

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO



**VALOR PRONÓSTICO DE LA NEOPTERINA EN EL PROGRESO DE LA
INFECCIÓN POR VIH Y SU CORRELACIÓN CON OTROS MARCADORES
UTILIZADOS ACTUALMENTE EN LA EVALUACIÓN DE ACTIVACIÓN
INMUNE EN PACIENTES VIH POSITIVOS EN PANAMÁ**

DALIS MOJICA DE GARCIA

PROFESOR ASESOR: DR. JUAN MIGUEL PASCALE

TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR POR EL
GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS CON ESPECIALIZACION
EN INMUNOLOGIA

PANAMA, REPUBLICA DE PANAMA

2006

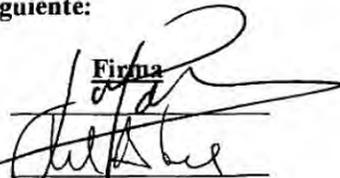
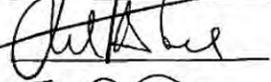


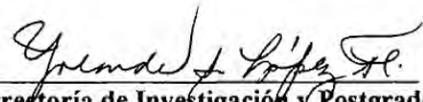
UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICA

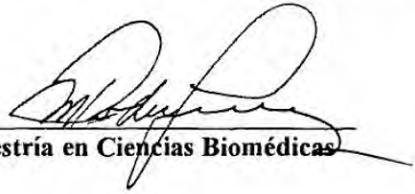
ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Siendo las 4:30 p m del día miércoles 9 de agosto del año 2006, en el Salón de Profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Panamá, se dió inicio a la sustentación de la Tesis, para optar el Título de Maestría en Ciencias Biomédicas con especialización en Inmunología, defendida por la estudiante Dalis Mojica, con cédula de identidad 8-517-1628 y cuyo título es: VALOR PRONÓSTICO DE LA NEOPTERINA EN EL PROGRESO DE LA INFECCIÓN POR VIH Y SU CORRELACIÓN CON OTROS MARCADORES UTILIZADOS ACTUALMENTE EN LA EVALUACIÓN DE ACTIVACIÓN INMUNE EN PACIENTES VIH POSITIVO EN PANAMA

La calificación asignada por los miembros del Jurado, es la siguiente:

	<u>Calificación</u>	<u>Firma</u>
Dr. Juan Pascale (Presidente):	<u>100</u>	
Dr. Manuel Adames (Miembro):	<u>100</u>	
Dr. Tomás Díez (Miembro):	<u>99</u>	
Promedio y calificación final:	<u>99.7 %</u>	

Magíster Yolanda López 
Representante de la Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Dra. Melita Rodríguez: 
Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas

57

- 4 MAY 2007

Por el apoyo y comprensión de siempre de mi esposo y por las horas de espera que tomé
prestadas de mis hijos José Domingo y Milagros Esther en este largo caminar
....*a ustedes* dedico este trabajo.

Obsequio del autor

1235

Agradezco a Dios por bendecirme con buenos maestros en mi formación profesional, por orientar mi profesión y por el trabajo que me brinda la oportunidad de aplicar mis conocimientos con espíritu de superación y entrega.

INDICE GENERAL

	Página
I- Resumen.....	1
II- Introducción.....	2
III- Fundamento teórico.....	7
1. Generalidades.....	7
2. VIH-Descubrimiento, características moleculares y biológicas.....	10
3. Transmisión y ciclo vital del VIH-1.....	14
4. Respuestas inmunitarias.....	17
a. Respuestas inmunes del hospedero.....	17
b. Mecanismos de evasión inmune del virus y susceptibilidad al VIH-1.....	22
c. Intervención del HLA, quimiocinas, citoquinas y otros factores solubles en las respuestas inmunes.....	23
5. Evolución de la enfermedad.....	30
6. Marcadores de laboratorio en la progresión de la enfermedad.....	38
7. Tratamiento y vacunas – Perspectivas.....	56
IV- Justificación y uso de los resultados.....	60
V- Hipótesis de trabajo.....	61
VI- Objetivos.....	61
VII- Aspectos metodológicos.....	62
1. Sujetos de estudio.....	62
2. Universo de estudio, selección y tamaño de la muestra.....	63

3. Unidad de análisis y observación.....	63
4. Criterios de inclusión y exclusión.....	64
5. Recolección de la información y medición de marcadores.....	65
a. Conteo de linfocitos T CD4 + y T CD8+.....	65
b. Medición de Carga Viral.....	68
c. Concentración de Neopterina.....	70
6. Análisis estadístico.....	70
7. Consideraciones éticas.....	71
VIII- Resultados.....	72
IX- Discusión.....	88
X- Conclusiones.....	92
XI- Recomendaciones.....	94
XII- Referencias bibliográficas.....	95
XIII- Anexos.....	100

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro I	Marcadores evaluados en los grupos de muestras de pacientes infectados con el VIH (sin SIDA y con SIDA) y en el grupo control.....74
Cuadro II	Porcentaje de muestras sin SIDA según conteos específicos de linfocitos T CD4+, carga viral y neopterina.....75
Cuadro III	Porcentaje de muestras con SIDA según conteos específicos de linfocitos T CD4, carga viral y neopterina.....77
Cuadro IV	Correlación entre los diferentes parámetros estudiados (r).....83
Cuadro V	Valores promedios de Neopterina y de CD4/NPT por estratificación de la carga viral en la población estudiada.....84

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Número estimado de personas que viven con el VIH y prevalencia del VIH en adultos, mundialmente y en Africa subshariana, 1985-2005.....9
Figura 2	Estructura del VIH-1.....12
Figura 3	Genoma del VIH-1.....13
Figura 4	Ciclo de vida del VIH-1 –Representación del virus entrando a la célula diana.....16
Figura 5	Interacción entre CTLs, células T colaboradoras y células presentadoras de antígeno.....19
Figura 6	Revisión esquemática de la respuesta del hospedero a nivel celular, local y sistémico.....21
Figura 7	Representación del VIH-1 entrando en la célula diana con la participación del CCR5.....27
Figura 8	Tropismo de cepas del VIH-1 con las células pulmonares.....27
Figura 9	Mecanismo de depleción de células T CD4 colaboradoras.....32
Figura 10	Histogramas para 4 colores.....43
Figura 11	Biosíntesis de la neopterina.....47
Figura 12	Producción de neopterina promovida por el INF γ48
Figura 13	Curso de la neopterina y detección de anticuerpos en la infección por el VIH-1.....50
Figura 14	Diagrama esquemático del curso de la neopterina en los pacientes VIH-1.....54

Figura 15	Coulter® EPICS XL™ and EXPO 32 ADC utilizado en el conteo de linfocitos T CD4+ y T CD8+.....	67
Figura 16	Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test (Roche Diagnostics System) utilizado en la cuantificación del ARN del VIH-1 (carga viral).....	69
Figura 17	Conteos de linfocitos T CD4+, T CD8+ y carga viral y la relación CD4/CD8 y CD4/neopterina en la población estudiada.....	78
Figura 18	Concentración de neopterina en la población estudiada.....	81
Figura 19	Correlación entre neopterina y carga viral en el grupo sin SIDA sin tratamiento.....	82
Figura 20	Correlación entre los índices CD4/neopterina y CD4/CD8 en el grupo con SIDA con tratamiento.....	86
Figura 21	Valores promedios de NPT y CD4/NPT en el grupo control y de acuerdo con la carga viral.....	87

ABREVIATURAS UTILIZADAS

VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
T CD4+	Linfocitos T CD4 positivos
T CD8+	Linfocitos T CD8 positivos
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
CD4/CD8	Índice Linfocitos T CD4 positivos / Linfocitos T CD8 positivos
NPT	Neopterina
CD4/NPT	Índice de Linfocitos T CD4 positivos/ Neopterina
INF γ	Interferón gamma
β 2 -M	Beta 2 Microglobulina
GTP	Trifosfato de Guanosina
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
ICGES	Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud
HIM	Procedimiento estándar para determinación de carga viral por VIH-1
HIS	Procedimiento ultrasensible para determinación de carga viral por VIH-1
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad

RESUMEN

La Neopterina (NPT: Pteridina Trisfostato de Guanosina) es liberada a la circulación por macrófagos activados por el interferón gamma. En el presente estudio evaluamos el valor pronóstico de la neopterina en el progreso de la infección por VIH y su correlación con otros marcadores. Evaluamos el conteo de células CD4, carga viral por VIH y neopterina en 108 muestras de sangre incluyendo 88 pacientes VIH+ (con SIDA y sin SIDA) y 20 sujetos VIH-. El conteo de CD4, la carga viral por VIH y la neopterina fueron evaluados usando citometría de flujo, Amplicor HIV Monitor Test 1.5 y por ELISA competitivo, respectivamente. La concentración promedio de neopterina fue 5.7 nmol/L en el grupo control; sin embargo, altas concentraciones (45.8 nmol/L) se presentaron en pacientes infectados sin SIDA sin tratamiento. Se presentó una fuerte correlación directa entre el índice CD4/CD8 y el índice CD4/NPT ($r=0.973$) en los pacientes con SIDA con TARV (terapia antiretroviral). Los índices CD4/NPT observados fueron 182.2 (IC: 149.1-215.4), 57.9 (IC: 39.3-77.6) y 5.2 (IC: 0.6-9.8) en el grupo control, pacientes con cargas virales bajas (<100,000 copias/ml) y pacientes con cargas virales altas ($\geq 100,000$ copias/ml), respectivamente. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.0001$) en las concentraciones de neopterina en los pacientes con SIDA con respecto al tratamiento. Se encontró una fuerte correlación directa ($r=0.814$) entre la neopterina y carga viral en pacientes sin SIDA sin TARV; sin embargo, se observó una correlación inversa entre neopterina y conteos de CD4 ($r = -0.485$) en el mismo grupo de pacientes. Nuestros resultados demuestran el posible beneficio de la medición de neopterina y el índice de CD4/NPT como marcadores pronósticos adicionales de progresión en los pacientes con SIDA.

