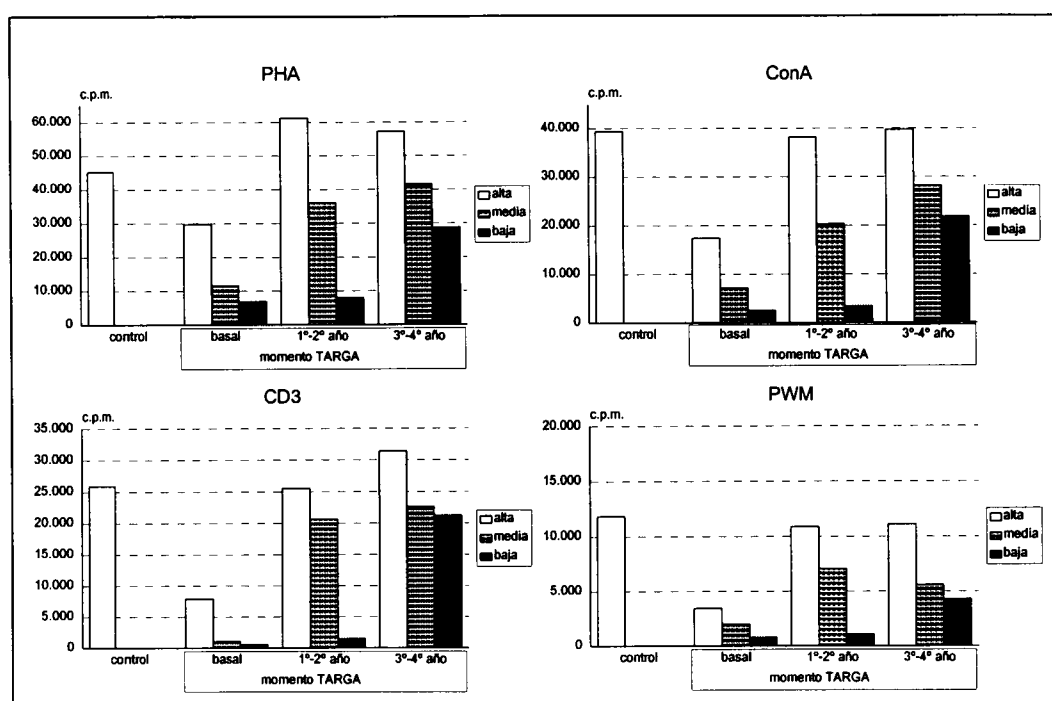
Eficacia TARGA	momento	estadística	PHA	ConA	CD3	PWM
Controles		Mediana	45.213	39.442	25.877	11.871
		Rango	94.026	72.941	76.070	57.685
		n	58	58	46	58
Alta	basal	Mediana	29.772	17.401	7.880	3.437
		Rango	230.888	191.107	135.494	28.316
		n	16	16	16	16
	1°-2° año	Mediana	61.219	38.130	25.487	10.882
		Rango	316.546	184.539	187.908	143.611
		n	26	26	26	26
	3°-4° año	Mediana	57.185	39.731	31.405	11.127
		Rango	112.402	120.750	98.556	54.875
		n	31	31	31	31
Media	basal	Mediana	11.537	7.123	1.030	1.977
		Rango	107.267	112.596	116.167	30.850
		n	19	19	19	19
	1°-2° año	Mediana	36.051	20.355	20.579	7.062
		Rango	215.771	203.563	178.869	88.587
		n	26	27	27	27
	3°-4° año	Mediana	41.640	28.245	22.614	5.571
		Rango	138.502	118.333	108.554	156.021
		n	39	39	39	39
Baja	basal	Mediana	6.816	2.583	548	787
		Rango	46.944	28.667	9.130	13.038
		n	29	29	29	29
	1°-2° año	Mediana	8.050	3.387	1.456	1.037
		Rango	138.042	200.040	124.646	24.906
		n	33	33	33	33
	3°-4° año	Mediana	28.778	21.808	21.220	4.303
		Rango	108.259	102.024	83.905	27.427
		n	49	48	49	49

Tabla 5.6. Respuestas proliferativas linfocitarias. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Los valores representan d.p.m.=desintegraciones por minuto. Claves: PHA, fitohemaglutinina; ConA, Concanavalina A; CD3, anticuerpo anti-CD3; PWM, Pokeweed Mitogen; Basal, pre-TARGA; 1°-2° año, momento temprano=1° y 2° año de TARGA; 3°-4° año, momento tardío=3° y 4° año de TARGA.

El efecto inmunológico temprano del TARGA es muy evidente en los niños que muestran una alta eficacia del tratamiento, (con supresión de la carga viral hasta valores indetectables desde el primer año).

En los niños con *alta eficacia* del TARGA se observa una recuperación hasta la normalidad, temprana y mantenida (efecto tardío), de las respuestas proliferativas inducidas por los cuatro estímulos empleados.

En el grupo de niños con *eficacia media*, las respuestas proliferativas a todos los mitógenos mejoran significativamente desde los momentos iniciales del tratamiento y se mantienen en el tiempo, pero sin alcanzar ni los valores del grupo de anterior ni el de los sujetos normales (recuperación funcional inmediata y parcial).



En los niños que muestran una *baja respuesta* al TARGA no se observan signos de recuperación funcional en el momento temprano del TARGA ante ninguno de los estímulos empleados. Sin embargo, en los momentos tardíos del tratamiento, si que se observa una significativa recuperación de las respuestas proliferativas linfocitarias a todos los estímulos, sin alcanzar ni los valores normales, pero próximos a los niños que presentan eficacia media.

5.6.- Citocinas plasmáticas

Los niveles de citocinas plasmáticas son inferiores a los que se detectan en la secreción de citocinas in vitro. Habida cuenta que la producción y el consumo de las citocinas es en su mayor parte tisular y, que la que se cuantifica en plasma es el exceso de la producida pero aún no consumida (secreción y consumo paracrino), es lógico esperar que muchas de estas citocinas plasmáticas sean indetectables o de muy bajo nivel. Además, a nivel plasmático los sujetos sanos y por supuesto los infectados por el VIH tienen grandes concentraciones de receptores solubles de muchas de estas citocinas que interaccionando con ellas pueden bloquear los epítomos antigénicos que son reconocidos en los ensayos cuantitativos. De acuerdo con los fabricantes de los anti-

Eficacia TARGA	momento	estadística	Th1		Th2			Proinflam.		
			IL-2	IFN-g	IL-4	IL-5	IL-10	IL-6	TNF-a	
Controles		Mediana	212	70	204	17	21	10	61	
		Rango	654	546	1064	430	157	105	722	
		n	48	44	69	43	26	63	34	
Alta	basal	Mediana	104	44	101	16	3	17	25	
		Rango	559	303	860	107	56	46	508	
		n	12	6	18	10	5	20	11	
	1°-2° año	Mediana	67	67	160	17	7	17	50	
		Rango	285	332	947	618	73	559	610	
		n	28	33	56	26	18	54	45	
	3°-4° año	Mediana	52	30	145	7	12	10	47	
		Rango	227	366	976	66	33	55	461	
		n	20	20	28	20	20	29	19	
	Media	basal	Mediana	159	74	373	16	6	20	95
			Rango	541	401	645	121	169	130	377
			n	12	13	24	9	8	28	13
1°-2° año		Mediana	61	22	208	11	12	23	36	
		Rango	414	156	847	56	49	787	920	
		n	26	27	55	22	16	47	40	
3°-4° año		Mediana	92	35	159	12	13	18	71	
		Rango	651	727	863	234	240	72	579	
		n	30	31	39	20	24	39	33	
Baja		basal	Mediana	157	79	107	7	26	12	10
			Rango	398	288	643	155	65	50	297
			n	12	13	28	16	8	33	9
	1°-2° año	Mediana	62	45	90	12	10	18	34	
		Rango	264	194	869	75	31	838	244	
		n	21	32	57	20	15	54	34	
	3°-4° año	Mediana	63	40	172	13	14	16	70	
		Rango	334	430	974	287	113	86	905	
		n	49	50	65	33	46	60	55	

Tabla 5.7. Citocinas Plasmáticas. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Los valores representan pg/ml de cada citocina. Claves: IL, Interleucina; IFN-g, Interferón- gamma; TNF-a, factor de necrosis tumoral- alpha; Basal, pre-TARGA; 1°-2° año, momento temprano=1° y 2° año de TARGA; 3°-4° año, momento tardío=3° y 4° año de TARGA.

cuerpos específicos empleados en nuestros ensayos de ELISA, está descartada la neutralización de las citocinas analizadas por receptores solubles circulantes bloqueantes.

5.6.1.- Grupo de niños VIH-. Sujetos de Referencia

A nivel plasmático, las mayores concentraciones de citocinas se observan en la IL-2 e IL-4 (por encima de 100 pg/ml), estando las restantes citocinas analizadas en valores inferiores a 25 pg/ml en muchos sujetos normales. Un dato a resaltar son los altos niveles de IL-4 circulantes en niños normales (generalmente indetectables en población adulta) lo que pone en evidencia la intensa participación de esta citocina en la maduración inmunológica de las respuestas Th2 (inmunidad Humoral). Por estas razones, a nivel plasmático es más significativo y valorables, el exceso de una determinada citocina que su defecto.

En la tabla y figura 5.7, se muestran los valores plasmáticos (medianas, rango y número de estudios realizados) encontrados en la población control de las citocinas de tipo Th1 (IL-2 y IFN- γ), de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) y las de índole proinflamatoria (IL-6 y TNF- α). De ellos destaca que las medianas de la IL-2 e IL-4 son superiores a 200 pg/ml mientras que las encontradas en IL-5 e IL-10 son inferiores a 25 pg/ml. De acuerdo con estos datos, en niños normales se observa un equilibrio cuantitativo en el perfil Th1=Th2. Además, en ellos las proinflamatorias IL-6 y TNF- α muestran medianas inferiores a las predominantes (IL-2 e IL-4).

5.5.1.- Niños infectados por el VIH. Sujetos de estudio

En la tabla y figura 5.7, se muestran los valores plasmáticos (medianas, rangos y número de estudios) observados en la cohorte de niños VIH+ según los diferentes tipos de agrupamiento referidos, tanto en muestras obtenidas en el momento pre-TARGA (basal) como las analizadas con posterioridad al comienzo del tratamiento (momentos temprano y tardío, 1^o-2^o año y 3^o-4^o año respectivamente).

Los resultados muestran que, según el agrupamiento de los pacientes por la eficacia del TARGA en la supresión de las cargas virales, las medianas de la IL-2, el IFN- γ , la IL-5, la IL-10 y el TNF- α se encuentran en la normalidad o ligeramente por debajo de estas, comparadas con las de los sujetos normales. Sin embargo, en condiciones basales, la IL-4 plasmática de los niños VIH+ que responden con eficacia media

al TARGA, está significativamente aumentada, y se normaliza desde los momentos iniciales del tratamiento con TARGA. Por otro lado, en todos los grupos VIH+, los niveles de IL-6 circulantes son discretamente superiores a la normalidad desde el momento basal y no descienden a pesar del tratamiento.

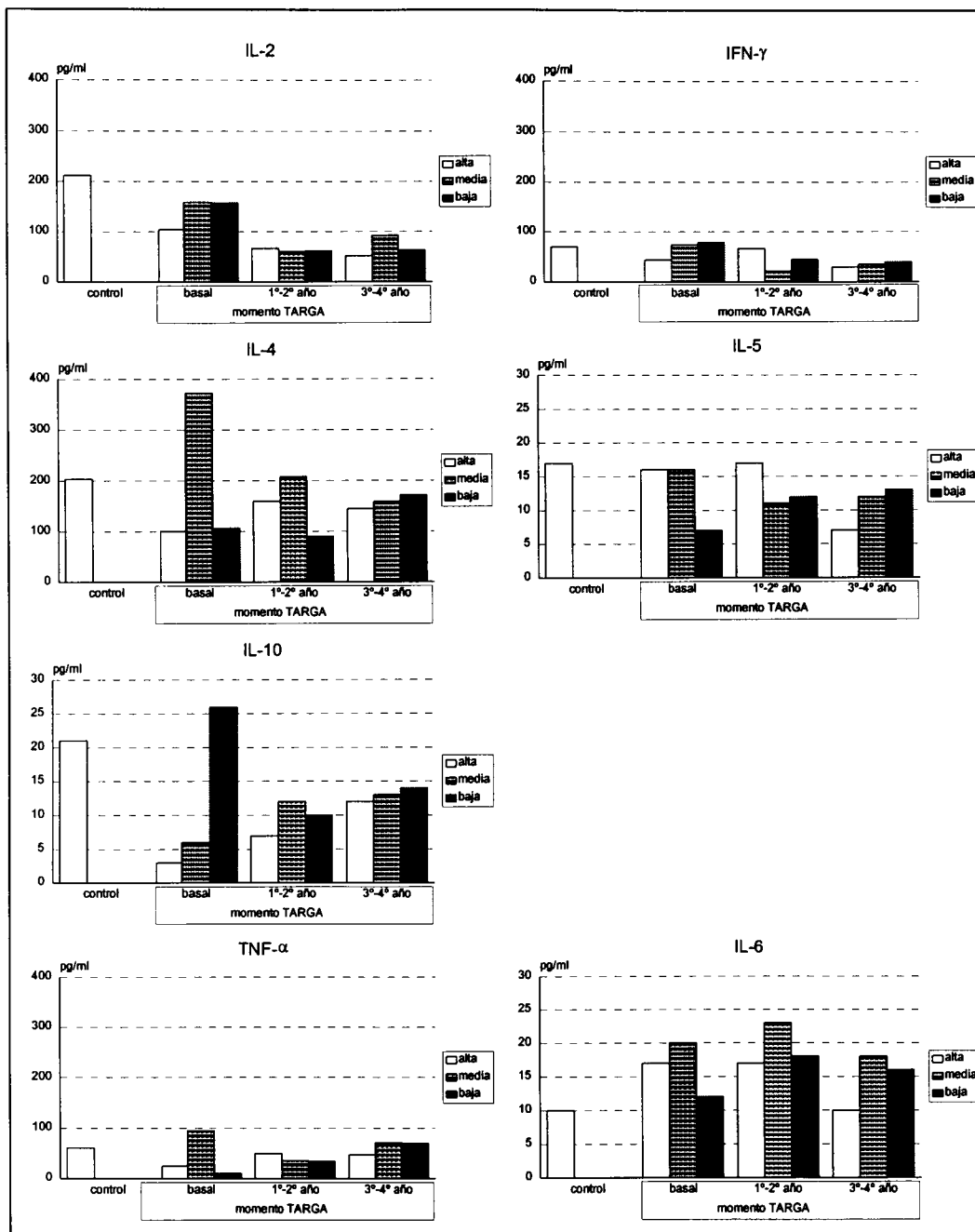


Figura 5.7. Concentraciones plasmáticas de citocinas. La figura representa las medianas de las citocinas cuantificadas en el plasma en pg/ml, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.