SUMMARY

Neopterin (NPT: pteridine guanosine triphosphate) is released into circulation from interferon gamma activated macrophages. In the current study we evaluated the prognostic value of neopterin in the progression of HIV infection and its correlation with others markers. We have evaluated CD4 T-cell counts, HIV viral load and neopterin levels in 108 blood samples including 88 HIV+ patients (with and without AIDS) and 20 HIV negative subjects. CD4 T-cell counts, HIV viral load and neopterin levels were evaluated by using flow cytometry, Amplicor HIV Monitor Test 1.5 and by competitive ELISA, respectively. Mean neopterin concentration was 5.7 nmol/L in the control group; however, higher levels (45.8 nmol/L) were present in patients with AIDS without treatment. Strong direct correlation between CD4/CD8 and CD4/NPT ratios was shown ($r = 0.973$) in patients with AIDS under HAART (Highly active antiretroviral therapy). The observed CD4/NPT ratios were 182.2 (IC: 149.1-215.4), 57.9 (IC: 39.3-77.6) and 5.2 (IC: 0.6-9.8) in controls, patients with low viral loads (<100,000 copies/ml) and high viral loads ($\geq 100,000$ copies/ml), respectively. Statistically significant differences ($p<0.0001$) in neopterin concentrations were obtained in AIDS patients with respect to treatment. Strong direct correlation ($r = 0.814$) between neopterin level and viral load was found in patients without AIDS, not receiving HAART; however, an inverse correlation was observed between neopterin levels and CD4 T-cell counts (0.485) in the same group of patients. Our results demonstrated the possible benefit of measuring plasma neopterin and the CD4/NPT ratio as additive prognostic markers of progression in patients with AIDS.

INTRODUCCIÓN

El SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) es causado por el VIH –1 (Virus de Inmunodeficiencia Humana) y se caracteriza por manifestaciones clínicas diversas entre ellas inmunosupresión con infecciones oportunistas y neoplasias malignas asociadas y degeneración del Sistema Nervioso Central (SNC). El SIDA es la enfermedad causada por el VIH-1 (Hogan et al., 2001).

El sistema inmune tiene un papel central en el control viral y por ende en la patogénesis de la enfermedad. El VIH-1 infecta al hombre atacando con más frecuencia a las células T CD4+ y cuando éstas se multiplican para combatir la infección replican dentro de ellas más copias del VIH-1 lo cual destruye el sistema inmunitario del hospedero quien temporalmente controla la infección aguda, pero que no es capaz de erradicar la infección por el VIH-1 ni evitar el establecimiento de la infección crónica en las células de los tejidos linfoides. La continua pérdida de los linfocitos T CD4+ ocasiona perjuicios en el hospedero. Diversos estudios han sugerido que las células T colaboradoras específicas se requieren para mantener una efectiva respuesta de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) en la infección por VIH-1. Los CTLs son las células efectoras de la inmunidad celular y su función es destruir células infectadas por el virus. La función de las células T colaboradoras se deteriora luego de la infección por el VIH-1 y la pérdida de ellas puede ser una razón para la subsecuente insuficiencia del control viral por parte de las CTLs (Hogan et al., 2001).

La epidemia ocasionada por el VIH-1 se identificó por primera vez en la década de los años de 1980. Actualmente, el grado de morbimortalidad y la repercusión global de

la pandemia de VIH/SIDA en los recursos de atención sanitaria y en la economía son enormes y continúan en aumento. De acuerdo a la Organización Mundial de Salud (OMS), 14,000 nuevos casos e infecciones por el VIH-1 ocurren cada día alrededor del mundo. Se estima que en las Américas alrededor de 2.8 millones de personas viven con el VIH y de ellas 1.4 millones corresponden a América Latina donde más del 90% de los individuos infectados viven en condiciones de pobreza relativa. En Panamá, desde 1984 hasta diciembre de 2005, se han registrado 2,809 individuos infectados por el VIH-1 y 6,894 casos notificados de SIDA según estadísticas del Ministerio de Salud (MINSAL).

El diagnóstico temprano es importante para el paciente y el control de la epidemia. Actualmente, no existe inmunización profiláctica ni curación para el SIDA aunque los tratamientos son prometedores. La introducción de una terapia antiretroviral potente ha dado como resultado un descenso significativo en cuanto a morbilidad y mortalidad en las personas infectadas con el VIH-1. A mediados de los años 90 se tuvo la disponibilidad de tratamiento antiretroviral altamente activo (HAART, del inglés *Highly Active Antiretroviral Therapy*) lo cual permitió el descenso de las muertes relacionadas con el SIDA y el surgimiento de una nueva era en la cual muchas personas diagnosticadas con la infección por el VIH pudieron tener una expectativa de vida activa y productiva.

Las observaciones clínicas han permitido ubicar a los pacientes a lo largo de la evolución al SIDA, pero los marcadores de laboratorio asociados con la progresión de la infección por el VIH-1 son los que han ayudado a entender la patogénesis y el pronóstico de una enfermedad que presenta índices de progresión diferentes en individuos diferentes,

que va desde “progresión rápida” hasta una “no progresión a largo plazo”.(Kiepiela et al., 2005).

Diversos estudios han establecido la existencia de tres categorías de marcadores pronósticos con relación a la infección por VIH (Fahey et al., 1998 e Immanuel et al., 2005). Ellos incluyen la cuantificación de la carga viral por VIH-1, el conteo de células T CD4+ y la concentración en el plasma de marcadores de activación inmune como citoquinas, neopterina, β -2 Microglobulina (β -2 M), receptor soluble de la IL-2 (sIL-2R) y receptor II soluble del TNF α (sTNFRII), entre otros.

El proceso patológico primario es la depleción progresiva de los linfocitos T CD4+ lo cual conduce a la disfunción inmune y representa el resultado del daño generado e indica cuando iniciar tratamiento. El periodo asintomático de la infección depende de la virulencia de la cepa viral y del estatus inmunológico del paciente. La carga viral refleja la magnitud de esa replicación viral y es indicador sensible de respuesta al tratamiento (Chan et al., 1990).

Estudios realizados por Ortigao de Sampaio et al. (1999), demostraron que el conteo de linfocitos T CD4+ es considerado la prueba más confiable para monitorear progresión de la enfermedad en niños infectados con VIH-1 y que reciben tratamiento antiretroviral. Posteriormente, Save's et al. 2001) demostraron en sus estudios que tanto la carga viral por el ARN del VIH-1 como el conteo de células T CD4+ son altos predictores de progresión al SIDA. Sin embargo, estos investigadores señalan los requerimientos de una combinación de marcadores en el plasma para llenar a cabalidad este propósito.

La activación del sistema inmune es un componente adicional en la patogénesis del VIH-1 y los productos de esa activación representan cambios inmunológicos en el cuerpo humano. La concentración de marcadores de activación inmune en el plasma es un factor importante en la infección por el VIH-1 y se relaciona con la clínica de la enfermedad (Immanuel et al., 2005).

En la presente investigación hemos enfocado nuestra atención en la neopterinina (6-D-eritro-trishidroxipropilpterina) como marcador de activación inmune y su correlación con los otros marcadores actualmente utilizados en Panamá en el seguimiento de los pacientes con la infección por el VIH-1. La neopterinina es un producto derivado de pteridina de trifosfato de guanósina (GTP) el cual es liberado en la circulación a partir de macrófagos activados, en respuesta a la estimulación por interferón gamma (INF- γ) (Wirleitner et al, 2005). Altas concentraciones de neopterinina indican incremento en la producción endógena de INF- γ y representan altos índices de replicación viral. El INF- γ ha demostrado ser un buen monitor de activación inmune celular, es una citoquina pro-inflamatoria Th1 con un papel central en la patogénesis de la infección por VIH-1 e influye en la inmunodeficiencia y la neurodegeneración de dichos pacientes. La activación de la inmunidad celular es detectada tempranamente, antes de se produzcan anticuerpos medibles y, por tanto, la formación de neopterinina ocurre antes de que tenga lugar la seroconversión mediada de anticuerpos. En este sentido, varios estudios dirigen la aplicación de neopterinina en el tamizaje de donantes de sangre y órganos (Kiepiela et al., 2005).

El suero de individuos sanos no contiene concentraciones significativas de neopterinina. Es importante señalar, que el aumento en la concentración de neopterinina no

es específico de la infección por el VIH-1. Se han visto aumentos en otras infecciones (virus, parásitos o bacterias intracelulares), desórdenes autoinmunes, malignidades y rechazo de injertos. Sin embargo, en esas otras infecciones las concentraciones de neopterina se normalizan durante la seroconversión, después que el sistema inmune ha eliminado exitosamente al patógeno. Esto no ocurre en la infección por el VIH-1 y, además, la presencia de coinfecciones en los pacientes infectados por el VIH-1 tiene también un valor pronóstico (Immanuel et al., 2005).

La literatura presenta planteamientos contradictorios respecto a la utilización de marcadores de activación inmune en el progreso de infección por el VIH-1. Muchos de estos cuestionamientos van dirigidos a la falta de especificidad, sensibilidad o poder predictivo. El conteo de linfocitos CD4+ y la carga viral por el VIH-1 son por el momento los únicos marcadores validados en el seguimiento de los pacientes infectados por el VIH-1 y hasta la fecha no se ha validado ningún marcador de activación adicional. Actualmente, dichos marcadores representan para el paciente elevados costos económicos y pérdidas cuantiosas para el sistema de salud sobretodo cuando, por falta de dichos reactivos, el seguimiento se ve interrumpido y no existen datos sobre la respuesta inmunológica al tratamiento.

Para el monitoreo de la progresión de la enfermedad y respuesta al tratamiento se hace necesario, entonces, el estudio de marcadores de activación inmune como la neopterina, pues requerimos de opciones metodológicas económicas, de fácil ejecución y sobretodo que hayan sido validadas en nuestro país.

FUNDAMENTO TEORICO

1. GENERALIDADES:

Los primeros casos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fueron informados en 1981 en los informes de MMWR (Morbidity and Mortality Weekly Report) del Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC) donde se describían 5 casos de neumonía por *Pneumocystis carinii*.