5.7.-Inducción "in vitro" de la síntesis de citocinas

Los ensayos exploran la capacidad intrínseca de las células periféricas para producir citocinas cuando son cultivadas en un ambiente alejado de sus condiciones *in vivo*, "limpio" de factores inhibidores o activadores entre las que destacan la presencia de virus completos y antígenos solubles circulantes, receptores solubles de mediadores, etc..

Dado que la cantidad de células sembradas es fija (un millón por ml), la proporción de las células que responden es necesario considerarla al evaluar los resultados. Por ejemplo, cultivos linfopénicos en linfocitos CD4+ deben tener menor capacidad intrínseca para producir citocinas CD4 dependientes que los normocíticos. Es más, por su pleiotropismo, la misma citocina cuantificada *in vitro* puede ser producida por diferentes tipos de las células presentes en los cultivos. Tal es el caso, por ejemplo, del IFN- γ que es sintetizada tanto por linfocitos CD4, como por los CD8 y NK, por lo que las deficiencias de una determinada población celular pueden ser compensadas *in vitro* por la actividad de las otras células sembradas.

Dado que en los cultivos no se bloquea el consumo de las citocinas que se generan en los sobrenadantes que se analizan, la citocina que se cuantifica es sólo aquella que "habiendo sido sintetizada no ha sido utilizada" ni bloqueada en el período de tiempo transcurrido desde la estimulación celular hasta el momento de retirada del sobrenadante.

Cada estímulo, al incidir sobre tipos celulares diferentes y activar mecanismos de secreción y/o consumo particulares, en nuestro caso PHA y PWM, pueden inducir secreciones de citocinas con patrones diferentes. Por ejemplo el PWM activa de forma "incompleta" (secreción sin consumo de IL-2) tanto a los linfocitos T como a los B y NK, mientras que la PHA es más selectiva en la "activación completa" (secreción y consumo de IL-2) de los linfocitos T y NK. Por ello, las deficiencias de secreción de IL-2 son más valorables en los cultivos con alta secreción y bajo consumo (IL-2 en PWM) y complementan la información de los cultivos estimulados con PHA.

Las citocinas de tipo Th2 (IL-4 e IL-5), a diferencia de las citocinas de tipo Th1 y Proinflamatorias, son escasamente inducibles *in vitro* con los dos estímulos policlonales empleados, por lo que su deficiencia o hiperproducción son más difícilmente objetivables.

Eficacia TARGA	momento	estadística	Th1		Th2			Proinflam.		
			IL-2	IFN-g	IL-4	IL-5	IL-10	IL-6	TNF-a	
Controles	Mediana		2.328	7.929	52	97	351	10.031	217	
	Rango		20.717	44.531	1.299	854	2.675	47.164	2.815	
	n		173	83	122	69	151	70	171	
Alta	basal	Mediana	965	16.644	1	49	261	12.206	259	
		Rango	12.456	15.934	351	684	1.005	25.176	1.408	
		n	25	11	25	11	25	11	25	
	1°-2° año	Mediana	805	14.577	35	181	150	10.104	327	
		Rango	11.926	21.024	143	350	2.763	78.000	2.887	
		n	12	5	10	5	9	5	12	
	3°-4° año	Mediana	1.519	9.477	40	101	1.266	41.000	2.693	
		Rango	15.800	26.160	168	100	1.632	78.000	11.955	
		n	14	4	8	2	9	2	14	
	Media	basal	Mediana	658	7.886	1	82	256	13.653	145
			Rango	9.208	24.747	276	1.272	1.535	58.472	2.125
			n	31	12	31	12	30	12	30
1°-2° año		Mediana	635	9.960	7	43	298	10.193	237	
		Rango	12.033	31.278	89	509	1.264	78.000	11.999	
		n	20	11	17	10	19	8	21	
3°-4° año		Mediana	596	12.738	86	133	925	56.170	939	
		Rango	6.136	46.998	189	471	3.681	49.612	11.985	
		n	24	11	15	6	20	8	22	
Baja		basal	Mediana	811	12.143	2	139	181	12.144	201
			Rango	8.100	46.373	210	409	1.095	38.375	1.687
			n	48	18	48	18	45	15	46
	1°-2° año	Mediana	433	3.389	4	35	34	4.536	19	
		Rango	24.985	24.604	97	234	794	19.674	3.710	
		n	18	9	18	9	17	9	18	
	3°-4° año	Mediana	626	11.681	13	32	226	30.997	1.422	
		Rango	20.060	49.972	192	153	1.458	73.142	11.985	
		n	21	9	10	5	17	5	21	

Tabla 5.8. Secreción de citocinas inducidas *in vitro* por la PHA. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Los valores representan pg/ml de cada citocina. Claves: IL, Interleucina; IFN-g, Interferón- gamma; TNF-a, factor de necrosis tumoral-alpha; Basal, pre-TARGA; 1°-2° año, momento temprano=1° y 2° año de TARGA; 3°-4° año, momento tardío=3° y 4° año de TARGA.

5.7.1.- Secreción de citocinas en niños normales VIH-

En las tablas 5.8 y 5.9, y en la columna izquierda de las figuras 5.8 y 5.9, se muestran las medianas, rango y número de cultivos en los que se han cuantificado las citocinas libres de tipo Th1 (IL-2 e IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) y Proinflamatorias (IL-6 y TNF- α). Las células de sangre periférica de estos sujetos (con el equilibrio celular adecuado) responden con altas producciones de IL-2 e IFN- γ a los estímulos PHA (2.328 y 7.929 pg/ml respectivamente) y PWM (2.910 y 6.875 pg/ml respectivamente) y significativamente menores secreciones de IL-4 e IL-5 (respuestas similares para ambas y ante los dos estímulos). La secreción de TNF- α e IL-10 muestran valores in-

termedios (entre 217 y 561 pg/ml respectivamente), y muy inferiores a los obtenidos en IL-6 con los dos estímulos (medianas superiores a 10.000 pg/ml).

Estos valores muestran que las células circulantes de los controles, estimuladas con PHA o PWM, producen más citocinas de tipo Th1 que de tipo Th2. Por ello consideramos por tanto, que la respuesta fisiológica normal a estos estímulos policlonales, es de un predominio de tipo Th1 sobre Th2. Este será el modelo con el que se comparará la respuesta de los niños VIH+ ante los mismos mitógenos y las mismas condiciones de cultivo, salvo el equilibrio o desequilibrio de las poblaciones sembradas en los cultivos. La respuesta inducida de citocinas Proinflamatorias es fácilmente objetivable en los cultivos estimulados con ambos mitógenos, por los altos valores encontrados de IL-6 y TNF- α , especialmente en las respuestas inducidas por PWM.

Eficacia TARGA	momento	estadística	Th1		Th2			Proinflam.		
			IL-2	IFN-g	IL-4	IL-5	IL-10	IL-6	TNF-a	
Controles		Mediana	2.910	6.875	45	29	561	19.462	212	
		Rango	18.857	14.678	390	682	3.845	38.626	16.171	
		n	40	23	18	15	43	16	41	
Alta	basal	Mediana	797	5.836	1	50	412	30.141	655	
		Rango	4.400	20.695	27	370	1.559	28.436	1.428	
		n	14	9	14	9	14	9	14	
	1°-2° año	Mediana	10.687	4.607	15		327		384	
		Rango	16.903	0	28		945		2.129	
		n	4	1	2		4		4	
	3°-4° año	Mediana	10.989	11.818	22		788	41.000	1.270	
		Rango	10.181	22.308	13		1.212	78.000	11.458	
		n	9	4	3		9	2	9	
	Media	basal	Mediana	357	5.233	1	66	499	40.000	323
			Rango	5.117	11.386	72	223	3.778	17.399	938
			n	12	5	12	5	10	5	12
1°-2° año		Mediana	7.228	7.045	1	54	462		503	
		Rango	12.208	6.627	90	82	753		10.724	
		n	7	3	5	3	8		8	
3°-4° año		Mediana	6.635	11.522	72	25	404	31.910	660	
		Rango	14.034	43.613	145	319	1.139	58.603	11.876	
		n	14	7	5	3	16	5	12	
Baja		basal	Mediana	398	4.020	1	45	450	28.490	543
			Rango	2.858	21.527	190	190	2.811	29.820	1.640
			n	16	6	16	6	16	6	16
	1°-2° año	Mediana	1	5.428	1	24	8		38	
		Rango	391	0	75	0	13		877	
		n	3	1	3	1	2		3	
	3°-4° año	Mediana	6.772	6.466	1	27	153	31.565	568	
		Rango	12.329	25.827	0	28	809	33.002	2.524	
		n	12	6	1	2	13	2	12	

Tabla 5.9. Secreción de citocinas inducidas in vitro por la PWM. La tabla representa las medianas, rangos y número de determinaciones (n) en los niños controles y en la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio. Los valores representan pg/ml de cada citocina. Claves: IL, Interleucina; IFN-g, Interferón- gamma; TNF-a, factor de necrosis tumoral-alpha; Basal, pre-TARGA; 1°-2° año, momento temprano=1° y 2° año de TARGA; 3°-4° año, momento tardío=3° y 4° año de TARGA.

5.7.2.- Secreción de Citocinas en cultivos celulares de niños VIH+.

La descripción de los resultados obtenidos en los pacientes VIH+ y comparados con los referidos en los sujetos normales, se hará en paralelo valorando las respuestas a ambos mitógenos (PHA y PWM) de acuerdo al agrupamiento de los niños por el grado de eficacia en la supresión viral observada al TARGA.

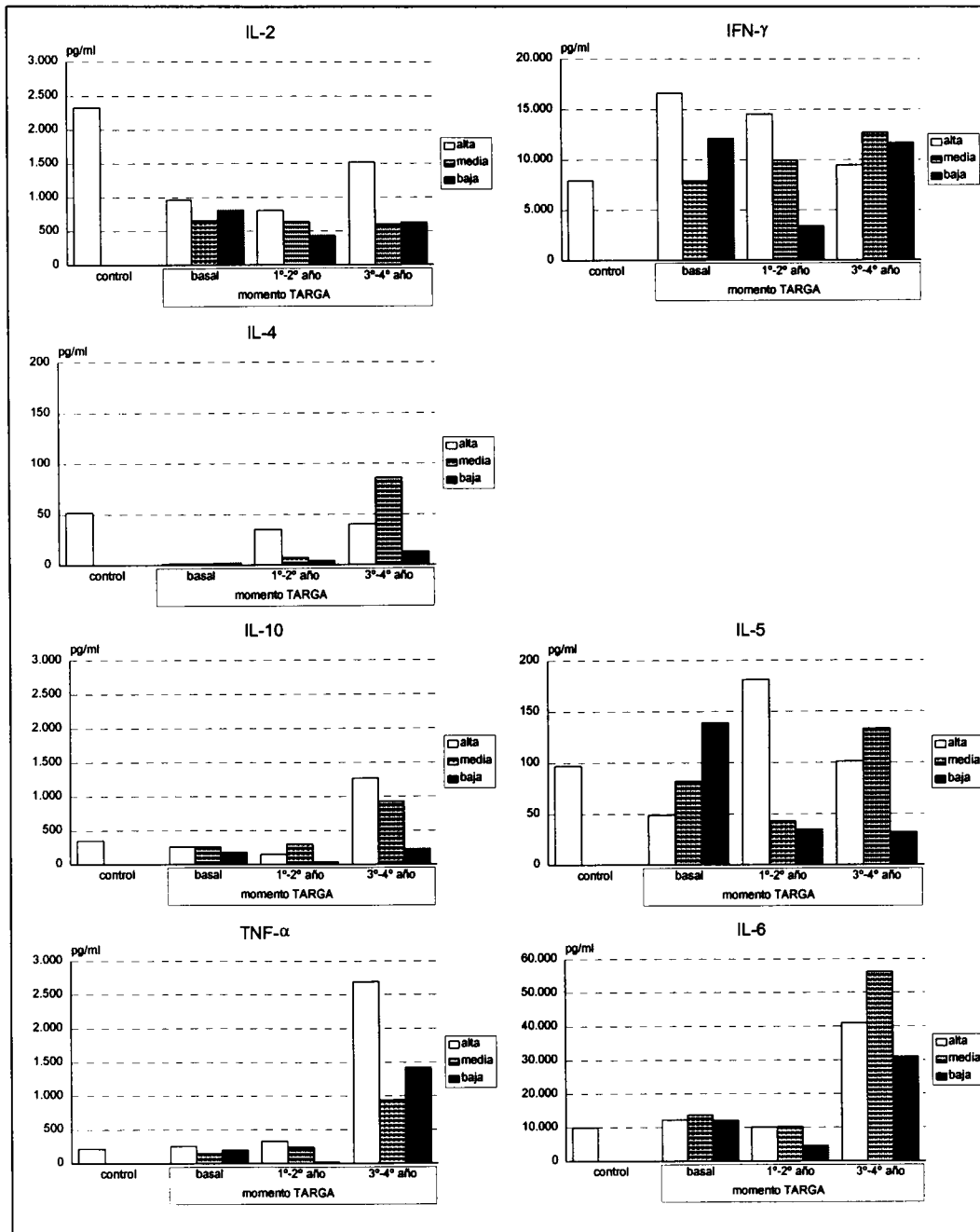


Figura 5.8. Inducción in vitro con PHA de la secreción de citocinas. La figura representa las medianas de las citocinas cuantificadas en el plasma en pg/ml, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.

Las tablas y figuras 5.8 y 5.9, detallan los resultados obtenidos de las citocinas analizadas. En condiciones basales (pre-TARGA) los pacientes VIH(+) muestran un déficit significativo en la secreción de IL-2 en los cultivos estimulados con PHA, y muy significativo ($p < 0,001$) en los estimulados con PWM, sin apreciarse diferencias entre los tres grupos de eficacias al tratamiento. La inducción con PHA muestra que el TARGA no consigue revertir, ni a corto ni largo plazo, el déficit de IL-2 observado. Sin embargo la producción de IL-2 inducida por el PWM muestra que tras el TARGA, independientemente de la eficacia antiviral, el déficit se corrige totalmente, incluso hasta cifras tres veces superiores a la mediana normal.

La secreción de IFN- γ , inducida por PHA y PWM en el momento basal, es similar a la observada en los sujetos normales, o incluso ligeramente incrementada respecto a ellos, y no se modifica con los TARGA ni en momentos tempranos ni tardíos en ninguno de los grupos.

Las citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) se producen, en condiciones basales, en concentraciones bajas, similares a los normales y tampoco se modifican evolutivamente por efecto de los tratamientos TARGA. La secreción de IL-10 inducida por ambos mitógenos es similar a la de los sujetos normales en los tres grupos de pacientes, tanto en condiciones basales como durante el momento temprano del TARGA. Sin embargo, en el momento tardío de éstos (3º y 4º año de tratamiento) se observa, en los niños con respuestas de alta y media eficacia, una mayor capacidad de las células periféricas, en los cultivos estimulados, para producir esta citocina (PHA>PWM).

Las citocinas Proinflamatorias (IL-6 y TNF- α), tanto en los momentos basales como tras los momentos tempranos del tratamiento, no se observan deficitarias. Por el contrario (sin diferencias significativas entre los grupos de niños infectados), los cultivos estimulados con PWM (momento basal y tardío del TARGA) y los estimulados con PHA (momento tardío del TARGA), muestran alta y significativa capacidad productora de ambas moléculas proinflamatorias ($p < 0,001$).

En resumen y de acuerdo con estos datos, en condiciones basales existe un marcado déficit de citocina de tipo Th1 (IL-2), que se corrige en los cultivos con PWM con los tratamientos empleados ya desde las fases tempranas. No se detecta un exacerbación de las citocinas de tipo Th2 en ningún momento explorado pero sí que se

detecta una sobreproducción in vitro de citocinas proinflamatorias que no es eficazmente controlada por los TARGA.

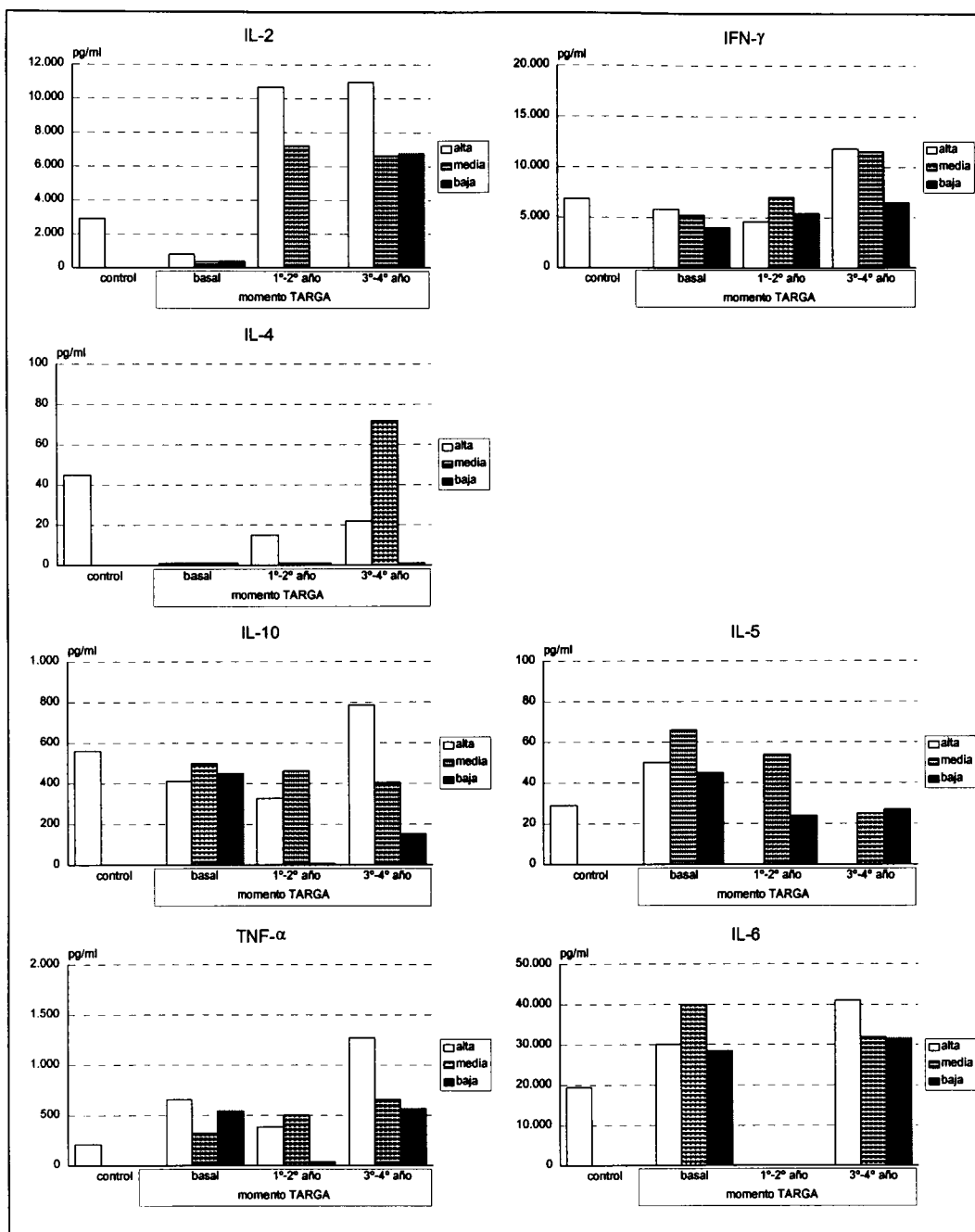


Figura 5.9. Inducción in vitro con PWM de la secreción de citocinas. La figura representa las medianas de las citocinas cuantificadas en el plasma en pg/ml, de los niños controles y de la cohorte de niños VIH+ agrupados por eficacia terapéutica y por momentos de estudio.

6.- Discusión

6.- Discusión	993
6.1.- Grupo de Alta Eficacia	96
6.2.- Grupo de baja eficacia	101
6.3.- Grupo de media eficacia	104

En el trabajo realizado se muestra la recuperación inmunológica que se ha podido observar en los niños VIH+, previamente tratados con antirretrovirales convencionales en mono y biterapia, tras la administración continuada durante cuatro años consecutivos de nuevas combinaciones terapéuticas, más complejas y potentes, denominados TARGA.

En este sentido los TARGA son más complejos en su aplicación y formulación, puesto que incluyen tres o más fármacos que actúan sobre dianas virales diferentes (la RTI y el IP) o que interactúan sobre la misma diana con mecanismos moleculares independientes (por ejemplo, sobre la retrotranscripción los análogos de nucleósido, los análogos de nucleótido y los no nucleósidos). De hecho, en adultos es frecuente la administración de hasta cinco o seis fármacos antivirales simultáneamente^{183,184,185}. En la población infantil, con retrasos legales y de formulaciones respecto a los pacientes adultos, estas nuevas formulaciones han empezado recientemente a ser aplicadas por lo que los estudios sobre su eficacia virológica e inmunológica son escasos aún no están claramente definidas¹⁸⁶.

Además, en adultos y más recientemente en niños, los TARGA han mostrado, a corto plazo, que son más potentes en la supresión de la replicación viral, llegando en el mejor de los casos, a descensos de viremia hasta niveles indetectables. Para conseguir este objetivo es imprescindible que se cumplan al menos las siguientes premisas: buena adherencia del paciente al tratamiento, presencia de virus sensibles, y ausencia de mutaciones que le confieran resistencias. Es más, en ciertos pacientes, los TARGA también han logrado mantener la supresión de la replicación viral durante periodos más prolongados de tiempo, incluso de años^{187,188,189}. En adultos infectados que muestran estas efectividades a los TARGA, la supresión viral conseguida ha detenido la progresión de la enfermedad hacia la inmunodeficiencia global y el sida, incrementando la calidad de vida de los pacientes y, una franca recuperación de las células, precursoras y efectoras, implicadas en las respuestas inmunológicas. En este sentido, los TARGA han conseguido cronificar la infección y, la enfermedad por el VIH, se ha hecho compatible con la vida del paciente. Lo que los TARGA no han conseguido es la erradicación total del VIH del organismo pues éste permanece latente¹⁹⁰ o con baja capacidad replicativa¹⁹¹ en ciertos reservorios celulares¹⁹² y a la espera de que cambien las condi-

ciones adversas que lo controlan (cambios mutacionales que les confieran resistencia a los TARGA y la defectos en la adherencia de los pacientes). De hecho, en pacientes en los TARGA perdieron su efectividad terapéutica, se han observado rebrotes¹⁹³ en la replicación viral, puntuales o prolongados¹⁹⁴, y la reaparición del deterioro de la homeostasis del sistema inmune que habían recuperado¹⁹⁵.

El presente trabajo muestra que en 19 de los 34 niños VIH+ tratados previamente en mono o biterapia las cargas virales en el momento basal (año previo al TARGA) eran superiores a 10.000 copias/ml, y de ellos 6 pacientes con cargas >100.000 copias/ml. Sin embargo, en los otros 15 pacientes de la cohorte, estos regímenes terapéuticos previos consiguieron una supresión viral por debajo de 10.000 copias/ml, y en cinco niños con viremias indetectables. Esta respuesta individual tan diversas ha sido ampliamente documentada^{196,197,198} tanto en adultos como en niños¹⁹⁹, y ha permitido que muchos de los pacientes hallan podido alcanzar la era de los TARGA y beneficiarse de los tratamientos con mayor agresividad antiviral. De hecho, en la cohorte de niños estudiada en este trabajo, también se observan diferentes grados de afectación inmunológica, pues el número de linfocitos CD4⁺ está conservado (C.I. #1) en 10 niños, medianamente afectado (C.I. #2) en 12 niños y muy deteriorado (C.I. #3) en los restantes 12 niños.

Dada la alta eficacia virológica e inmunológica demostrada en adultos^{200,201}, a los 34 niños de la cohorte se les administró tratamientos TARGA ininterrumpidamente a lo largo de cuatro años. Los niños se agruparon como de alta, media o baja eficacia terapéutica antiviral, por las cargas virales observadas en este periodo. El análisis retrospectivo de los datos inmunológicos recogidos durante este periodo de tiempo muestra la recuperación de las células inmunológicas y sus funciones y su correlación con la intensidad y duración de la supresión viral conseguida.

6.1.- Grupo de Alta Eficacia

En los niños con alta eficacia del TARGA (supresión viral intensa e indetectable desde el primer de TARGA y persistente durante los tres años siguientes) se observa:

- a) una franca y persistente recuperación inmunológica,
- b) que ésta es diferencial según el componente celular que se analice, pero que afecta tanto a los linfocitos CD4⁺ como a los CD8⁺ y sus funciones, y

c) que se objetiva en dos momentos cinéticos diferentes.

El hallazgo inmunológico, que precozmente manifiesta la intensa supresión viral, es el incremento significativo de la subpoblación CD4⁺CD45RA (durante el primer año de tratamiento), llegando a normalizar sus valores a partir del segundo año de TARGA y mantener estos niveles durante el tiempo restante del estudio. La persistencia de esta intensa y efectiva supresión viral permite que esta subpoblación se mantenga en el rango fisiológico durante todo el tiempo estudiado. Esta correlación inversa entre alta supresión viral e incremento de la subpoblación CD4⁺CD45RA ha sido anteriormente referida en adultos^{202,203,204,205} y en niños^{206,207}. Es más, la linfopenia de las células CD4⁺CD28⁺, que se evidenció desde el momento basal, revirtió hasta valores normales secuencialmente y en paralelo al incremento de las células CD4⁺ vírgenes. Dado que el marcador CD28 se expresa en casi el 90% de los linfocitos CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺CD28⁺ por triple marcaje), la alta proporción de las células CD4⁺CD45RA (CD3⁺CD4⁺CD45RA) aparecidas de novo en la circulación sanguínea, sugiere que éstas puedan expresar, simultáneamente, las cuatro moléculas y, por lo tanto, ser linfocitos con el fenotipo CD3⁺CD4⁺CD28⁺CD45RA. La repoblación de los linfocitos CD4⁺ con estas cuatro características, muestra que la alta supresión viral conseguida en estos niños permite la recuperación de la linfopenia CD3⁺CD4⁺ con un gran potencial para generar (son vírgenes) nuevas respuestas inmunológicas específicas (son CD28⁺) y responder ante nuevas agresiones antigénicas. La presencia o recuperación de esta subpoblación linfocitaria con sus funciones biológicas ha sido ya referida²⁰⁸.

Dos mecanismos se han postulado para explicar el origen de esta importante e imprescindible subpoblación de linfocitos CD4⁺. Por un lado el incremento de la diferenciación de precursores tímicos y, por otro, el aumento de la movilización y/o redistribución de linfocitos tisulares emergiendo a la circulación periférica (más de un 99% de los linfocitos CD4 se localizan a nivel tisular). En este sentido, tanto en niños como en adultos, recientes estudios avalan la hipótesis que la repoblación de los linfocitos CD4⁺CD45RA es principalmente de origen tímico^{209,210}.

Además, las células analizadas de los niños VIH+ de este grupo de eficacia terapéutica, muestran dos características que definen mejor a los linfocitos CD4⁺ emergentes a la sangre periférica. Por una lado, la ausencia de expresión de HLA-DR, signo evidente de la inmadurez y/o inactividad celular en la que se encuentran. Y, por otro

lado, que la mayoría de los linfocitos CD4⁺ circulantes son CD38⁺. El fenotipo CD38⁺HLA-DR⁻ caracterizan a los linfocitos CD4⁺ recientemente diferenciados de los precursores tímicos^{211,212}.