El agente causal de SIDA fue identificado hasta 1983 y se le llamó Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1 (HIV-1). En 1986, un segundo retrovirus antigénicamente distinto fue aislado de los pacientes con SIDA en Africa Occidental y fue llamado HIV-2 (Wang et al., 2000). El HIV-2 prevalece en Africa Occidental y el HIV-1 en el resto del mundo.

Los primeros síntomas atribuibles a un episodio de infección primaria por el VIH-1 fueron publicados por Cooper et al. (1985). Estos fueron 12 hombres homosexuales con cuadros clínicos similares a una infección por mononucleosis (fiebre, faringitis y exantema), pero con serología negativa por el Virus Epstein Barr. El cuadro clínico fue llamado “Síndrome Retroviral Agudo”. En ese mismo año se empezaron a desarrollar pruebas que detectaban la infección por el VIH-1. El Servicio de Salud Pública (PHS, del inglés *Public Health Service*) de los Estados Unidos recomendó tamizaje para la detección de anticuerpos contra el VIH-1 en donantes de sangre y

plasma. Al final de ese año un total de 874 pruebas fueron establecidas y 79,100 personas fueron tamizadas.

El informe de ONUSIDA (2006) sobre la epidemia mundial del SIDA (Figura 1), estima que, aproximadamente, 38.6 millones (33.4-46.0 millones) de personas en todo el mundo estaban viviendo con el VIH-1 a final de 2005; de acuerdo con el mismo informe, el año pasado se infectaron 4.1 millones (3.4-6.2 millones) de personas y que 2.8 millones (2.4-3.3 millones) perdieron la vida como consecuencia del SIDA. La tasa de incidencia del VIH-1 (la proporción de personas que se han infectado por el virus) alcanzó su punto máximo a finales de la década del 90; la misma se ha estabilizado desde entonces, a pesar de la creciente incidencia en varios países de Africa.

Señala el informe, que Africa sigue siendo el epicentro mundial de la pandemia de SIDA y que en América Latina, el VIH-1 infectó a unas 140,000 (100,000-420,000) personas durante 2005, lo que eleva a 1,6 millones (1,2-2,4 millones) el número total de personas que viven con el virus. Notables avances se han logrado en el acceso al tratamiento en países como Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, México, Panamá, Uruguay y Venezuela.

En Panamá, según datos del Departamento de Vigilancia de Factores Protectores y de Riesgos a la Salud y Enfermedades (F.P.R.S.E.) del Ministerio de Salud (MINSAL), el número de infectados desde 1984 hasta el año 2005 fue de 2,809 con una relación hombre/mujer de 1.5/1, donde el grupo de edad más afectado (15.2%) fue el de 25-29 años y las tasas más altas se registraron en Colón (211.3%), Panamá Metro (131.9%) y Kuna Yala (131.5%). De acuerdo con este informe, la tasa de SIDA por 100,000

habitantes en el año 2005 fue de 20.88 y el número de casos de SIDA notificados corresponde a 6,894 casos.

El incremento en la infección por el VIH repercute en un aumento presupuestario significativo para el país. Se estima que el costo anual en Panamá para un paciente infectado por el VIH-1 es de B/. 1,251.00 (sin hospitalización) y B/. 4,117.00 (con hospitalización).

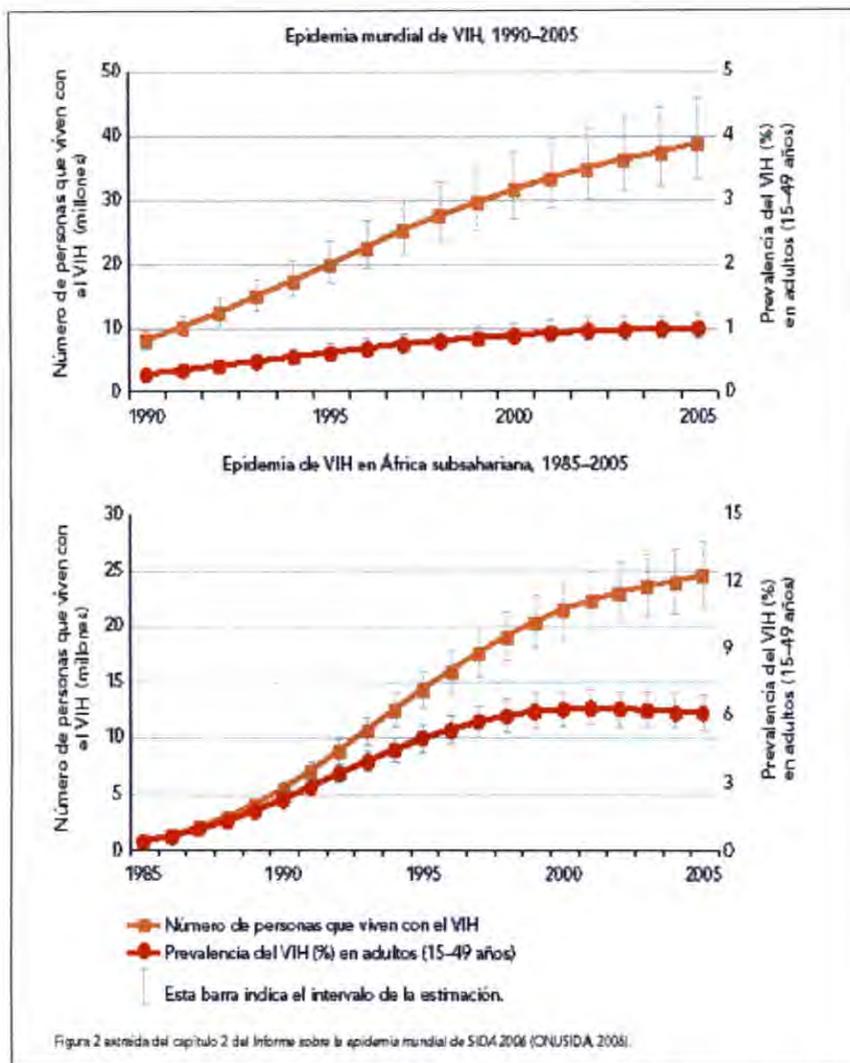


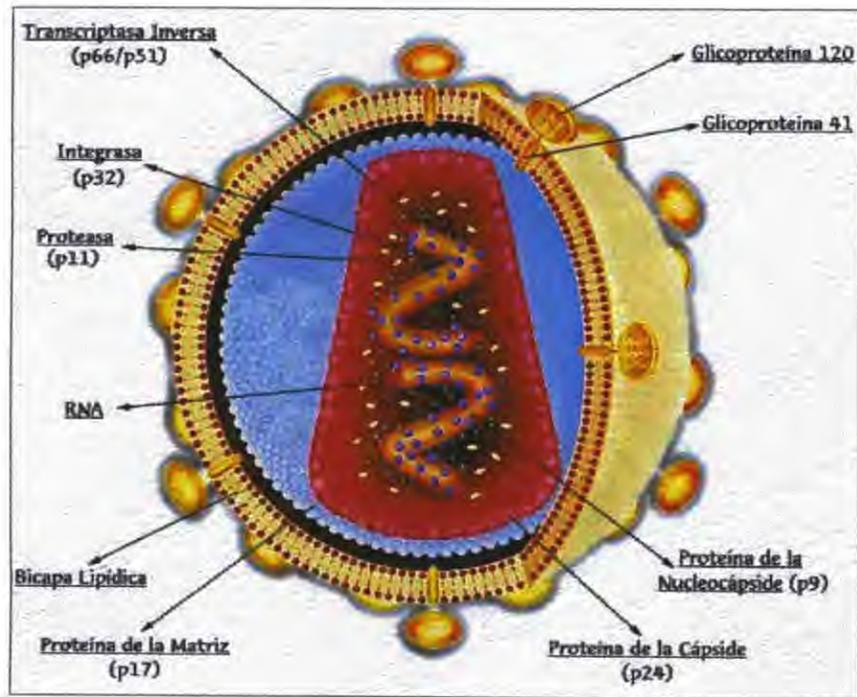
Figura 1. Número estimado de personas que viven con el VIH y prevalencia del VIH-1 en adultos, mundialmente y en África subshariana, 1985-2005

2. VIH-1: DESCUBRIMIENTO, CARACTERÍSTICAS MOLECULARES Y BIOLÓGICAS

La estructura y genes del VIH-1 fueron descubiertos en 1983 con los trabajos iniciales desarrollados por Robert Gallo y Luc Montagnier. Actualmente, se acepta que el grupo de Montagnier fue el primero en identificar el virus, pero el grupo de Gallo contribuyó significativamente a demostrar que el VIH-1 es el agente causal del SIDA. Además, el trabajo de Montagnier se basó en una técnica previamente desarrollada por Gallo para el cultivo de linfocitos T en el laboratorio. Esta técnica se convirtió en la base para los métodos de detección de VIH-1 en muestras sanguíneas. Sin embargo, los dos científicos continuaron sus disputas hasta 1985, cuando finalmente concuerdan en compartir el crédito, y dividir los regalías de los ensayos entre el estado francés (patrocinador del Instituto Pasteur) y el estado norteamericano (patrocinador de Gallo).