Los datos aportados en este trabajo, sobre la recuperación de la linfopenia CD4⁺CD45R0 observada en los momentos basales en estos niños con alta supresión viral, muestran dos aspectos a destacar. En primer lugar, que a lo largo de los cuatro años de TARGA esta subpoblación de CD4⁺ madura incrementa su valor basal en un 50%, pero se mantiene significativamente por debajo (linfopenia CD4⁺C45R0: <270 cel/ μ l) de lo observado en los sujetos normales (387 cel/ μ l). En segundo lugar, que la mínima recuperación de esta subpoblación sea menor que la observada en la subpoblación CD4⁺CD45RA soporta que la repoblación de linfocitos CD4⁺ periféricas se deba mayoritariamente a un incremento de la diferenciación de precursores tímicos (células CD4⁺CD45RA) que a una movilización de células maduras^{213,214} de origen periférico (CD4⁺CD45R0).

La alta y prolongada supresión viral observada en estos pacientes VIH+ con respuestas de alta eficacia al TARGA, repercute significativamente sobre la población de linfocitos CD8⁺ pero no en su conjunto sino a nivel de sus subpoblaciones. De hecho, la linfocitosis CD8 global no disminuye significativamente a lo largo de los cuatro años de evolución del TARGA. Sin embargo, los datos observados en esta cohorte de niños muestran que los linfocitos CD8⁺ también se afectan pero solo a nivel de la reordenación de las subpoblaciones que la componen. Así, hay tres características que se detectan en el perfil evolutivo de subpoblaciones de linfocitos CD8⁺, que son claramente diferentes de lo observado y descrito en las subpoblaciones de los linfocitos CD4⁺:

a) con el TARGA disminuyen las linfocitosis basales de las subpoblaciones de células efectoras con fenotipo CD8⁺CD45R0 (maduras), CD8⁺HLA-DR⁺ (activadas) y CD8⁺CD28⁻ (citotóxicas), mientras que en la población de linfocitos CD4⁺ estas son linfopénicas, y no se ven afectadas por los TARGA.

Sin embargo, las altas cifras basales de las subpoblaciones complementarias (CD8⁺CD45RA, CD8⁺CD28⁺, CD8⁺HLA-DR⁻), se mantienen o incluso aumentan en la evolución TARGA, por lo que los valores de la población de linfocitos CD8⁺ no se modifica en su conjunto.

Este reequilibrado evolutivo de las CD8⁺ (intentando revertir hacia la normalidad), es un rasgo que caracteriza la recuperación inmunológica de los niños VIH+ que responden eficazmente al TARGA, pero que no se observa en las mismas subpoblaciones identificadas en los linfocitos CD4⁺. De hecho, altos niveles de células CD8⁺ con fenotipo maduro, activado y/o citotóxico se ha asociado^{215,216} con altas viremias y linfopenia²¹⁷ CD4. En este sentido, en situaciones de alta supresión de la replicación viral, disminuye la presión ejercida sobre el sistema inmunológico y conduce a descensos en las subpoblaciones CD8⁺ efectoras²¹⁸ circulantes, "aparentemente innecesarias".

b) En segundo lugar, la supresión viral conseguida con los TARGA es directamente proporcional al descenso de las linfocitosis de estas subpoblaciones e inversamente proporcional al incremento de las subpoblaciones de los linfocitos CD4⁺, y

c) en tercer lugar, que los cambios cuantitativos mostrados en este estudio sobre el reequilibrado de las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ son poco evidentes en los momentos iniciales del TARGA, pero claramente objetivables en los momentos tardíos, uno o dos años después de que las células CD4⁺ hayan recuperado sus valores normales. En este sentido, y por la cinética de aparición evolutiva, la recuperación de las células CD4⁺ podría considerarse como signo precoz de eficacia y la de los linfocitos CD8⁺ como signo tardío de persistencia de la supresión viral.

Los estudios evolutivos realizados muestran que la alta supresión viral conseguida en los niños que presentan alta eficacia al TARGA, permite una recuperación funcional de los linfocitos de sangre periféricos ya en momentos muy tempranos del tratamiento (primero y segundo año). Esta recuperación funcional coincide en el tiempo con los incrementos significativos de los linfocitos CD4⁺ con fenotipo de célula virgen (CD4⁺CD45RA), CD4⁺CD28⁺, CD4⁺HLA-DR⁻ y CD4⁺D38⁺, sin que en esos momentos se objetiven aún cambios en las subpoblaciones de los linfocitos CD8⁺. Los intensos déficits proliferativos, a todos los mitógenos, y los déficits de secreción de IL-2, observados en las respuestas funcionales del momento basal, revierten totalmente a la normalidad en los dos primeros años de TARGA (eficacia inmunológica temprana), y se mantienen en el periodo tardío del tratamiento, cuando los niveles de célula CD4⁺ circulantes ya están recuperados y próximos a la normalidad. Aunque en este trabajo no se han realizado estudios funcionales con linfocitos CD4⁺ aislados de estos niños, la coincidencia cronológica en su aparición y los datos observados en las otras dos cohortes de niños VIH analizados (ver más adelante), sugieren que las actividades fun-

cionales^{219,220} exploradas se correlacionan²²¹ más con los niveles de linfocitos CD4⁺ circulantes que con los de linfocitos CD8⁺, los cuales se mantienen invariables a lo largo de la evolución del TARGA.

Es más, los niveles normales de IFN γ , sí que estaban conservados en el momento basal (tanto a nivel plasmático como en la secreción inducida in vitro en las células circulantes), cuando los niños VIH+ muestran una linfopenia CD4 simultánea a linfocitosis CD8. La alta repoblación de células CD4⁺ que se observa en los pacientes con alta eficacia no repercute sobre ambos niveles de IFN γ (plasmáticos ni inducidos in vitro) puesto que éstos se mantienen normales e invariables durante los cuatro años de seguimiento. De hecho los linfocitos CD8⁺, incrementados en el momento basal y mantenidos en altas tasas, son células hiperproductoras de esta citocina²²² cuya conservación funcional, es inmunológicamente deseable debido a que es un importante mediador para el control viral²²³. Por lo tanto, las dos citocinas más representativas de las respuesta Th1, la IL-2 y el IFN- γ , de cuya actividad depende la eficacia de las respuestas inmunológicas antivirales, se ven conservadas (IFN- γ) o precozmente recuperadas (IL-2) tras los TARGA²²⁴.

Por el contrario, el análisis de las citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) pone de manifiesto que los TARGA no incrementan ni modifican el nivel plasmático ni la capacidad de las células periféricas para producirlas in vitro²²⁵. De esta forma, el predominio Th1 sobre Th2, el cual estaba en desequilibrio por déficit del primero, que no por exceso del segundo, ha sido restaurado en los pacientes con alta supresión viral.

Por otro lado, los niveles de citocinas proinflamatorias (IL-6 y/o TNF- α) y la capacidad de las células circulantes para producirlas in vitro, se encuentran incrementados en los momentos basales de los pacientes con alta eficacia terapéutica (y en los otros dos grupos de niños VIH+) y se mantienen elevados a lo largo de la evolución del TARGA²²⁶. La persistencia de altos niveles de citocinas proinflamatorias en pacientes altamente respondedores, podría ser un signo indicativo de que la hiperactivación crónica generada por el VIH aún no está normalizada o de la discreta replicación que puede acontecer a nivel tisular y que no se traduce en aumentos de la viremia plasmática²²⁷.

La capacidad de estas células recuperadas y reequilibradas observada en los niños tratados con TARGA para responder in vitro tanto a antígenos de memoria como

a nuevos antígenos es un aspecto que no se ha contemplado en este trabajo. Lo que sí que se ha puesto en evidencia, es la alta repoblación de células cuyos mecanismos intrínsecos para responder funcionalmente están conservados²²⁸. Ello es, por sí mismo, un signo de alta eficacia inmunológica por el TARGA.

Resumiendo, la recuperación funcional temprana y la repoblación de células CD4⁺, que preceden uno o dos años a la reequilibrado subpoblacional de los linfocitos CD8⁺, puede ser un signo de la intensidad de la supresión viral conseguida y de la alta calidad de los linfocitos emergente²²⁹. Sin embargo, tras cuatro años de TARGA los pacientes muestran aún signos inmunológicos de que persiste la replicación mínimamente (indetectable a nivel plasmático): la linfocitosis CD8 final, (aun con reequilibrio parcial de las subpoblaciones) y los niveles elevados de citocinas proinflamatorias.

6.2.- Grupo de Baja Eficacia

En el lado opuesto del espectro de eficacia virológica e inmunológica de los TARGA se encuentran los pacientes que no responden al tratamiento antiviral y mantienen altas viremias a lo largo de los cuatro años de tratamiento TARGA continuado.

El estudio realizado muestra que en los 12 pacientes del grupo de baja eficacia, el TARGA no sólo no ha logrado que disminuyan las cargas virales detectadas en el momento basal (cuando estaban sometidos a mono y biterapia), sino que sus medianas llegan a aumentar hasta 0,7 logaritmos en los cuatro momentos de tratamiento evolutivo contemplado. La ineficacia de los tratamientos TARGA en algunos pacientes infectados por el VIH+ ha sido ampliamente documentada en adultos y en niños, especialmente en los tratados previamente con diferentes combinaciones de antirretrovirales en mono o biterapia. La aparición de resistencia previas por múltiples mutaciones virales, que pueden ser acumulables y perdurables, parece ser la responsable de la ineficacia de los nuevos regímenes TARGA. A pesar de la ineficacia en la contención de la replicación viral, estos niños muestran signos muy discretos de recuperación inmunológica, los cuales sólo se objetivan a nivel de la población de linfocitos CD4⁺. Como se verá a continuación, la linfocitosis CD8 no se modifica, ni se recuperan los defectos funcionales de los linfocitos circulantes hallados in vitro, la respuestas proliferativas o de secreción de citocinas.

El primer aspecto a destacar es que la recuperación de los linfocitos CD4⁺ periféricos no se objetiva en los pacientes no respondedores al TARGA en el primer y segundo año de tratamiento aunque si es evidenciable en el tercer y cuarto año de TARGA (recuperación inmunológica tardía). Pero esta recuperación, además de tardía es incompleta e insuficiente, pues en el último año de seguimiento sólo se han podido objetivar recuperaciones numéricas significativamente inferiores a las conseguidas por el grupo de los respondedores y la normalidad. El análisis de las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺ recuperadas tras los TARGA, muestra que se incrementan significativamente frente a la citopenia que mostraban en el momento basal, tanto las células vírgenes (CD4⁺CD5RA) como las células CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD38⁺ y CD4⁺HLA-DR⁻. Estas subpoblaciones expandidas son de fenotipo similar a las células que se recuperaron en los niños que mostraron alta eficacia.

La discordancia en las respuestas virológicas (baja eficacia) e inmunológicas (recuperación cuantitativa tardía) ha sido observada también en adultos²³⁰, sin que exista una explicación que la justifique. La existencia de esta recuperación de linfocitos CD4⁺ descrita, aunque insuficiente y tardía, podría hablar en favor de prolongar los TARGA en niños VIH+, aunque muestren baja eficacia virológica al tratamiento. La mejoría inmunológica observada podría ser un signo de eficacia virológica que no se reflejase en un descenso de la carga viral, pues existen evidencias que han demostrado que, pacientes tratados con TARGA sin supresión de la viremia poseen, además de mucha basura genética del VIH, virus mutantes que son poco citopáticos²³¹.

Las células CD8⁺, que como población global no disminuye significativamente a lo largo de los cuatro años de tratamiento, muestra discretos signos de reequilibrado parcial de las subpoblaciones, pero eso sí, diferentes de los descritos en los niños con alta eficacia terapéutica. De hecho la linfocitosis de las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ efectoras maduras (CD8⁺CD45R0), activados (CD8⁺HLA-DR⁺) y citotóxicas (CD8⁺CD28⁻), no disminuye significativamente en los cuatro años de tratamiento como se objetiva en los niños con alta eficacia TARGA. Y por el contrario, se incrementan aunque sólo en los momentos tardíos del TARGA (3º y 4º año de tratamiento) las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ vírgenes (CD8⁺CD45RA), no activadas (CD8⁺HLA-DR⁻) y CD8⁺CD28⁺. Este reequilibrado subpoblacional, mantenimiento de la activación y aumento de las células inmaduras, parece indicar que existe una compatibilidad entre repoblación a partir de precursores linfoides (vírgenes) y una persistencia de la replica-

ción viral que conduciría a un mantenimiento de las células CD8⁺ efectoras antivirales (activadas). Como se postulaba anteriormente para explicar el aumento de los linfocitos CD4⁺ en esta población de niños con baja eficacia, quizá la presión farmacológica sobre el virus puede conducir a la aparición de cepas replicativas pero poco citopáticas. Una vez más, si esto fuera cierto, habría que considerar la eficacia de los TARGA tanto por su capacidad para inhibir la replicación viral (medida por las cargas virales circulantes), como por su capacidad para suprimir o modificarla la patogenicidad de los virus replicantes (con otros ensayos que exploren los atributos fenotípicos virales).

Estos pacientes que presentan baja eficacia al TARGA, en los que se observa esta discreta y tardía recuperación y reequilibrio de las subpoblaciones celulares, las deficiencias proliferativas y de secreción de IL-2 inducida en los cultivos no se modifican durante los dos primeros años de tratamiento, pero se corrigen significativamente en el momento tardío (en el 3º y 4º año de TARGA, recuperación funcional tardía). Los defectos funcionales, que se aprecian ante las estimulaciones in vitro, podrían estar relacionados con el grado de linfopenia CD4 severa (C.I. 3) en el periodo basal y temprano de TARGA. Mientras que la recuperación funcional parcial observada tardíamente, podría estar relacionada con el incremento de los linfocitos CD4⁺ (hasta linfopenia moderada, C.I. 2) observado en el mismo periodo.

Como se objetivó también en los niños que presentaron alta eficacia al TARGA, la buena conservación de los niveles de IFN- γ plasmático y de la capacidad de las células circulantes para producir esta citocina in vitro, estaría en consonancia con la persistencia de una linfocitosis CD8 en todos los momentos del estudio. También, como se pudo objetivar en los niños con alta eficacia virológica e inmunológica al TARGA, en los momentos basales, los niveles de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) plasmáticas e inducidas in vitro, se mostraron en la normalidad, y no se modificaron con los tratamientos continuados de tipo TARGA. La implementación de las respuestas Th1 en los momentos tardíos (IL-2 e IFN- γ dependientes) y la falta de modificación de las respuestas de tipo Th2 es un signo cualitativo de la eficacia funcional inmunológica que también puede ser evidenciable aunque la supresión viral no haya sido completa. Como se comentó anteriormente, en la recuperación cuantitativa de las células linfoides periféricas, en los ensayos funcionales también se pudo objetivar la discordancia entre efectividad virológica y efectividad inmunológica funcional. Los niños con baja eficacia virológica al TARGA, mostraron también niveles basales altos de citocinas proinflamatorias. Como

se objetivó en los otros grupos de niños infectados por el VIH estudiados, estos valores elevados de IL-6 y TNF- α no descendieron significativamente tras los TARGA.

6.3.- Grupo de Media Eficacia

El grupo de niños VIH+ que muestra una eficacia media al TARGA se caracteriza por presentar, durante el primer y segundo año de tratamiento, variaciones poco significativas de sus cargas virales y por mostrar, a partir del tercer año de tratamiento, descensos del orden de un logaritmo.

Estos niños, que inician el TARGA con una situación inmunológica intermedia a los dos grupos anteriormente descritos, muestran una dicotomía en el perfil de recuperación inmunológica. Por un lado, el aumento de los linfocitos CD4⁺ es superponible al descrito en los niños de alta eficacia, y claramente diferenciable de los de baja eficacia. Y por las variaciones evolutivas de los linfocitos CD8⁺, se asemejan más a los niños que presentaron baja eficacia que a los de alta eficacia.

En los niños con media eficacia, la recuperación de las subpoblaciones de células CD4⁺ es intensa y persistente y similar a la que se observó en los niños con alta eficacia al TARGA. Se incrementaron evolutivamente las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺CD45RA, CD4⁺CD28⁺, CD4⁺HLA-DR⁻, sin que se produjeran modificaciones relevantes de las subpoblaciones CD4⁺CD28⁻, CD4⁺HLA-DR⁺ y CD4⁺CD45R0.

El reequilibrado de las subpoblaciones de los linfocitos CD8⁺ en estos pacientes con eficacia media al TARGA, tiene características que les asemejan a los otros dos grupos anteriores:

- por los intensos y precoces incrementos observados en las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ vírgenes (CD8⁺CD45RA), CD8⁺CD28⁺, y CD8⁺HLA-DR⁻ se asemejan a los niños que presentaron alta eficacia antiviral, y

- por la ausencia de descensos objetivables en la linfocitosis de las subpoblaciones efectoras de células maduras (CD8⁺CD45R0), activadas (CD8⁺HLA-DR⁺), y citotóxicas (CD8⁺CD28⁻) evolucionan con un patrón similar a los niños de baja eficacia.

Estos hallazgos sugieren que, aunque la disminución de la carga viral no sea absoluta, se puede alcanzar un nivel de inhibición de la expansión viral que permita que se establezca un equilibrio a tres niveles, por un lado repoblar efectivamente las subpoblaciones de linfocitos CD4⁺. Por otro lado que se mantengan las células CD8⁺

efectoras antivirales, y por otro lado que se generen nuevos linfocitos CD8⁺ a partir de precursores. Como se ha podido demostrar, la cinética en la recuperación de los linfocitos CD4⁺ y en el reequilibrado de las subpoblaciones de linfocitos CD8⁺ es posible gracias a los TARGA, y puede ser cronológicamente dependiente de los cambios evolutivos de la viremia.

En los pacientes que presentan eficacia media al TARGA, es igualmente objetivable la correlación entre la recuperación del número de linfocitos CD4⁺ circulantes y la recuperación de las respuestas proliferativas y de secreción *in vitro* de IL-2. Es decir, sus respuestas proliferativas y de secreción de IL-2, que eran deficientes en los momentos basales cuando presentaban linfopenia, revirtió a la normalidad cuando las células CD4⁺ circulantes mostraron valores en la normalidad.

La evolución de las citocinas Th2, los niveles de IFN- γ y citocinas proinflamatorias no se diferencia significativamente de los valores referidos anteriormente en los otros dos grupos de respuesta terapéutica al TARGA.

En resumen, tras cuatro años continuados de TARGA, los niños infectados por el VIH⁺ se benefician inmunológicamente de estos tratamientos. En ellos se puede objetivar una recuperación de los linfocitos CD4⁺, un reequilibrio de los linfocitos CD8⁺ circulantes y la normalización de las respuestas funcionales a estímulos policlonales. La calidad de la supresión viral conseguida (intensidad y persistencia) es el factor limitante más importante que define la intensidad y la cronología de los eventos inmunológicos recuperados. El nivel de eficacia terapéutica observado (viroológica e inmunológica) en los pacientes tratados con TARGA, aunque insuficiente para erradicar definitivamente el virus, suponen una buena contención de la enfermedad a la espera de que se generen nuevos diseños terapéuticos que lo consigan definitivamente

7.- Conclusiones

1.- **No se observan efectos adversos** yatrogénicos en los niños VIH+ derivados de los TARGA, sobre parámetros inmunológicos celulares o funcionales hallados en la normalidad en el momento basal.

2.- Los efectos de los TARGA en la recuperación de las células inmunológicas son **muy evidentes y superiores** que las terapias convencionales.

3.- Los TARGA **son eficaces** en la reconstitución inmunológica de los niños infectados por el VIH.

4.- La eficacia en la recuperación inmunológica es **directamente proporcional** a la eficacia conseguida en la **supresión viral**: cuanto más intensa es la supresión de la replicación del VIH, más evidente es la reconstitución inmunológica.

5.- En niños en TARGA con **Alta supresión viral** (<200 copas/ml, persistente durante 4 años) se objetiva una **alta recuperación inmunológica intensa y progresiva, pero incompleta**:

- Se inicia, en el 1º año, con una significativa **re población** de linfocitos CD4⁺CD45RA y CD4⁺CD28⁺, con valores indiferenciables de la normalidad a partir del 2º año y mantenidos durante los 4 años del TARGA.
- Continúa con **recuperación funcional temprana** (<2º años de TARGA) y completa de deficiencias linfoproliferativas y de secreción de IL-2 inducidas por estímulos policlonales y que persisten en la normalidad.
- Sólo se **corrige tardíamente** (>2º año) la linfocitosis de CD3⁺CD8⁺ con disminución significativa pero parcial, de las subpoblaciones circulantes de células maduras (CD8⁺CD45R0, CD8⁺CD28⁻) y/o activadas (CD8⁺HLA-DR⁺ y CD8⁺CD38⁺).

- Se **mantienen en la normalidad** los valores de CD4⁺CD38⁺ y CD4⁺CD28⁻ y de los linfocitos no primados, CD8⁺CD45RA.
- **Se incrementa el predominio** de citocinas **Th1>Th2** (al aumentar la secreción de IL-2).
- **Pero no se recuperan** las linfopenias de CD4⁺CD45R0 ni la de células CD4⁺CD38⁻, ni los niveles incrementados de citocinas proinflamatorias (IL-6>TNF- α).

6.- En niños VIH+ que ***no responden al TARGA*** (Baja Eficacia anti-viral, mediana global RNA-VIH=55.850 copias/ml):

- **no se observan signos precoces o tempranos** de eficacia sobre el sistema inmunológico.
- los efectos inmunológicos sólo son detectables **muy tardíamente**,
- responden con una ***reconstitución inmunológica parcial***, mostrando:
 - ***incrementos*** significativos, respecto de sus valores basales pero aún linfopénicos respecto a la normalidad, de **linfocitos CD45RA (CD4⁺ y CD8⁺) y CD4⁺CD28⁺**
 - ***recuperación funcional***, parcial y tardía, de las respuestas de linfoproliferación y secreción de IL-2 a estímulos policlonales.
 - ***ineficacia inmunológica***: sobre ***las alteraciones de los linfocitos CD8⁺***, ni disminuye su alto grado de maduración (CD8⁺CD45R0) ni de activación (CD8⁺CD38⁺, CD8⁺DR⁺, CD8⁺CD28⁻)

7.- En los niños VIH+ con **supresión viral parcial (eficacia media)** y medianas plasmáticas de RNA-VIH > 9.050 copias/ml durante los TARGA,

- se observa una **reconstitución inmunológica intermedia** a la de los otros grupos,
- repoblación **selectiva, parcial, temprana y mantenida**, de linfocitos CD4⁺CD45RA y CD4⁺CD28⁺,
- recuperación **funcional parcial** de las respuestas proliferativas y síntesis de IL-2 a estímulos policlonales.
- **sin efectos** detectables sobre el grado de maduración (CD45RO) y la intensidad de la activación (CD38⁺ y DR⁺) de los efectores linfocitarios CD8⁺, cuyos valores se mantienen persistentemente altos.

8.- La administración prolongada de tratamientos TARGA en niños con infección crónica por VIH+, promueven una alta reconstitución numérica y funcional de los linfocitos circulantes en pacientes con supresión viral durante 4 años, que podría ser el inicio de una potenciación inmunológica de nuevos efectores específicos y finalmente, la reconstitución inmunológica completa.

8.- Bibliografía

1. **Stevenson M.** Molecular mechanisms for the regulation of HIV replication, persistence and latency. *AIDS 1997; Suppl A: S25-33.*
2. **Emerman M, Malim MH.** HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science 1998; 280: 1880-4.*
3. **Turner BG, Summers MF.** Structural biology of HIV. *J Mol Biol 1999; 285: 1-32.*
4. **Strebel K, Bour S.** Molecular interactions of HIV with host factors. *AIDS 1999; Suppl A: S13-24.*
5. **Stevenson M, Brichacek B, Heinzinger N, Swindells S, Pirruccello S, Janoff E, Emerman M.** Molecular basis of cell cycle dependent HIV-1 replication. Implications for control of virus burden. *Adv Exp Med Biol 1995; 374: 33-45.*
6. **Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D.** Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med 1996; 124: 654-63.*
7. **Weber J.** The pathogenesis of HIV-1 infection. *Br Med Bull 2001; 58: 61-72.*
8. **Simonsen JN, Fowke KR, MacDonald KS, Plummer FA.** HIV pathogenesis: mechanisms of susceptibility and disease progression. *Curr Opin Microbiol 1998; 1: 423-9.*
9. **Havlir DV, Richman DD.** The role of viral dynamics in the pathogenesis of HIV disease and implications for antiviral therapy. *Springer Semin Immunopathol 1997; 18: 267-83.*
10. **Michael NL.** Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin Immunol 1999; 11: 466-74.*
11. **Kinter A, Arthos J, Cicala C, Fauci AS.** Chemokines, cytokines and HIV: a complex network of interactions that influence HIV pathogenesis. *Immunol Rev 2000; 177: 88-98.*
12. **Rosenberg ZF, Fauci AS.** Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: cytokine induction of HIV expression. *Immunol Today 1990; 11: 176-80.*
13. **Rowland-Jones S, Pinheiro S, Kaul R.** New insights into host factors in HIV-1 pathogenesis. *Cell 2001; 104: 473-6.*
14. **Cohen OJ, Kinter A, Fauci AS.** Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol Rev 1997; 159: 31-48.*
15. **McIntyre J, Gray G.** What can we do to reduce mother to child transmission of HIV? *BMJ 2002; 324: 218-21.*

- 16. Gibb DM, Tess BH.** Interventions to reduce mother-to-child transmission of HIV infection: new developments and current controversies. *AIDS* 1999;13: 593-102.
- 17. Newell ML.** Prevention of mother-to-child transmission of HIV: challenges for the current decade. *Bull World Health Organ* 2001; 79: 1138-44.
- 18. Minkoff H.** Prevention of mother-to-child transmission of HIV. *Clin Obstet Gynecol* 200; 44: 210-25.
- 19. Ugen KE, Von Feldt JM, Weiner DB, Ziegner UH.** Diagnosis and prediction of pediatric HIV-1 infection and AIDS: current status. *J Clin Lab Anal* 1994; 8: 309-14.
- 20. Butensky EA.** The role of nutrition in pediatric HIV/AIDS: a review of micronutrient research. *J Pediatr Nurs* 2001; 16: 402-11.
- 21. Anderson VM, Zevallos E.** Pathology of pediatric AIDS. *Pathology* 1993; 2: 81-101.
- 22. Miller CR.** Pediatric aspects of AIDS. *Radiol Clin North Am* 1997; 35: 1191-221.
- 23. Chadwick EG, Yogev R.** Pediatric AIDS. *Pediatr Clin North Am* 1995; 42: 969-92.
- 24. Centers for Disease Control Working Group.** 1994 Revised Classification System for Human Immunodeficiency Virus Infection in Children Less Than 13 Years of Age. *MMWR* 1994; 43 (RR-12); 1-19.
- 25. Centers for Disease Control Working Group.** Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Pediatric HIV Infection *MMWR* 1998; 47 (RR-4) ; 1-26.
- 26. Romerio F, Gallo RC.** Novel biologic approaches for the treatment of AIDS. *J Lab Clin Med* 1999; 134: 577-84.
- 27. Carr A, Yarchoan R.** AIDS 2000. Clinical treatment: overview. *AIDS* 2000; 14: S187-8.
- 28. Weller IV, Williams IG.** ABC of AIDS: Treatment of infections. *BMJ* 2001; 322: 1350-4.
- 29. Goldschmidt RH, Dong BJ.** Treatment of AIDS and HIV-related conditions: 2001. *J Am Board Fam Pract* 2001; 14: 283-309.
- 30.- Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA.** Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272: 1167-70.
- 31.- Opravil M, Ledergerber B, Furrer H, Hirschel B, Imhof A, Gallant S, Wagners T, Bernasconi E, Meienberg F, Rickenbach M, Weber R; Swiss HIV**

- Cohort Study.** Clinical efficacy of early initiation of HAART in patients with asymptomatic HIV infection and CD4 cell count $> 350 \times 10^6/l$. *AIDS* 2002; 16: 1371-81.
- 32. Trowbridge IS, Thomas ML.** CD45: an emerging role as a protein tyrosine phosphatase required for lymphocyte activation and development. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 85-116.
- 33. Beverley PC, Daser A, Michie CA, Wallace DL.** Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem Soc Trans* 1992; 20: 184-7.
- 34. Gray, D.** Immunological memory. *Annu Rev Immunol*, 1993; 11: 49-77.
- 35. Bradley LM, Bradley JS, Ching DL, Shiigi SM.** Predominance of T cells that express CD45R in the CD4⁺ helper/inducer lymphocyte subset of neonates. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 51: 426-35.
- 36. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverley PC.** Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 1992; 360: 264-5.
- 37. Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, Fernandez-Cruz E.** Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14: 128-35.
- 38. Schnittman SM, Lane HC, Greenhouse J, Justement JS, Baseler M, Fauci AS.** Preferential infection of CD4⁺ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6058-62.
- 39. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, Al BJ, Roos M, Lange JM, Danner SA, Goudsmit J, et al.** Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4⁺ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988; 82: 1908-14.
- 40. Chou CC, Gudeman V, O'Rourke S, Isacescu V, Detels R, Williams GJ, Mitsuyasu RT, Giorgi JV.** Phenotypically defined memory CD4⁺ cells are not selectively decreased in chronic HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7: 665-75.