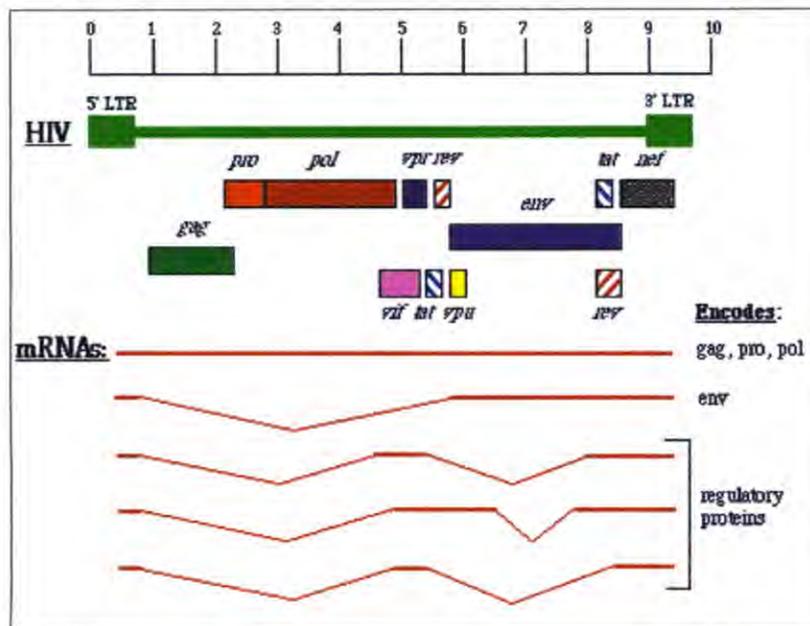
El VIH-1 pertenece a la familia de los lentivirus, subfamilia Lentivirinae con capacidad de producir infecciones latentes en las células a largo plazo, efectos citopáticos a corto plazo y enfermedades lentamente progresivas y mortales. El virión es una estructura con forma esférica de aproximadamente 100 nm de diámetro. Una partícula del VIH-1 está formada por dos cadenas idénticas de ácido ribonucleico genómico (ARN), cada una de 9.2 kilobases (kb) de longitud, empaquetadas dentro de un centro de proteínas virales (core) y rodeadas de una envoltura formada por una bicapa fosfolipídica derivada de la membrana celular del hospedero, pero que incluye también proteínas de membrana codificadas por el virus (Figura 2). El provirus del genoma del HIV-1 contiene tres principales proteínas asociadas a genes del virión (*gag*, *pol* y *env*), con secuencias repetitivas terminales largas (LTR, del inglés *long terminal repeat*) en cada

extremo del genoma y que regulan la integración viral en el genoma del hospedero. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales del “core” e inicialmente expresa un precursor proteico de 55kDa que posteriormente, por acción de las proteasa viral, se convierte en varios polipéptidos pequeños. El gen *pol* codifica proteínas con actividad enzimática de la proteasa (PR), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (IN) necesarias para la replicación viral. El producto del gen *env* codifica glicoproteínas de envoltura que son necesarias para la infección de las células. El *env* es un complejo compuesto de una subunidad transmembrana (gp41) y una subunidad externa asociada no covalentemente (gp120). Estas subunidades se generan mediante escisión proteolítica de un precursor (gp160). El complejo *env* media un proceso de múltiples pasos de fusión entre la envoltura del virión y la membrana de la célula diana. Existen, por lo menos, otros 7 genes más en el genoma que codifican proteínas accesorias entre los que podemos mencionar *nef*, *vpr*, *vif*, *vpu* y *tev* (Wang et al., 2000) (Figura 3).



Descargado de [www.uc.cl/.../ zoom_estructura.html](http://www.uc.cl/.../zoom_estructura.html)

Figura 2. Estructura del VIH-1



Descargado de www-micro.msb.le.ac.uk/3035/3035Replication.html

Figura 3. Estructura del genoma del VIH-1

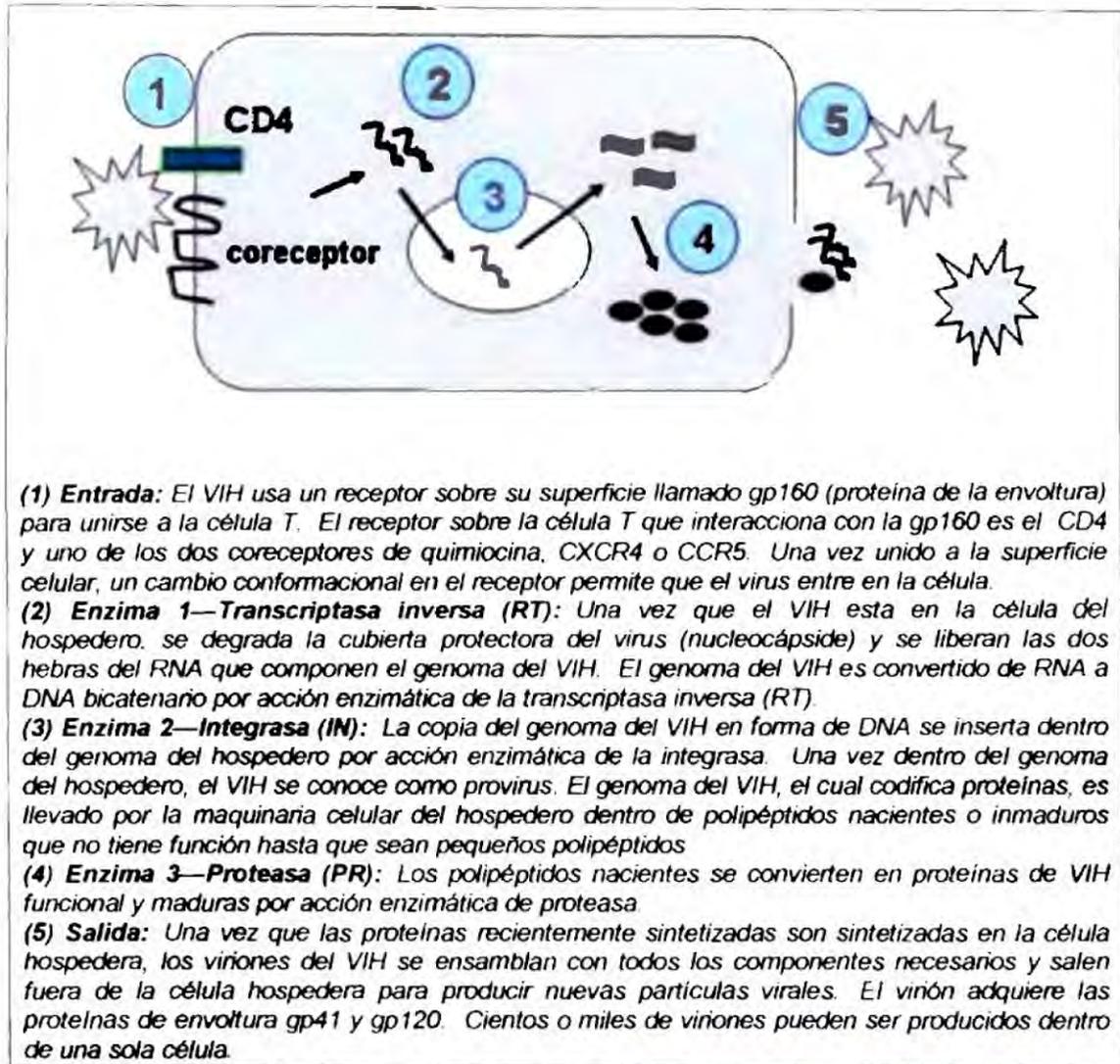
3. TRANSMISIÓN Y CICLO VITAL DEL VIH-1:

Las partículas virales que inician la infección suelen encontrarse en la sangre, semen u otros líquidos corporales de un individuo. Dichas partículas pueden ser introducidas en otro individuo por:

- Contacto sexual íntimo: Es el modo de transmisión más frecuente (homosexual o heterosexual);
- La inoculación de un receptor con sangre o hemoderivado infectado: Es la segunda vía más frecuente (agujas compartidas, donantes);
- Transmisión vertical de madre a hijo (SIDA pediátrico).

El ciclo reproductor viral comienza cuando las subunidades gp120 del virus de VIH-1 se unen a las moléculas CD4+ (Figura 4), lo que induce a un cambio de configuración que promueve la unión secundaria de las subunidades gp120 al coreceptor para las quimiocinas (se han identificado más de 7 receptores de quimiocinas). La unión a este coreceptor induce a un cambio conformacional en gp41 que expone una región hidrófoba, denominada péptido de fusión, que se inserta en la membrana celular y promueve la fusión con la membrana viral. Una vez que el virión penetra en la célula, se activan las enzimas complejo nucleoproteico, el "core" del virus se desestructura y el genoma ARN se transcribe a la forma de ADN bicatenario por acción de la transcriptasa inversa viral. El ADN viral penetra en el núcleo al igual que la integrasa viral y cataliza la integración de ADN viral al genoma de la célula hospedera. La forma integrada del ADN del virus se denomina provirus y puede permanecer transcripcionalmente inactivo durante meses o años, con una producción escasa o nula de nuevas proteínas virales o viriones y de este

modo la infección por el VIH-1 de una célula individual puede ser latente. La transcripción de los genes del ADN proviral integrado está regulada por las LTR (que contiene secuencias señal de poliadenilación, la secuencia TATA y sitios de unión para dos factores de transcripción de la célula hospedera, NFkB y SP-1). Las citoquinas y otros estímulos fisiológicos sobre los linfocitos y los macrófagos pueden potenciar la transcripción de los genes virales. La producción de virus maduros se asocia a la lisis celular, lo cual es un importante mecanismo del efecto citopático del VIH-1. Los virus, luego de ensamblajes y empaquetamientos, son liberados de la célula hospedera mediante un proceso de gemación de la membrana plasmática. Las partículas del VIH-1 libres liberadas de una célula infectada pueden unirse a una célula no infectada y continuar con el ciclo vital del virus.



Descargado de www.sciencecases.org/aids/aids2.asp

Figura 4. Ciclo de vida del VIH-1 mediante una representación del virus entrando a la célula diana.

4. RESPUESTAS INMUNITARIAS:

a) Respuestas inmunes del hospedero (Hogan et al., 2001):

- Respuesta mediada por células:

- o Respuesta de las células T citotóxicas VIH-específicas (CTLs, del inglés *Cytotoxic T Lymphocytes*)

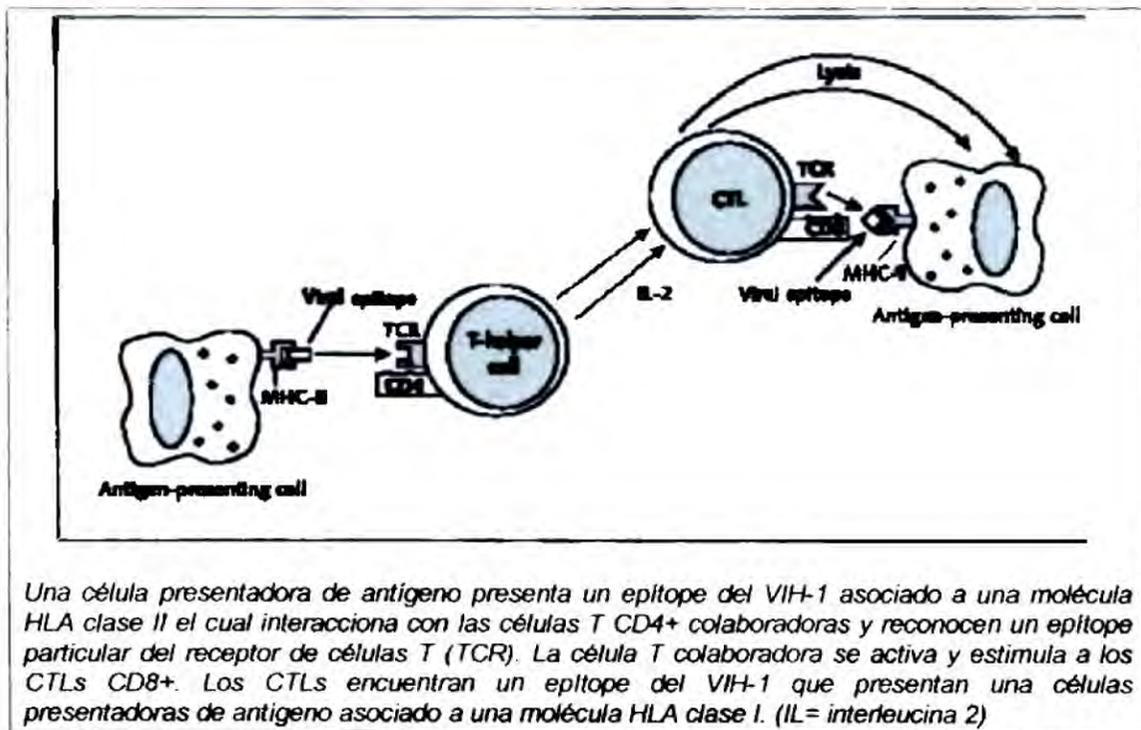
Las CTLs son importantes en la infección por el VIH-1. La respuesta inmune adaptativa inicial se caracteriza por una expansión masiva de los linfocitos T CD8+ VIH-específicos los cuales se convierten en el arma efectora de la respuesta celular inmune al recibir ayuda de los linfocitos T CD4+ VIH-específicos. Su función es matar células infectadas por el VIH-1 que presenten péptidos virales asociados con moléculas HLA clase I. Poco más de 10% de las células T CD8+ circulantes pueden ser virus-específicas durante las etapas iniciales de la infección. El control parcial de la infección por el VIH-1 reflejada por reducción de la viremia y transición a la fase de latencia clínica se debe principalmente a la respuesta de los CTLs.

Los CTLs son células T CD8+ especializadas para el control de patógenos intracelulares. Sin embargo, pese a ello el virus continúa replicándose. En la infección primaria el desarrollo de esta respuesta CTLs VIH-específica se ha correlacionado temporalmente con el control de la viremia (bajas concentraciones) y disminución lenta de linfocitos T CD4+. Se ha demostrado en pacientes infectados por el VIH-1 no tratados, una correlación inversa entre la actividad CTLs VIH-específica y la carga viral en todos los estadios de la infección.

T CD4+ activadas, las células T colaboradoras se depletan temprano. Una de las características de las personas con infección crónica por el VIH-1 es la falta de función celular de las células T colaboradoras-específicas.

- **Respuesta de las células T colaboradoras**

Esta respuesta es importante para el mantenimiento de la respuesta de células T CD8+. Las células T CD4+ colaboradoras son antígeno-específicas. Se activan cuando se unen a epítopes virales que reconocen, los cuales son presentados en conexión con las moléculas HLA clase II (Figura 5). Una vez activados secretan IL-2 y otras citoquinas de la respuesta CTLs y la respuesta humoral. Debido a que el VIH-1 selecciona a las células T CD4+ activadas, las células T colaboradoras se depletan temprano. Una de las características de las personas con infección crónica por el VIH-1 es la falta de función celular de las células T colaboradoras-específicas.



Review-Host Determinants in HIV Infection and Disease, Part 1

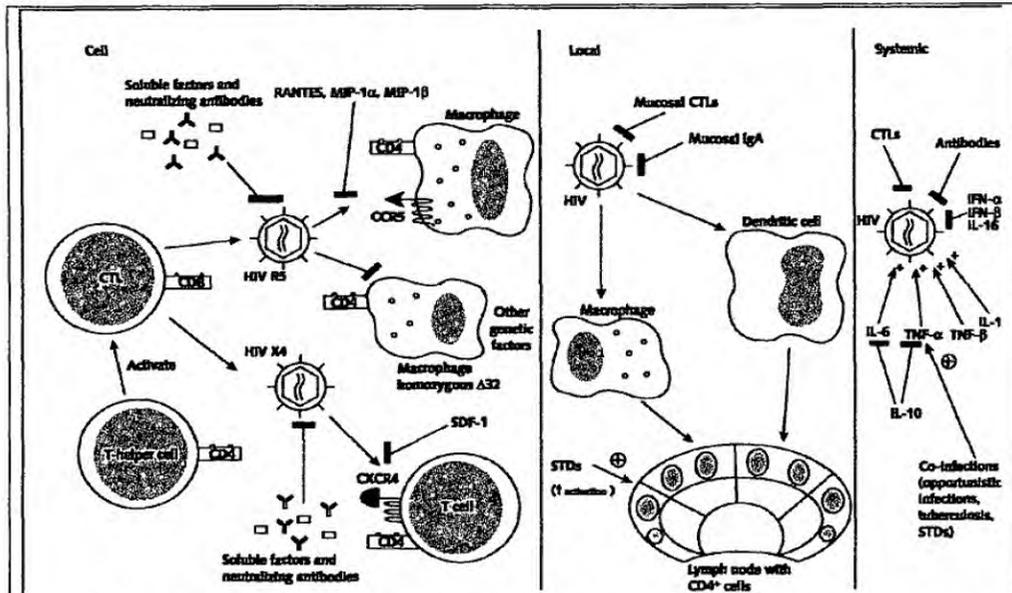
Figura 5. Interacción entre CTLs, células T colaboradoras y células presentadoras de antígeno

- **Respuesta inmune humoral:**

Hasta ahora no se establecido bien el papel de la respuesta inmune humoral en la disminución de la progresión al SIDA o en la prevención de la infección. Además, se sugiere que dicha respuesta no es del todo protectora. Sin embargo, la combinación de la inmunidad mediada por células y la humoral es crucial en la respuesta inmune.

Los anticuerpos que neutralizan el virus *in vitro* han sido encontrados en muchas personas infectadas por el VIH, pero los títulos no se han correlacionado con protección de progresión a la enfermedad y, por tanto, tampoco su papel está del todo claro.

Los anticuerpos contra el VIH-1 empiezan a aparecer entre dos a tres semanas después de la infección. La mayoría de ellos están dirigidos a proteínas desintegradas de la envoltura (gp120 y gp41) del virus; sin embargo, estos anticuerpos no son neutralizados ya que son llevados dentro de la estructura interna del virus o son enmascarados por glicosilaciones. Otros anticuerpos detectados son los dirigidos contra p24, la transcriptasa inversa y los productos de *gag* y *pol*. Los anticuerpos neutralizantes con actividad restringida usualmente se forman una vez que la infección está bien establecida. Los anticuerpos neutralizantes de acción amplia no son producidos sino hasta la infección tardía. Aparte del efecto neutralizador, los anticuerpos tienen otras funciones; por ejemplo, en presencia del complemento pueden lisar viriones. La citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (DAC, del inglés *Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity*), es un método que elimina células infectadas por el virus y se ha correlacionado con el control de la viremia en la infección aguda. Aún hay muchas polémicas en cuanto a los hallazgos de anticuerpos en la mucosa, en especial acerca de la Ig A VIH-específica y, por tanto, su rol no está del todo claro.



A nivel celular las CTLs CD8+ con las T CD4+ colaboradoras lisan las células infectadas por el VIH-1. Factores solubles y anticuerpos neutralizantes inhiben la replicación viral. El VIH-1 infecta las células a través de CD4 y coreceptores CCR5 o CXCR4. Los coreceptores y sus ligandos: RANTES, Proteína Inflamatoria del Macrófago (MIP) y Factor derivado de células estromales (SDF). A nivel local las CTLs s y las Ig A de la mucosa puede inhibir la replicación viral inicial. Infecciones concomitantes activan las células T proporcionando células diana para que el VIH las infecte. A nivel sistémico tales factores inhibidores así como CTLs, anticuerpos, INF (interferón), interleucinas (IL)-16 se encuentran con algunos factores estimulantes como Factor de Necrosis Tumoral (TNF), IL-1, IL-6 y coinfecciones.. La IL-10 inhibe IL-6 y TNF α .

Review Host Determinants in HIV Infection and Disease, Part I

Figura 6. Revisión esquemática de la respuesta del hospedero a nivel celular, local y sistémico

b) Mecanismo de evasión inmune del virus y susceptibilidad al VIH-1

El fracaso de las respuestas inmunes contra el virus del VIH-1 probablemente se deba a muchos factores. Las células T CD4+ necesarias para iniciar las respuestas inmunitarias protectoras son destruidas o inactivadas por el virus y, por consiguiente, las respuestas inmunitarias pueden estar demasiado afectadas como para eliminar el virus. Hay otras propiedades del virus que pueden facilitar la evasión de mecanismos efectores inmunitarios. Este escape viral está muy implicado en la patogénesis del VIH-1 por la capacidad del virus de seguir replicándose a pesar de la vigorosa respuesta inmune del hospedero (Hogan et al., 2001).