41. **Levy JA, Mackewicz CE, Barker E.** Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8⁺ T cells. *Immunol Today* 1996; 17: 217-24.
42. **Vanham G, Kestens L, Penne G, Goilav C, Gigase P, Colebunders R, Vandendruaene M, Goeman J, van der Groen G, Ceuppens JL.** Subset markers of CD8⁺ cells and their relation to enhanced cytotoxic T-cell activity during human immunodeficiency virus infection. *J Clin Immunol* 1991; 11: 345-56.
43. **Froebel KS, Doherty KV, Whitelaw JA, Hague RA, Mok JY, Bird AG.** Increased expression of the CD45RO (memory) antigen on T cells in HIV-infected children. *AIDS* 1991; 5: 97-9.
44. **Aldhous MC, Watret KC, Mok JY, Bird AG, Froebel KS.** Cytotoxic T lymphocyte activity and CD8 subpopulations in children at risk of HIV infection. *Clin Exp Immunol* 1994; 97: 61-7.
45. **Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, Timms A, Winter M, Baptista L, Johnson MA, Lee CA, Phillips AN, Janossy G.** 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.
46. **Nixon DF, McMichael AJ.** Cytotoxic T-cell recognition of HIV proteins and peptides. *AIDS* 1991; 5: 1049-59.
47. **Autran B, Plata F, Debre P.** MHC-restricted cytotoxicity against HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4: 361-7.
48. **Bretscher P, Cohn M.** A theory of self-nonself discrimination. *Science* 1970; 169: 1042-9.
49. **Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Anasetti C, Dammle NK.** Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 176: 1595-604.
50. **Rincon M, Flavell RA.** AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes. *EMBO J* 1994; 13: 4370-81.
51. **Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL.** CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev* 1996; 153: 47-83.

- 52. Bluestone JA.** New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity* 1995; 2: 555-9.
- 53. Young JW, Koulova L, Soergel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B.** The B7/BB1 antigen provides one of several costimulatory signals for the activation of CD4⁺ T lymphocytes by human blood dendritic cells in vitro. *J Clin Invest* 1992; 90: 229-37.
- 54. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH.** Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol* 1989; 143: 3183-91.
- 55. Freeman GJ, Boussiotis VA, Anumanthan A, Bernstein GM, Ke XY, Rennert PD, Gray GS, Gribben JG, Nadler LM.** B7-1 and B7-2 do not deliver identical costimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity* 1995; 2: 523-32.
- 56. Barker E, Bossart KN, Locher CP, Patterson BK, Levy JA.** CD8⁺ cells from asymptomatic human immunodeficiency virus-infected individuals suppress superinfection of their peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1996; 77: 2953-62.
- 57. Caruso A, Cantalamessa A, Licenziati S, Peroni L, Prati E, Martinelli F, Canaris AD, Folghera S, Gorla R, Balsari A, et al.** Expression of CD28 on CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes during HIV infection. *Scand J Immunol* 1994; 40: 485-90.
- 58. Borthwick NJ, Bofill M, Gombert WM, Akbar AN, Medina E, Sagawa K, Lipman MC, Johnson MA, Janossy G.** Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28- T cells. *AIDS* 1994; 8: 431-41.
- 59. Niehues T, Ndagijimana J, Horneff G, Wahn V.** CD28 expression in pediatric human immunodeficiency virus infection. *Pediatr Res* 1998; 44: 265-8.
- 60. Fiorentino S, Dalod M, Olive D, Guillet JG, Gomard E.** Predominant involvement of CD8⁺CD28- lymphocytes in human immunodeficiency virus-specific cytotoxic activity. *J Virol* 1996; 70: 2022-6.
- 61. Vingerhoets JH, Vanham GL, Kestens LL, Penne GG, Colebunders RL, Vandenbruaene MJ, Goeman J, Gigase PL, De Boer M, Ceuppens JL.** Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8⁺ T cells from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 425-33.

- 62. Dalod M, Fiorentino S, Delamare C, Rouzioux C, Sicard D, Guillet JG, Gormard E.** Delayed virus-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocyte activity in an HIV-infected individual with high CD4⁺ cell counts: correlations with various parameters of disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 497-506.
- 63. Landay AL, Mackewicz CE, Levy JA.** An activated CD8⁺ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69: 106-16.
- 64. Brinchmann JE, Dobloug JH, Heger BH, Haaheim LL, Sannes M, Egeland T.** Expression of costimulatory molecule CD28 on T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: functional and clinical correlations. *J Infect Dis* 1994; 169: 730-8.
- 65. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E.** Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8⁺ T cells. *Immunol Today* 1996; 17: 217-24.
- 66. Mackewicz CE, Barker E, Levy JA.** Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication. *Science* 1996; 274: 1393-5.
- 67. Roos MT, Miedema F, Meinesz AP, De Leeuw NA, Pakker NG, Lange JM, Coutinho RA, Schellekens PT.** Low T cell reactivity to combined CD3 plus CD28 stimulation is predictive for progression to AIDS: correlation with decreased CD28 expression. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 409-15.
- 68. Caruso A, Licenziati S, Canaris AD, Cantalamessa A, Fiorentini S, Ausenda S, Ricotta D, Dima F, Malacarne F, Balsari A, Turano A.** Contribution of CD4⁺, CD8⁺CD28⁺, and CD8⁺CD28⁻ T cells to CD3⁺ lymphocyte homeostasis during the natural course of HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1998; 101: 137-44.
- 69. Dalod M, Sinet M, Deschemin JC, Fiorentino S, Venet A, Guillet JG.** Altered ex vivo balance between CD28⁺ and CD28⁻ cells within HIV-specific CD8⁺ T cells of HIV-seropositive patients. *Eur J Immunol* 1999; 29: 38-44.
- 70. Mugnaini EN, Haaheim LL, Sannes M, Brinchmann JE.** In vivo expansion coincident with excessive in vitro cell death within the memory subset of CD8⁺ T cells in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 265-72.
- 71. Lewis DE, Tang DS, Adu-Oppong A, Schober W, Rodgers JR.** Anergy and apoptosis in CD8⁺ T cells from HIV-infected persons. *J Immunol* 1994; 153: 412-20.

- 72. Termijtelen A, van Leeuwen A, van Rood JJ.** HLA-linked lymphocyte activating determinants. *Immunol Rev* 1982; 66: 79-101.
- 73. Levacher M, Tallet S, Dazza MC, Dournon E, Rouveix B, Pocidalo JJ.** T activation marker evaluation in ARC patients treated with AZT. Comparison with CD4⁺ lymphocyte count in non-progressors and progressors towards AIDS. *Clin Exp Immunol* 1990; 81: 177-82.
- 74. Zaunders J, Carr A, McNally L, Penny R, Cooper DA.** Effects of primary HIV-1 infection on subsets of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *AIDS* 1995; 9: 561-6.
- 75. Mehta K, Shahid U, Malavasi F.** Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996; 10: 1408-17.
- 76. Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K.** Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 1994; 15: 95-7.
- 77. Radka SF, Charron DJ, Brodsky FM.** Class II molecules of the major histocompatibility complex considered as differentiation markers. *Hum Immunol* 1986; 16: 390-400.
- 78. Malavasi F, Funaro A, Roggero S, Horenstein A, Calosso L, Mehta K.** Human CD38: a glycoprotein in search of a function. *Immunol Today* 1994; 15: 95-7.
- 79. Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, Buonfiglio D, De Monte LB, Pileri A, Malavasi F.** Interaction between endothelium and CD4⁺CD45RA⁺ lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol* 1994; 153: 952-9.
- 80. Deaglio S, Dianzani U, Horenstein AL, Fernandez JE, van Kooten C, Bragardo M, Funaro A, Garbarino G, Di Virgilio F, Banchereau J, Malavasi F.** Human CD38 ligand. A 120-KDA protein predominantly expressed on endothelial cells. *J Immunol* 1996; 156: 727-34.
- 81. Deaglio S, Morra M, Mallone R, Ausiello CM, Prager E, Garbarino G, Dianzani U, Stockinger H, Malavasi F.** Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *J Immunol* 1998; 160: 395-402.
- 82. Prince HE, Arens L, Kleinman SH.** CD4 and CD8 subsets defined by dual-color cytofluorometry which distinguish symptomatic from asymptomatic blood donors seropositive for human immunodeficiency virus. *Diagn Clin Immunol* 1987; 5: 188-93.

- 83. Giorgi JV, Ho HN, Hirji K, Chou CC, Hultin LE, O'Rourke S, Park L, Margolick JB, Ferbas J, Phair JP.** CD8⁺ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR⁺ CD38⁻ CD8⁺ cells is associated with subsequent stable CD4⁺ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. *J Infect Dis* 1994; 170: 775-81.
- 84. Bouscarat F, Levacher-Clergeot M, Dazza MC, Strauss KW, Girard PM, Ruggeri C, Sinet M.** Correlation of CD8 lymphocyte activation with cellular viremia and plasma HIV RNA levels in asymptomatic patients infected by human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 17-24.
- 85. Roos MT, Lange JM, de Goede RE, Coutinho RA, Schellekens PT, Miedema F, Tersmette M.** Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 427-32.
- 86. Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocidallo JJ, Bach BA.** The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 376-82.
- 87. Plaeger-Marshall S, Isacescu V, O'Rourke S, Bertolli J, Bryson YJ, Stiehm ER.** T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: three-color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71: 19-26.
- 88. Rich KC, Brambilla D, Pitt J, Moye J, Cooper E, Hillyer G, Mendez H, Fowler MG, Landay A.** Lymphocyte phenotyping in infants: maturation of lymphocyte subpopulations and the effects of HIV infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85: 273-81.
- 89. McIntosh K, Pitt J, Brambilla D, Carroll S, Diaz C, Handelsman E, Moye J, Rich K.** Blood culture in the first 6 months of life for the diagnosis of vertically transmitted human immunodeficiency virus infection. The Women and Infants Transmission Study Group. *J Infect Dis* 1994; 170: 996-1000.
- 90. Rich KC, Chang BH, Mofenson L, Fowler MG, Cooper E, Pitt J, Hillyer GV, Mendez H.** Elevated CD8⁺DR⁺ lymphocytes in HIV-exposed infants with early positive HIV cultures: a possible early marker of intrauterine transmission. Women and Infants Transmission Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 15: 204-10.

91. Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JC, Wijnholds FJ, de Vos NM, Nottet HS, Visser MR, Snippe H, Verhoef J, Boucher CA. 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. *J Infect Dis* 1998; 178: 1279-87.
92. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997; 387: 183-8.
93. Ferdman RM, Church JA. Immunologic and virologic effects of glucocorticoids on human immunodeficiency virus infection in children: a preliminary study. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 212-6.
94. Kovacs JA, Baseler M, Dewar RJ, Vogel S, Davey RT Jr, Falloon J, Polis MA, Walker RE, Stevens R, Salzman NP, et al. Increases in CD4 T lymphocytes with intermittent courses of interleukin-2 in patients with human immunodeficiency virus infection. A preliminary study. *N Engl J Med* 1995; 332: 567-75.
95. Carcelain G, Blanc C, Leibowitch J, Mariot P, Mathez D, Schneider V, Saimot AG, Damond F, Simon F, Debre P, Autran B, Girard PM. T cell changes after combined nucleoside analogue therapy in HIV primary infection. *AIDS* 1999; 13: 1077-81.
96. Borkowsky W, Stanley K, Douglas SD, Lee S, Wiznia A, Pelton S, Yogev R, McIntosh K, Nachman S. Immunologic response to combination nucleoside analogue plus protease inhibitor therapy in stable antiretroviral therapy-experienced human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis* 2000; 182: 96-103.
97. Prince HE, Jensen ER. Three-color cytofluorometric analysis of CD8 cell subsets in HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4: 1227-32.
98. Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, Timms A, Winter M, Baptista L, Johnson MA, Lee CA, Phillips AN, Janossy G. 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.
99. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A, Batista L, Winter M, Sabin CA, Johnson M, Lee CA, Phillips A, Janossy G. CD8⁺,CD38⁺ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring

- HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14: 158-62.
- 100. Perfetto SP, Malone JD, Hawkes C, McCrary G, August B, Zhou S, Garner R, Dolan MJ, Brown AE.** CD38 expression on cryopreserved CD8⁺ T cells predicts HIV disease progression. *Cytometry* 1998; 33: 133-7.
- 101. Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hultin P, Schmid I, Matud JL, Detels R, Giorgi JV.** Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry* 1996; 26: 1-7.
- 102. de Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Vierucci A.** Different meaning of CD38 molecule expression on CD4⁺ and CD8⁺ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res* 1998; 43: 752-8.
- 103. Burgisser P, Hammann C, Kaufmann D, Battegay M, Rutschmann OT.** Expression of CD28 and CD38 by CD8⁺ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. The Swiss HIV Cohort Study. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 458-63.
- 104. Sirera R, Bayona A, Carbonell F, Perez-Tamarit A, Otero MC, Asensi F, Gonzalez-Molina A.** The expression of CD38 and DR are markers of immune activation and disease progression in HIV⁺ children. *12th World AIDS Conference: Geneva, Switzerland, June 1998, Abstract 213*/31166, p. 528 Casparie: Meerhugowaard, The Netherlands.*
- 105. Savarino A, Bottarel F, Calosso L, Feito MJ, Bensi T, Bragardo M, Rojo JM, Pugliese A, Abbate I, Capobianchi MR, Dianzani F, Malavasi F, Dianzani U.** Effects of the human CD38 glycoprotein on the early stages of the HIV-1 replication cycle. *FASEB J* 1999; 13: 2265-76.
- 106. Lathey JL, Kanangat S, Rouse BT, Agosti JM, Spector SA.** Dysregulation of cytokine expression in monocytes from HIV-positive individuals. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 347-52.
- 107. Savarino A, Pugliese A, Martini C, Pich PG, Pescarmona GP, Malavasi F.** Investigation of the potential role of membrane CD38 in protection against cell death induced by HIV-1. *J Biol Regul Homeost Agents* 1996; 10: 13-8.