Entre los mecanismos de evasión inmunitaria del VIH-1 tenemos la variación antigénica la cual es ocasionada por la tasa de mutación extremadamente elevada del VIH-1 por transcripción inversa con tendencia al error. De esta forma, el VIH puede eludir la detección por anticuerpos o por células T generadas en respuesta a las proteínas virales antes de la mutación. Se ha calculado que en una persona infectada, todas las mutaciones puntuales posibles del genoma viral se producen cada día y que ocurren hasta el 1% de todas las mutaciones dobles posibles. Las células infectadas por el VIH-1 también pueden evadirse de las CTLs mediante la regulación negativa de la expresión de las moléculas MHC clase I y la inhibición preferencial de la inmunidad celular en la infección del VIH-1. La permanencia del VIH-1 en sitios inmunes privilegiados (el SNC, ojos y testículos) evita la exposición del virus con las células inmunes efectoras. Las células dendríticas foliculares de los nódulos linfáticos pueden atrapar el VIH-1 y el mismo permanece viable por un extenso periodo de tiempo. La infección de las células T de memoria también resultan en un reservorio latente del VIH-1 ya que esas células en

reposo no expresan productos virales y, además, no son reconocidas por células efectoras inmunes.

La atenuación viral de una cepa de VIH-1 (por ejemplo, delección en el gen *nef*), la existencia de subtipos virales [M, del inglés MAJOR (A-J), O del inglés OUTLIER y N, siendo el subtipo B el más común en Estados Unidos y Europa] y el Tropismo viral [M-Tropismo (R5) y T-Tropismo (X4)] son otros mecanismos que tienen que ver con diferentes grados de virulencia y transmisibilidad. El tropismo viral lo describiremos más adelante.

c) Intervención de HLA, quimiocinas, citoquinas y otros factores solubles en la respuesta inmune

- HLA:

Los antígenos leucocitarios humanos (HLA) son un grupo de genes del MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) que ayudan al sistema inmune a diferenciar lo propio de lo extraño y juegan un rol importante en la activación del sistema inmune en respuesta a algunas sustancias. Los CTLs restringidos al El MHC son parte de la respuesta inmune celular a la persistente infección humana del VIH-1 (Carmichael et al., 1993). Varios estudios han sugerido que alelos específicos de los *loci* HLA están asociados con diferentes índices de progresión y variación en la susceptibilidad a la infección. Alelos B35 y Cw4 se han asociado con progresión acelerada a la infección. Heterocigotos en todos los *loci* HLA clase I parecen ser protectores. También se ha demostrado una asociación entre alelos HLA B-5701 clase I y los no progresores al SIDA. Un estudio de haplotipos B27 y B57 , B14 y C8 han sido asociados con no progresores de largo plazo (Hogan et al., 2001). Los genes clase I (HLA I) incluyen

HLA-A,-B y-C y están involucrados en actividad mediada por células T citotóxicas en respuesta inmune primaria contra células infectadas por el VIH-1. Los genes de la clase II (HLA-II) están compuestos por genes HLA-DR, DP y DQ y juegan un rol en la respuesta inmunitaria mediada por células T colaboradoras en donde se activa la respuesta inmune contra infección extracelular (Marmor et al., 2006).

- **Quimiocinas:**

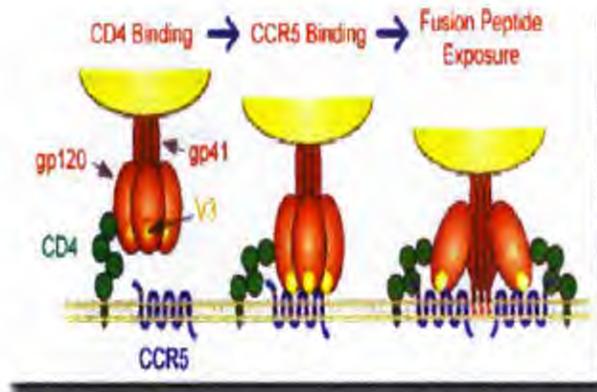
Son pequeños péptidos secretados por células. Sirven para regular la quimiotaxis (movimiento de células), adhesión y actividad (no proliferación) de la respuesta inmune de células y tejidos. Son citoquinas quimioatrayentes secretadas al sitio de la infección y atacan a otras células vía receptor de quimiocinas presente en la superficie de la célula diana. Se han identificado por lo menos 18 receptores de quimiocinas y cada uno puede aceptar más de una quimiocina y con frecuencia aceptan varias. La característica de unión de los receptores de quimiocinas esta determinada por un gen específico que codifica para ese receptor (Marmor et al., 2006).

Desde mediados de 1980 se conocía la necesaria presencia del CD4 sobre la superficie celular y que el CD8 secretaba una sustancia que interfería con la capacidad del VIH-1 a infectar las células. Sin embargo, este concepto no era suficiente para explicar la entrada del VIH-1 a la célula. En 1995, Cocchi y colaboradores identificaron tres sustancias como RANTES (del inglés, *Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*), y MIP-1 α (Proteína inflamatoria del macrófago, del inglés *Macrophage Inflammatory Protein-*) y el MIP-1 β con la hipótesis de que esas sustancias se unían a un receptor que el virus requería para entrar. En 1996 fue identificado el CCR5 (originalmente llamado CKR5) como coreceptor de quimiocina también necesario para

que el VIH-1 entra a las células T CD4 (Figura 7) y que el mismo está presente sobre los macrófagos, monocitos y algunas células T. Los virus con M-tropismo (macrófago-tropismo) usan ese receptor como coreceptor para entrar a esa célula. La interacción entre la proteína de envoltura del virus gp120 y el CD4 induce un cambio conformacional que permite la interacción entre el virus y ese coreceptor y, finalmente, se da la fusión del virus a la membrana de la célula huésped. Además de este coreceptor, existen también otros como el CCR2 o CCR3 para la entrada del VIH-1 en los macrófagos. En 1996, Feng y asociados aislaron el CXCR4 (originalmente llamada fusina), un receptor de quimiocina localizada sobre la superficie de las células T. Los virus con T-tropismo lo usan como un coreceptor con el CD4 para entrar en las células T. Sin embargo, hasta la fecha se han descubierto variantes del virus con tropismo dual, es decir, que pueden usar CCR5 o CXCR4 como coreceptor para la entrada. Los ligandos naturales para esos receptores pueden interferir en la entrada del VIH a la célula diana. Los ligandos para el CCR5 son: RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (miembros de la familia de las β quimiocinas). Los ligandos del CXCR4 son: Factor derivado del estroma celular (SDF-1, del inglés *Stromal cell-Derived Factor-1*). Los ligandos para el CCR2 son: Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1, del inglés *Monocyte Chemotactic Protein-1*), el MCP-5, el VVR3 (MPC3, MCP4 y eotaxina 1 y 2). En 1996 (Hogan et al., 2001) fue identificada una mutación en CCR5 denominada Delta 32 la cual consistía en una pérdida de 32 pares de bases. Esto daba como resultado una proteína CCR5 acortada. En Estados Unidos se ha encontrado una frecuencia de la mutación de 11% en personas de raza blanca y de 1.7% en personas de raza negra. Las personas que son homocigotas a esa delección tienen una susceptibilidad disminuida a la infección por el VIH-1 (existen pocas personas infectadas

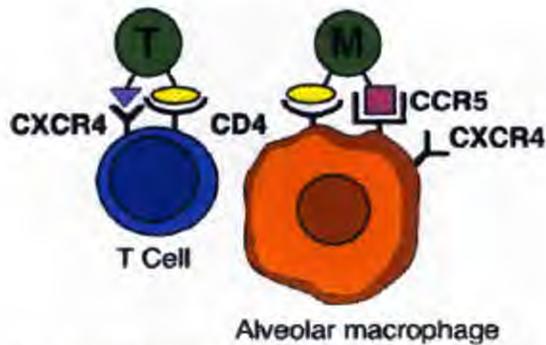
con esta delección pues han sido infectados por cepas T-trópicas). Los heterocigotos son menos susceptibles a la infección.

Hay una gran variedad de infecciones pulmonares encontradas en los individuos infectados por el VIH-1 las cuales son indicativas de que muchos componentes de defensa del hospedero están fallando. Además de la disminución de T CD4+, la infección resulta en un déficit funcional de T CD4+, T CD8+ y células Nk. Los macrófagos alveolares son un reservorio primario del VIH-1 en el pulmón Beck et al., (2005) (Figura 8).



Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine

Figura 7. Representación del VIH-1 entrando en la célula diana con la participación del CCR5.



Las células T infectadas con cepas T-tropismo usan el CD4 como receptor principal y el CXCR4 como coreceptor. Los macrófagos alveolares infectados con cepas M-tropismo usan CCR5 como coreceptor, aunque algunos macrófagos alveolares también expresan CXCR4

Proceedings of the American Thoracic Society vol 2 2005

Figura 8. Tropismo de cepas del VIH-1 con las células pulmonares

- **Citoquinas:**

Son pequeñas proteínas secretadas por diversos de tipos de células que regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune y permiten comunicación entre las células y su papel aún no está totalmente claro (Marmor et al., 2006). La IL-2 (interleucina-2) y el INF γ (interferón gamma) son citoquinas típicamente producidas por las células T colaboradoras (Th-1) y promueven la respuesta inmune mediada por CTLs. Es por ello que el INF γ es un buen marcador de activación inmune celular y el tratamiento refleja una disminución reflejada en su producción (Murr et al., 2002).