-
- 108. Kameoka M, Auwanit W, Suzuki S, Horikoshi H, Khelai-Khlam N, Meguro T, Yamada K, Tanaka Y, Yoshihara K, Luftig RB, Ikuta K.** A specific T-cell subset with CD4⁺/CD38⁻ markers derived from HIV-1 carriers induces apoptosis in healthy donor-derived T-lymphocytes. *Virus Res* 1998; 56: 115-22.
- 109. Bentin, J., C. Tsoukas, J. A. McCutchan, S. E. Spector, D. D. Richman, and J. H. Vaugfan.** Impairment in T-lymphocyte responses during early infection with the human immunodeficiency virus. *J Clin Immunol* 1989; 9: 159-168.
- 110. Lane, H. C., J. L. Depper, W. C. Greene, G. Whalen, T. A. Waldmann, and A. S. Fauci.** Qualitative analysis of immune function patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1985; 313: 79-84.
- 111. Gruters, R. A., F. G. Terpstra, R. De Jong, C. J. M. Van Noesel, R. A. W. Van Lier, and F. Miedema.** Selective loss of T-cell functions in different stages of HIV infections. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1039-1044.
- 112. Schellekens, P. T. A., M. T. L. Roos, F. De Wolf, J. M. A. Lange, and F. Miedema.** Low T-cell responsiveness to activation via CD3/TCR is a prognostic marker for AIDS in HIV-1 infected men. *J Clin Immunol* 1990; 10: 121-127.
- 113. Ballet, J. J., L. J. Coudrec, C. Rabian-Herzog, C. Duval-Roy, F. Janier, M. Danon, J. P. Clauvel, and M. Seligmann.** Impaired T-lymphocyte dependent immune responses to microbial antigens in patients with HIV-1 associated persistent generalized lymphadenopathy. *AIDS* 1988; 2: 291-297.
- 114. Clerici, M., N. I. Stocks, R. A. Zajac, R. N. Boswell, D. R. Lucey, C. S. Via, and G. M. Shearer.** Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Invest* 1989; 84: 1892-1899.
- 115. Hofmann, B., K. D. Jakobsen, N. Odum, E. Dickmeiss, P. Platz, L. P. Ryder, C. Pedersen, L. Mathiesen, I. Bygbjerg, V. Faber, and A. Sveffgaard.** HIV induced immunodeficiency. Relatively preserved phytohemagglutinin as opposed to decreased pokeweed mitogen responses may be due to possibly preserved responses via CD2/phytohemagglutinin pathway. *J Immunol* 1989; 142: 1874-1880.
- 116. Shearer, G. M., D. C. Bernstein, K. S. K. Tung, C. S. Via, R. Redfield, S. Z. Salahuddin, and R. C. Gallo.** A model for the selective loss of major histocompa-

- tibility complex self restricted T-cell immune responses during the development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J Immunol* 1986; 137: 2514-2521.
- 117. Roos, M. T. L., F. Miedema, M. Koot, M. Tersmette, W. P. Schaasberg, R. A. Coutinho, and P. T. A. Schellekens.** T-cell function *in vitro* is an independent progression marker for AIDS in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic individuals. *J Infect Dis* 1995; 171: 531-536.
- 118. Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, Sher A, Coffman RL, Shearer GM.** Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 1994; 93: 768-75.
- 119. Daftarian MP, Diaz-Mitoma F, Creery WD, Cameron W, Kumar A.** Dysregulated production of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by peripheral blood lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals is associated with altered proliferative responses to recall antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 712-8.
- 120. Canque B, Rosenswajg M, Gluckman JC.** HIV replication and lack of alteration of phytohemagglutinin-induced lymphokine production by peripheral blood mononuclear cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 9: 204-6.
- 121. Eylar EH, Baez I, Vazquez A, Colon-Martinez SL, Yamamura Y.** Suppressed proliferative response and interleukin-2 production in hispanic HIV⁺ and AIDS T-cell subsets. *Cell Mol Biol* 1995; 41: S25-33.
- 122. Dolan, J. M., M. Clerici, S. P. Blatt, C. W. Hendrix, G. P. Melcher, R. N. Boswell, T. M. Freeman, W. Ward, R. Hensley, and G. M. Shearer.** *In vitro* T-cell function, delayed-type hypersensitivity skin testing and CD4 T-cell subset phenotyping independently predict survival time in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1995; 172: 79-87.
- 123. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J.** Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4⁺ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997; 277: 112-6.

- 124. Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA.** Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996; 173: 321-9.
- 125. Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, Rousseau F, Wade M, Roe JD, Martinez A, Kessler H.** Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998; 178: 70-9.
- 126. Powderly WG, Landay A, Lederman MM.** Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA* 1998; 280: 72-7.
- 127. Romagnani, S.** Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the 'natural' immune responses?. *Immunol Today* 1992; 13: 379-84.
- 128. Swain, SL.** Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity* 1994; 1: 543-9.
- 129. Seder, R. A. and W. E. Paul.** 1994. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4⁺ T cells. *Annu Rev Immunol* 1994; 12: 635-74.
- 130. Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, Takaoka C, Kashima N, Yoshimoto R, Hamuro J.** Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature* 1983; 302: 305-10.
- 131. Smith KA.** T-cell growth factor. *Immunol Rev* 1980; 51: 337-57.
- 132. Zubler RH, Lowenthal JW, Erard F, Hashimoto N, Devos R, MacDonald HR.** Activated B cells express receptors for, and proliferate in response to, pure interleukin 2. *J Exp Med* 1984; 160: 1170-83.
- 133. Biron CA, Young HA, Kasaian MT.** Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells in vivo. *J Exp Med* 1990; 171: 173-88.
- 134. Malkovsky M, Loveland B, North M, Asherson GL, Gao L, Ward P, Fiers W.** Recombinant interleukin-2 directly augments the cytotoxicity of human monocytes. *Nature* 1987; 325: 262-5.
- 135. Djeu JY, Liu JH, Wei S, Rui H, Pearson CA, Leonard WJ, Blanchard DK.** Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2. *J Immunol* 1993; 150: 960-70.

- 136. Kono T, Minami Y, Taniguchi T.** The interleukin-2 receptor complex and signal transduction: role of the beta-chain. *Semin Immunol* 1993; 5: 299-307.
- 137. Mogensen SC, Virelizier JL.** The interferon-macrophage alliance. *Interferon* 1987; 8: 55-84.
- 138. Degliantoni G, Murphy M, Kobayashi M, Francis MK, Perussia B, Trinchieri G.** Natural killer (NK) cell-derived hematopoietic colony-inhibiting activity and NK cytotoxic factor. Relationship with tumor necrosis factor and synergism with immune interferon. *J Exp Med* 1985; 162: 1512-30.
- 139. Giacomini P, Tecce R, Gambari R, Sacchi A, Fisher PB, Natali PG.** Recombinant human IFN-gamma, but not IFN-alpha or IFN-beta, enhances MHC- and non-MHC-encoded glycoproteins by a protein synthesis-dependent mechanism. *J Immunol* 1988; 140: 3073-81.
- 140. Christmas SE.** Cytokine production by T lymphocytes bearing the gamma-delta T cell antigen receptor. *Chem Immunol* 1992; 53: 32-46.
- 141. Grabstein K, Eisenman J, Mochizuki D, Shanebeck K, Conlon P, Hopp T, March C, Gillis S.** Purification to homogeneity of B cell stimulating factor. A molecule that stimulates proliferation of multiple lymphokine-dependent cell lines. *J Exp Med* 1986; 163: 1405-14.
- 142. Lowenthal JW, Castle BE, Christiansen J, Schreurs J, Rennick D, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Howard M.** Expression of high affinity receptors for murine interleukin 4 (BSF-1) on hemopoietic and nonhemopoietic cells. *J Immunol* 1988; 140: 456-64.
- 143. Snapper CM, Finkelman FD, Paul WE.** Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med* 1988; 167: 183-96.
- 144. Gordon J, Cairns JA, Millsum MJ, Gillis S, Guy GR.** Interleukin 4 and soluble CD23 as progression factors for human B lymphocytes: analysis of their interactions with agonists of the phosphoinositide "dual pathway" of signalling. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1561-5.
- 145. Takatsu K, Tominaga A, Harada N, Mita S, Matsumoto M, Takahashi T, Kikuchi Y, Yamaguchi N.** T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties. *Immunol Rev* 1988; 102: 107-35.

- 146. Takatsu K, Tanaka K, Tominaga A, Kumahara Y, Hamaoka T.** Antigen-induced T cell-replacing factor (TRF). III. Establishment of T cell hybrid clone continuously producing TRF and functional analysis of released TRF. *J Immunol* 1980; 125: 2646-53.
- 147. Takatsu K.** Interleukin-5. *Curr Opin Immunol* 1992; 4: 299-306.
- 148. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR.** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-95.
- 149. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE.** Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 1991; 174: 915-24.
- 150. Van Damme J, Opdenakker G, Simpson RJ, Rubira MR, Cayphas S, Vink A, Billiau A, Van Snick J.** Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1987;165: 914-9.
- 151. Chen-Kiang S, Hsu W, Natkunam Y, Zhang X.** Nuclear signaling by interleukin-6. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 124-8.
- 152. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al.** Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* 1986; 324: 73-6.
- 153. Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H.** Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7251-5.
- 154. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 3666-70.

- 155. Sugarman BJ, Aggarwal BB, Hass PE, Figari IS, Palladino MA Jr, Shepard HM.** Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science* 1985; 230: 943-5.
- 156. Paul NL, Ruddle NH.** Lymphotoxin. *Annu Rev Immunol* 1988; 6: 407-38.
- 157. Yamamoto N.** The role of cytokines in the acquired immunodeficiency syndrome. *Int J Clin Lab Res* 1995; 25: 29-34.
- 158. Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS.** Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2365-8.
- 159. Krasnow SW, Zhang LQ, Leung KY, Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ.** Tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1, and phorbol myristate acetate are independent activators of NF-kappa B which differentially activate T cells. *Cytokine* 1991; 3: 372-9.
- 160. Margolick JB, Volkman DJ, Folks TM, Fauci AS.** Amplification of HTLV-III/LAV infection by antigen-induced activation of T cells and direct suppression by virus of lymphocyte blastogenic responses. *J Immunol* 1987; 138: 1719-23.
- 161. Koyanagi Y, O'Brien WA, Zhao JQ, Golde DW, Gasson JC, Chen IS.** Cytokines alter production of HIV-1 from primary mononuclear phagocytes. *Science* 1988; 241: 1673-5.
- 162. Yamada O, Hattori N, Kurimura T, Kita M, Kishida T.** Inhibition of growth of HIV by human natural interferon in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1988; 4: 287-94.
- 163. Taylor MD, Korth MJ, Katze MG.** Interferon treatment inhibits the replication of simian immunodeficiency virus at an early stage: evidence for a block between attachment and reverse transcription. *Virology* 1998; 241: 156-62.
- 164. Giorgi JV, Fahey JL, Smith DC, Hultin LE, Cheng HL, Mitsuyasu RT, Detels R.** Early effects of HIV on CD4 lymphocytes in vivo. *J Immunol* 1987; 138: 3725-30.
- 165. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, Shearer GM.** 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. *J Clin Invest* 1989; 84: 1892-9.

- 166. Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, Wynn TA, Shearer GM.** Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* 1993; 91: 759-65.
- 167. Clerici M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, Sher A, Coffman RL, Shearer GM.** Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 1994; 93: 768-75.
- 168. Barcellini, W. , G. P. Rizzardi, M. O. Borghi, C. Fain, A. Lazzarin, and P. L. Meroni.** TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients. *AIDS* 1994; 8: 757-63.
- 169. Clerici, M. and G. M. Shearer.** The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: New insights. *Immunol Today* 1994; 15: 575-9.
- 170. Hu, R. , N. Oyaizu, V. S. Kalyanaraman, and S. Pahwa.** HIV-1 gp160 as a modifier of Th1 and Th2 cytokine response: Gp160 suppresses interferon-gamma and interleukin-2 production concomitantly with enhanced interleukin-4 production in vitro. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1994; 73:245-52.
- 171. Meyaard, L. , S. A. Otto, I. P. M. Keet, R. A. W. Vanlier, and F. Miedema.** Changes in cytokine secretion patterns of CD4⁺ T-cell clones in human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1994; 84: 4262-9.
- 172. Caterinoderaujo, A.** The CD4⁺ T-cell network and the cytokine profile after HIV- 1 infection. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28: 2-14.
- 173. Barcellini, W. , G. P. Rizzardi, C. Velati, M. O. Borghi, C. Fain, A. Lazzarin, and P. L. Meroni.** In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from high-risk HIV-negative intravenous drug users. *AIDS* 1995; 9: 691-10.
- 174. Romagnani, S. and E. Maggi. 1994.** Th1 versus Th2 responses in AIDS. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 616-21.
- 175. Hengel RL, Nicholson JK.** An update on the use of flow cytometry in HIV infection and AIDS. *Clin Lab Med* 2001; 21: 841-56.
- 176. Centers for Disease Control Working Group.** 1994 Revised Guidelines for the Performance of CD4+ T-Cell Determinations in Persons with Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infections. *MMWR* 1994; 43 (RR-3); 1-21.

- 177. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV.** Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS* 1990; 4: 479-97.
- 178. Giorgi JV.** Characterization of T lymphocyte subset alterations by flow cytometry in HIV disease. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 677: 126-37.
- 179. De Groote, D. , P. F. Zangerle, Y. Gevaert, M. F. Fassotte, Y. Beguin, J. Noizat-Pirenne, R. Gathy, M. Lopez, I. Dehart, D. Igot, M. Baudrihaye, D. Delacroix, and P. Franchimont.** 1992. Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 1992; 4:239-58.
- 180. Zangerle, P. F., D. De Groote, M. Lopez, R. J. Meuleman, Y. Vrindts, F. Fauchet, I. Dehart, M. Jadoul, D. Radoux, and P. Franchimont.** Direct stimulation of cytokines (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood. II. Application to rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Cytokine* 1992; 4: 568-82.
- 181. Wilson, B. M. G., A. Severn, N. T. Rapson, J. Chana, and P. Hopkins.** A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumor necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Methods* 1991; 139: 233-8.
- 182. Bloemena, E. , M. T. L. Ross, J. L. A. M. Van Heijst, J. M. J. J. Vossen, and P. T. A. Schellekens.** Whole-blood lymphocyte cultures. *J Immunol Methods* 1989; 122: 161-71.
- 183. Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA.** Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996; 173: 321-9.
- 184. Lederman MM, Connick E, Landay A, Kuritzkes DR, Spritzler J, St Clair M, Kotzin BL, Fox L, Chiozzi MH, Leonard JM, Rousseau F, Wade M, Roe JD, Martinez A, Kessler H.** Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* 1998; 178: 70-9.
- 185. Landay AL, Bettendorf D, Chan E, Spritzler J, Schmitz JL, Bucy RP, Gonzalez CJ, Schnizlein-Bick CT, Evans T, Squires KE, Phair JP.** Evidence of

- immune reconstitution in antiretroviral drug-experienced patients with advanced HIV disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 95-102.
- 186. Borkowsky W, Stanley K, Douglas SD, Lee S, Wiznia A, Pelton S, Yogev R, McIntosh K, Nachman S.** Immunologic response to combination nucleoside analogue plus protease inhibitor therapy in stable antiretroviral therapy-experienced human immunodeficiency virus-infected children. *J Infect Dis* 2000; 182: 96-103.
- 187. van Rossum AM, Scherpbier HJ, van Lochem EG, Pakker NG, Slieker WA, Wolthers KC, Roos MT, Kuijpers JH, Hooijkaas H, Hartwig NG, Geelen SP, Wolfs TF, Lange JM, Miedema F, de Groot R; Dutch Study Group for Children with HIV Infections.** Therapeutic immune reconstitution in HIV-1-infected children is independent of their age and pretreatment immune status. *AIDS* 2001; 15: 2267-75.
- 188. Appay V, Hansasuta P, Sutton J, Schrier RD, Wong JK, Furtado M, Havlir DV, Wolinsky SM, McMichael AJ, Richman DD, Rowland-Jones SL, Spina CA.** Persistent HIV-1-specific cellular responses despite prolonged therapeutic viral suppression. *AIDS* 2002; 16: 161-70.
- 189. 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.
- 190. McCoig C, Van Dyke G, Chou CS, Picker LJ, Ramilo O, Vitetta ES.** An anti-CD45RO immunotoxin eliminates T cells latently infected with HIV-1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 11482-5.
- 191. Baldanti F, Paolucci S, Gulminetti R, Maserati R, Migliorino G, Pan A, Maggiolo F, Comolli G, Chiesa A, Gerna G.** Higher levels of HIV DNA in memory and naive CD4(+) T cell subsets of viremic compared to non-viremic patients after 18 and 24 months of HAART. *Antiviral Res* 2001; 50: 197-206.
- 192. Patterson BK, McCallister S, Schutz M, Siegel JN, Shults K, Flener Z, Landay A.** Persistence of intracellular HIV-1 mRNA correlates with HIV-1-specific immune responses in infected subjects on stable HAART. *AIDS* 2001; 15: 1635-41.
- 193. Garcia F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G, Pumarola T, Gallart T, Miro JM, Gatell JM.** Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13: F79-86.

- 194. Scott-Algara D, Aboulker JP, Durier C, Badell E, Marcellin F, Prud'homme M, Jouanne C, Meiffredy V, Brun-Vezinet F, Pialoux G, Raffi F; The ANRS-072 Trial Group.** CD4 T cell recovery is slower in patients experiencing viral load rebounds during HAART. *Clin Exp Immunol* 2001; 126: 295-303.
- 195. Wellons MF, Ottinger JS, Weinhold KJ, Gryszowka V, Sanders LL, Edwards LJ, Gooding ME, Thomasch JR, Bartlett JA.** Immunologic profile of human immunodeficiency virus-infected patients during viral remission and relapse on antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2001; 183: 1522-5.
- 196. Abbate I, Dianzani F, Turriziani O, Antonelli G, D'Offizi G, Galati V, Pierdominici M, Pandolfi F, Capobianchi MR.** Changes in host cell molecules acquired by circulating HIV-1 in patients treated with highly active antiretroviral therapy and interleukin-2. *AIDS* 2001; 15: 11-6.
- 197. Plana M, Martinez C, Garcia F, Maleno MJ, Barcelo JJ, Garcia A, Lejeune M, Vidal C, Cruceta A, Miro JM, Pumarola T, Gallart T, Gatell JM.** Immunologic reconstitution after 1 year of highly active antiretroviral therapy, with or without protease inhibitors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29: 429-34.
- 198. Knapp S, Lenz P, Gerlitz S, Rieger A, Meier S, Stingl G.** Highly active antiretroviral therapy responders exhibit a phenotypic lymphocyte pattern comparable to that of long-term nonprogressors. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 126: 248-56.
- 199. Navarro J, Resino S, Bellon JM, Abad ML, Gurbindo D, Fernandez-Cruz E, Munoz-Fernandez MA.** Association of CD8+ T lymphocyte subsets with the most commonly used markers to monitor HIV type 1 infection in children treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 525-32.
- 200. Kaufmann GR, Zaunders JJ, Cunningham P, Kelleher AD, Grey P, Smith D, Carr A, Cooper DA.** Rapid restoration of CD4 T cell subsets in subjects receiving antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection. *AIDS* 2000; 14: 2643-51.
- 201. Kaufmann GR, Zaunders JJ, Cunningham P, Cooper DA.** Phenotypic analysis of CD8+ T lymphocytes in a cohort of HIV type 1-infected patients treated with saquinavir, zidovudine, and two nucleoside analogs for 1 year, and association with plasma HIV type 1 RNA. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 963-72.

- 202. Degen O, Stellbrink HJ, Lauer J, van Lunzen J.** Highly active antiretroviral therapy leads to a significant but delayed increase of CD45RA⁺ T-helper cells. *AIDS* 1998; 12: 1715-6.
- 203. Munoz-Calleja C, Costantini A, Silvestri G, Butini L, Regnery CM, Mancini S, Montroni M.** Highly active antiretroviral therapy induces specific changes in effector and central memory T cell sub-populations. *AIDS* 2001; 15: 1887-90.
- 204. Tortajada C, Garcia F, Plana M, Gallart T, Maleno MJ, Miro JM, Gatell JM.** Comparison of T-cell subsets' reconstitution after 12 months of highly active antiretroviral therapy initiated during early versus advanced states of HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25: 296-305.
- 205. Sondergaard SR, Aladdin H, Ullum H, Gerstoft J, Skinhoj P, Pedersen BK.** Immune function and phenotype before and after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 21: 376-83.
- 206. Resino S, Navarro J, Bellon JM, Gurbindo D, Leon JA, Munoz-Fernandez MA.** Naive and memory CD4⁺ T cells and T cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 2001; 125: 266-73.
- 207. Vigano A, Pinti M, Nasi M, Moretti L, Balli F, Mussini C, Bricalli D, Sala N, Bugarini R, Vella S, Principi N, Cossarizza A.** Markers of cell death-activation in lymphocytes of vertically HIV-infected children naive to highly active antiretroviral therapy: the role of age. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 439-45.
- 208. Blazevic V, Jankelevich S, Steinberg SM, Jacobsen F, Yarchoan R, Shearer GM.** Highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children: analysis of cellular immune responses. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 943-8.
- 209. Ometto L, De Forni D, Patiri F, Trouplin V, Mammano F, Giacomet V, Giaquinto C, Douek D, Koup R, De Rossi A.** Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *AIDS* 2002; 16: 839-49.
- 210. Correa R, Munoz-Fernandez A.** Effects of highly active antiretroviral therapy on thymical reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected children. *AIDS* 2002; 16: 1181-3.

- 211. Teixeira L, Valdez H, McCune JM, Koup RA, Badley AD, Hellerstein MK, Napolitano LA, Douek DC, Mbisa G, Deeks S, Harris JM, Barbour JD, Gross BH, Francis IR, Halvorsen R, Asaad R, Lederman MM.** Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *AIDS* 2001; 15: 1749-56.
- 212. Mehta K, Shahid U, Malavasi F.** Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996; 10: 1408-17.
- 213. Walker RE, Carter CS, Muul L, Natarajan V, Herpin BR, Leitman SF, Klein HG, Mullen CA, Metcalf JA, Baseler M, Falloon J, Davey RT Jr, Kovacs JA, Polis MA, Masur H, Blaese RM, Lane HC.** Peripheral expansion of pre-existing mature T cells is an important means of CD4⁺ T-cell regeneration HIV-infected adults. *Nat Med* 1998; 4: 852-6.
- 214. Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V, Bosche MC, Metcalf JA, Stevens RA, Lambert LA, Alvord WG, Polis MA, Davey RT, Dimitrov DS, Lane HC.** Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4⁺ and CD8⁺ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13778-83.
- 215. Navarro J, Resino S, Bellon JM, Abad ML, Gurbindo D, Fernandez-Cruz E, Munoz-Fernandez MA.** Association of CD8⁺ T lymphocyte subsets with the most commonly used markers to monitor HIV type 1 infection in children treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 525-32.
- 216. Tilling R, Kinloch S, Goh LE, Cooper D, Perrin L, Lampe F, Zaunders J, Hoen B, Tsoukas C, Andersson J, Janossy G; on behalf of the Quest Study Group.** Parallel decline of CD8⁺/CD38⁺⁺ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS* 2002 ; 16: 589-96.
- 217. Caselli D, Comolli G, Maccabruni A, Klersy C, Minoli L.** CD38/CD8 expression and HAART failure. *Lancet* 1999; 353: 840-1.
- 218. Behbahani H, Landay A, Patterson BK, Jones P, Pottage J, Agnoli M, Andersson J, Spetz AL.** Normalization of immune activation in lymphoid tissue fol-

- lowing highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25: 150-6.
- 219. Lange CG, Valdez H, Medvik K, Asaad R, Lederman MM.** CD4+ T-lymphocyte nadir and the effect of highly active antiretroviral therapy on phenotypic and functional immune restoration in HIV-1 infection. *Clin Immunol* 2002; 102: 154-61.
- 220. Zhang Y, Huber M, Weissbrich B, Voss G, Langmann P, Klinker H, Jassoy C.** Characterization of HIV-specific proliferative T cell responses in HIV-infected persons. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17: 623-9.
- 221. Stylianou E, Aukrust P, Nordoy I, Muller F, Froland SS.** Enhancement of lymphocyte proliferation induced by interleukin-12 and anti-interleukin-10 in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy. *APMIS* 2000; 108: 601-7.
- 222. Fournier S, Rabian C, Alberti C, Carmagnat MV, Garin JF, Charron D, Derouin F, Molina JM.** Immune recovery under highly active antiretroviral therapy is associated with restoration of lymphocyte proliferation and interferon-gamma production in the presence of *Toxoplasma gondii* antigens. *J Infect Dis* 2001; 183: 1586-91.
- 223. Stylianou E, Aukrust P, Bendtzen K, Muller F, Froland SS.** Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART)-possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection. *Clin Exp Immunol* 2000; 119: 479-85.
- 224. Imami N, Antonopoulos C, Hardy GA, Gazzard B, Gotch FM.** Assessment of type 1 and type 2 cytokines in HIV type 1-infected individuals: impact of highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1499-508.
- 225. Stylianou E, Aukrust P, Nordoy I, Muller F, Froland SS.** Enhancement of lymphocyte proliferation induced by interleukin-12 and anti-interleukin-10 in HIV-infected patients during highly active antiretroviral therapy. *APMIS* 2000; 108: 601-7.
- 226. Havlir DV, Torriani FJ, Schrier RD, Huang JY, Lederman MM, Chervenak KA, Boom WH.** Serum interleukin-6 (IL-6), IL-10, tumor necrosis factor (TNF) alpha, soluble type II TNF receptor, and transforming growth factor beta levels in

human immunodeficiency virus type 1-infected individuals with Mycobacterium avium complex disease. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 298-303.

227. Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS.

Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2365-8.

228. Blazevic V, Sahgal N, Kessler HA, Landay AL, Shearer GM.

T cell responses to recall antigens, alloantigen, and mitogen of HIV-infected patients receiving long-term combined antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000; 16: 1887-93.

229. Weiss L, Ancuta P, Girard PM, Bouhlal H, Roux A, Cavillon NH, Kazatchkine MD.

Restoration of normal interleukin-2 production by CD4+ T cells of human immunodeficiency virus-infected patients after 9 months of highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 1999; 180: 1057-63.

230. Mugnaini EN, Haaheim LL, Sannes M, Brinchmann JE.

In vivo expansion coincident with excessive in vitro cell death within the memory subset of CD8⁺ T cells in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 265-72.

231. Liegler TJ, Hayden MS, Lee KH, Hoh R, Deeks SG, Granta RM.

Protease inhibitor-resistant HIV-1 from patients with preserved CD4 cell counts is cytopathic in activated CD4 T lymphocytes. *AIDS* 2001; 15: 179-84.