Los virus y productos virales dan como resultado una producción elevada de muchas citoquinas incluyendo moléculas pro inflamatorias tales como TNF α (Factor de Necrosis Tumoral alfa), TNF β (Factor de Necrosis Tumoral beta), IL-6 (interleucina 6) e IL-1 (interleucina 1). El TNF α es la citoquina más potente inducida por el VIH-1 que activa el factor de transcripción celular (NF-kB), induciendo la expresión del VIH-1. Hay otras citoquinas que juegan un rol supresor en la replicación viral como el INF β (Interferón beta), el INF α (Interferón alfa) y la IL-16 (interleucina-16). Otras citoquinas tales como la IL-2 (Interleucina-2), IL-4 (Interleucina-4), IL-10 (Interleucina-10) y el TGF β (Factor Transformante de Crecimiento beta) y el INF γ , han sido sugeridos como inductores o supresores de la expresión del VIH-1 dependiendo de condiciones experimentales que se hayan dado. Hay importantes interacciones entre las citoquinas; por ejemplo, la IL-10 inhibe replicación del VIH-1 (bloqueando la secreción del TNF α y la IL-6) y la IL-12 es una citoquina que favorece el desarrollo de Th1 e inhibe Th2. Los marcadores solubles de activación inmune (como veremos más adelante) son el producto de la actividad de las

citoquinas y representan cambios inmunológicos a través del cuerpo. Aunque las coinfecciones pueden aumentar la concentración de estos marcadores, tales infecciones se utilizan como pronóstico pues pueden incrementar la activación inmune (Fahey et al., 1998)

- **Otros factores locales:**

El papel normal de las células dendríticas es capturar antígenos en tejidos periféricos y transportarlos hacia los nódulos linfáticos donde ellos atacan y activan a las células T y estimulan la inmunidad primaria y secundaria. Sin embargo, el VIH-1 explota la función normal de esas células ya al llegar a alcanzar a los nódulos linfáticos infectan numerosas células T activadas que han sido reclutadas por las células dendríticas.

La presencia de enfermedades sexualmente transmitidas concomitantes con el VIH-1 se han asociado con incremento en el riesgo a la infección y la progresión aumentada. Las inflamaciones, úlceras o rupturas de barreras producen inflamación sistémica no específica y la liberación de citoquinas que producen activación inmune sistémica. La falta de circuncisión y presencia de vaginosis bacteriana y una flora vaginal alterada se han asociado con incremento en la susceptibilidad por el VIH-1. Otros factores locales tales como algunos métodos anticonceptivos, menstruación y carga del VIH-1 en las secreciones genitales, probablemente afecta la susceptibilidad a la infección.

5. EVOLUCION DE LA ENFERMEDAD

Los estadios clínicos de la enfermedad están relacionados con la diseminación progresiva del VIH-1 desde el sitio inicial de la infección a los tejidos linfoides de todo el organismo. Los estímulos de citoquinas inducidas por otros microorganismos también potencian la producción del virus y la progresión al SIDA.

- Fase aguda de la infección:

Durante la infección primaria se desarrollan altos índices de viremia de días a semanas frecuentemente acompañados por Síndrome Retroviral Agudo caracterizado por síntomas no específicos (fatiga, fiebre, faringitis, rash, linfadenopatías y con frecuencia meningitis aséptica). La vigorosa activación inmune sistémica proporciona un gran aporte de linfocitos T CD4+ activados que apoyan la replicación viral. La viremia alcanza su pico y los linfocitos T CD4+ agudamente disminuyen. Dentro de semanas a meses (estimado en 120 días en un estudio de cohorte), el conteo de CD4+ vuelve a estar cercano a lo normal. Se ha demostrado preservación de las células T colaboradoras en los pacientes con tratamiento en la infección aguda y en algunos casos se ha asociado con la preservación de la respuesta inmune CTLs VIH-específicas. La presencia de CTLs se detecta en infección temprana del VIH-1 y ha sido bien correlacionada con la regulación de la viremia luego del "Síndrome viral agudo". Durante esta fase, las CTLs VIH-específicas están asociadas con una disminución de la viremia (Hogan et al., 2001).

La disminución lenta de los linfocitos T CD4+ como característica de la infección por el VIH-1 ha cambiado a la luz de observaciones recientes. Se ha observado un retiro

rápido y extenso de las células T de memoria en tejidos finos mucosos en el plazo de las primeras tres semanas de la infección; este comportamiento inicial del sistema inmune, al parecer la característica que se distingue la patogenia del HIV-1 y su grado fija el curso total de la infección que sobreviene.

Las células T CD4+ se requieren para la apropiada función de las células T CD8+ y la producción de anticuerpos neutralizantes por las células B. Hay diversos mecanismos propuestos (Hel et al., 2006), para explicar la pérdida de las células T CD4+ (Figura 9) e incluyen los siguientes:

- Muerte celular inducida por activación (AICD, del inglés *Activation-Induced Cell Death*) como resultado de activación general o específica.
- Lisis directa o fusión de membrana mediada por HIV *env* expresado sobre la superficie de las células infectadas.
- Remoción por el sistema inmune a través de varios mecanismos tales CTLs o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.
- Apoptosis mediada por Fas-FasL (inducida, por ejemplo por proteínas Env gp120).
- Apoptosis por vía INF α -TRAIL-DR5 (inducida por viriones o HIV infecciosos o no infecciosos)

Además de estos mecanismos, existen datos recientes que sugieren que las células T CD4+ son depletadas por varios mecanismos concurrentes, y que la importancia relativa de esos mecanismos depende del ambiente del tejido en particular y la fase de la infección (Hel et al., 2006).

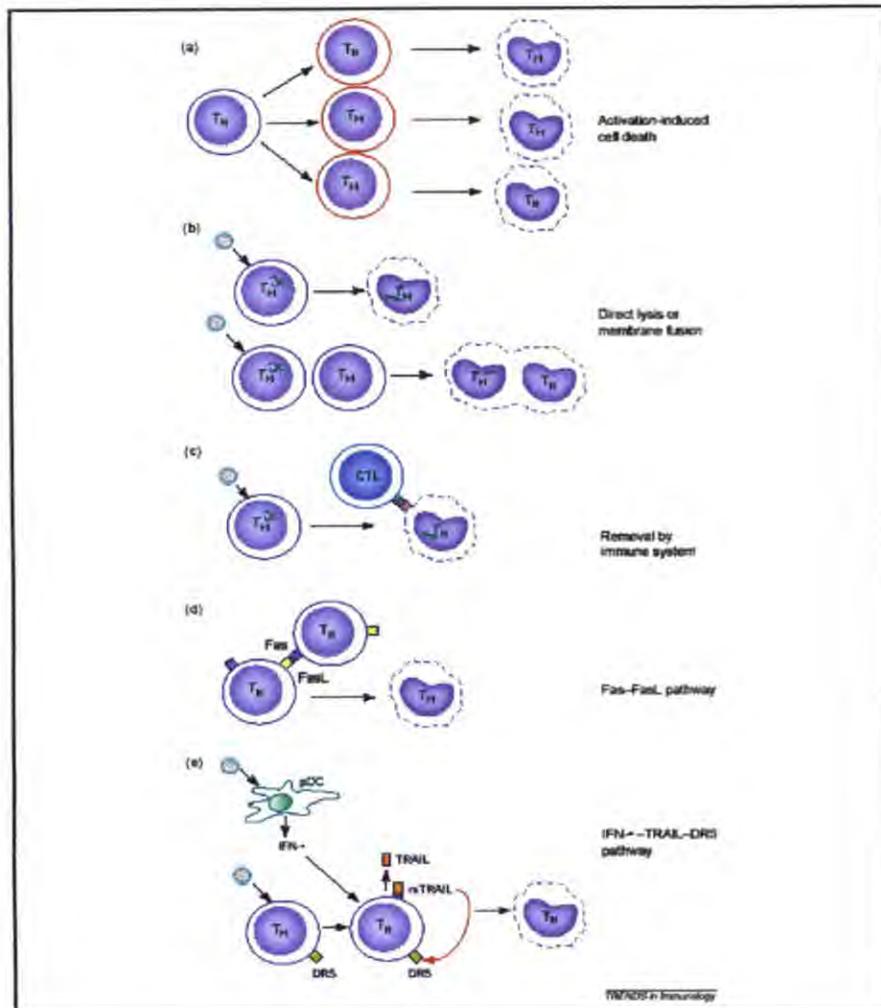


Figura 9. Mecanismo de depleción de células T CD4 colaboradoras.

- **Fase de latencia clínica:**

Durante este periodo de la enfermedad, el sistema inmunitario permanece competente y es capaz de controlar la mayoría de las infecciones ocasionadas por otros microorganismos. Las manifestaciones clínicas son escasas o nulas. Se producen bajas cantidades de virus y la mayoría de las células T de la sangre periférica no alberga el virus. Sin embargo, el número de linfocitos T CD4+ disminuye constantemente. Mas del 90% de las células T del organismo se encuentran normalmente en los tejidos linfoides, y es por ello que se producen ciclos continuos de infección y destrucción estando asintomáticos los pacientes. Se ha calculado que el VIH-1 destruye de 1 a 2×10^9 células T CD4+ diariamente. Al principio es posible que el organismo sintetice nuevas células T CD4+ y sustituya las destruidas casi a la misma velocidad de destrucción, pero con el tiempo la destrucción continua o la producción deteriorada ocasiona la disminución de linfocitos T CD4+ en sangre periférica.

- **Fase crónica de la infección:**

Las respuestas inmunitarias a otras infecciones pueden estimular la producción del VIH-1 y acelera la destrucción en los tejidos linfoides. La citoquinas elaboradas por el sistema inmunitario innato en respuesta a las infecciones microbianas son especialmente eficaces estimulando la producción del VIH-1. Es por ello que a medida que el sistema inmunitario intenta erradicar otros microorganismos, acelera su propia destrucción por el VIH-1.

- **Fase final (SIDA):**

La destrucción de las T CD4+ causa una profunda inmunosupresión que clínicamente se conoce como SIDA. La destrucción del tejido linfóide periférico es básicamente total y el recuento de T CD4+ está por debajo de 200 células /ul. La viremia puede ascender de manera espectacular dada la falta de control. La infección por el VIH-1 compromete fuertemente el sistema inmune y es por ello que los pacientes con SIDA sufren infecciones oportunistas, neoplasias, caquexia, insuficiencia renal y degeneración del sistema nervioso central (SNC). Las células T CD4+ colaboradoras son esenciales para la respuesta inmunitaria tanto celular como humoral y por esto su deficiencia incide en la vulnerabilidad a otras infecciones.

El curso de la infección por el VIH-1 varía ampliamente entre individuos (Hogan et al., 2001). Se pueden distinguir, al menos, cuatro perfiles en las personas infectadas por el VIH-1 y que están relacionados con la progresión a la enfermedad (Pantaleo & Fauci 1996 En Neves et al., 2000):

- **Progresores típicos:** La mayoría de ellos (70-80%) progresan a SIDA en 5 a 10 años con pérdida progresiva de funciones inmunes y de T CD4+ y persistente replicación viral.
- **Sobrevida de largo plazo:** Es un pequeño porcentaje de algunos individuos que progresan dentro de un periodo similar a los progresores típicos, pero los parámetros clínicos, inmunológicos y virológicos permanecen estables por un periodo más largo de tiempo.
- **Progresores rápidos:** Un significativo porcentaje de individuos (10-15%) rápidamente progresa al SIDA y mueren dentro de los primeros 2 a 3 años luego

de la seroconversión. Las respuestas linfoproliferativas de las células T CD4+ HIV-específicas no existen en la mayoría de individuos y se ha observado disminución de las respuestas CTLs en pacientes con progresión rápida de la enfermedad

- **No progresores de largo plazo:** Un pequeño porcentaje (menos del 5%) no experimenta pérdidas típicas de T CD4+ dentro de un periodo largo de tiempo. Tienen bajas cantidades de virus y preservación de la arquitectura de tejidos linfoides y funciones inmunes. Hogan et al., (2001) basados en una revisión de publicaciones de 1988 a 2000, sostienen que en una infección por VIH-1 no tratada, los pacientes pueden permanecer asintomáticos y tener conteos normales de T CD4+ y carga viral baja o indetectable hasta por más de una década. En estos casos las respuestas linfoproliferativas de las células T CD4+ HIV-específicas son frecuentemente detectadas.

La progresión al SIDA en individuos infectados por el VIH-1 está determinada por una compleja serie de interacciones entre el hospedero y el virus, presentando los niños una considerable variedad de índices en el desarrollo de la enfermedad (Ganeshan et al., 1997) estudiaron la relación entre la progresión de la enfermedad y la diversidad genética en niños, encontrando secuencias virales con progresión lenta a la enfermedad y una tendencia a “clusters” asociados en diferentes tiempos de muestreo. Ese tipo de progreso en la población viral no fue encontrado en las secuencias virales de niños con progresión rápida, sugiriendo sus estudios que la dinámica evolucionaria que exhiben las poblaciones virales de las cuasiespecies del VIH-1 son compatibles con el sistema “darwiniano” de selección natural. Existen diversas hipótesis o modelos que se enfocan

en variantes virulentas, diversidad antigénica viral, inmunocompetencia del hospedero, carga viral y disponibilidad de la célula diana. En ese mismo año, Liu et al. evaluaron las propiedades virológicas y respuestas del hospedero en dos hombres infectados simultáneamente con el mismo patrón sexual. Uno de ellos progresó al SIDA en menos de 2 años y el otro permaneció asintomático hasta 3 años después de la infección. En el estudio evidenciaron distintas respuestas inmunes celulares y anticuerpos neutralizantes. El progresor lento exhibió generalmente una amplia y fuerte respuesta con excepción de la respuesta de CTLs en la infección temprana. En ambos pacientes encontraron poblaciones de virus homogéneas y virtualmente idénticas en la primera muestra obtenida; sin embargo, una segunda población no relacionada con el VIH-1 fue encontrada en el progresor rápido. La población viral en el progresor lento se diversificó rápidamente, mientras que ambas poblaciones virales en el progresor rápido involucraron un índice mucho menor. Además, el carácter de cambios mutacionales de esas diversidades aparentaban ser distintas.

Lo cierto es que los mecanismos que favorecen uno u otro tipo de progresión aún no está del todo claro. Ellos incluyen en general, el perfil genético del hospedero, respuestas inmunes (repertorio en uso de células T o producción y regulación de quimiocinas o citoquinas), perfil genético y biológico del virus. Altas concentraciones de quimiocinas que usan el CCR5 han sido asociados con progresión lenta de la enfermedad, pero al respecto diversos estudios presentan resultados discordantes.

Además de estos perfiles, es importante mencionar que existen algunos grupos que están en riesgo de la infección por su exposición al VIH-1, pero que no llegan a infectarse (personas que tienen sexo sin protección en relaciones de alto riesgo, trabajadoras del

comercio sexual, usuarios de drogas intravenosas, trabajadores de la salud accidentalmente inoculados con sangre infectada e infantes hijos de madres seropositivas). El hallazgo de respuestas CTLs VIH-específicas en estos individuos sugiere un posible rol de las CTLs en prevenir el establecimiento de la infección. Igualmente varios estudios han presentado en ellos actividad de las células T CD4+ colaboradoras VIH-específicas (Hogan et al., 2001)

La existencia de los no progresores de largo plazo y personas expuestas sin infectarse sugieren que la inmunidad natural y adaptativa al VIH-1 existen y es el mayor determinante de la clínica.

6. MARCADORES DE LABORATORIO EN EL PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD:

Diversos estudios han establecido la existencia de tres categorías de marcadores pronósticos con relación a la infección por VIH-1. Fahey et al. (1998a), Plaeger et al. (1999) e Immanuel et al. (2005) incluyen, entre ellos, el conteo de células T CD4+, la medición de la carga viral por el VIH-1 y concentración en el plasma de marcadores de activación inmune (más adelante veremos en detalle).

El proceso patológico primario, como ya hemos visto anteriormente, es la depleción progresiva de los linfocitos T CD4+, lo cual a su vez conduce a la disfunción o daño inmune. El conteo de linfocitos T CD4+ ha sido considerado como un marcador subrogado para progresión de la enfermedad, así como para la terapia antiretroviral y profilaxis para patógenos oportunistas.

La citometría es el método estándar para determinar el conteo de CD4+. La metodología está asociada con el uso de anticuerpos monoclonales marcados con varios fluorocromos disponibles en el mercado. De esta forma es posible la cuantificación semi-automatizada, rápida y específica de las poblaciones celulares y el procesamiento y lecturas de varias muestras en poco tiempo. Otras alternativas metodológicas son el Sistema de FACSCount (Becton Dickinson Immunocytometry System), VCS Technology/Coulter Cyto-Spheres (Coulter Corporation), Zymune CD4/CD8 Cell Monitoring Kit (Zynaxis Inc), TRAx CD4 test Kits (T cell Diagnostics), CyFlow® (Partec), DynaBeads® (Dyna), EasyCD4™ (Guava) y PointCARE™ (PointCare Technologies).

Sin embargo, a diferencia de la citometría de flujo, esos sistemas alternativos están restringidos solamente a la cuantificación de los CD4+ y CD8+. Los avances de la citometría de flujo para utilizar sistemas de 2, 3 ó 4 colores permite el análisis de distintas moléculas de superficie en una única célula, permitiendo una evaluación más exacta de subpoblaciones específicas de células. Un panel típico de uso frecuente es aquel compuesto por anticuerpos monoclonales marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés *fluorescein isothiocyanate*) y ficoeritrina (PE/RD1, del inglés *phycoerythrin*). Existen también estándares corrientes que usan múltiples tubos doblemente marcados los cuales pueden incluir CD45/CD14, control isotipo, CD3/CD4 y CD3/CD8 (CDC 1994). Las técnicas con tres colores utilizan la combinación de PerCp (del inglés *peridin chlorophyll protein*), FITC y PE permitiendo la determinación, por ejemplo, de CD3/CD4, CD3/CD8 y el total de CD3 en un solo tubo. En este caso, la región linfocitaria es determinada basado en el histograma Side Scatter (SS) y el Forward Scatter (FS). Mas aún, con el sistema de tinción de 4 colores (Figura 10) el histograma para la región de linfocitos (leucogate) puede ser basado en SS y FITC marcado con CD45 y las subpoblaciones de células T son inmunofenotificadas usando CD3-PC5, CD8-ECD (phycoerythrin-Texas Red) y CD4-RD1 en un solo tubo. En este caso, los linfocitos son fenotificados como células que expresan CD4 de alta intensidad. Hay una alta exactitud en el uso de tres o cuatro colores ya que se emplea poca cantidad de sangre (100µl), lo cual es relevante para SIDA pediátrico.

En la ejecución de metodología por citometría de flujo es importante el establecimiento de controles de calidad (existen varios aspectos que pueden interferir con los análisis) y el cumplimiento de las medidas de Bioseguridad establecidas con el fin de

garantizar la exactitud de los resultados finales. Hay diferencias dependientes de la edad en el conteo de CD4+ y deben ser tomadas en consideración para terapias antiretrovirales y profilácticas en individuos infectados por el VIH-1. Para adultos y adolescentes, los valores normales varían desde 800 a 1050 células/ μ l, con un rango representativo de 2 desviaciones estándares de aproximadamente 500-1400 células/ μ l. El conteo de linfocitos en niños jóvenes (< 5 años de edad) son más altas que en los adultos, variando alrededor de 3,000 células/ μ l a los 6 meses y de 2,500 a 1,500 células/ μ l a los 12 y 24 meses, respectivamente. Los factores como el género, la edad en adultos, categoría de riesgo, estrés fisiológico y psicológico y embarazo tienen mínimos efectos sobre el conteo de CD4+ (Neves et al., 2000)..

Cambios en las subpoblaciones de CD8+ asociados con la inversión progresiva en el índice CD4/CD8 han sido estudiados como marcadores de progresión a la enfermedad en individuos infectados por el VIH-1. El CD8+ se incrementa con el tiempo y no está correlacionado con la reducción de carga viral. Sin embargo, incrementos en la expresión de CD38 y HLA-DR+ en los CD8 de los pacientes infectados por el VIH-1 que progresan al SIDA han sido bien descritos. También se ha documentado una reducción en los CD8+ durante la terapia antiretroviral, incluyendo una reducción en la expresión de CD38 en los CD8+. Sin embargo, cargas virales indetectables no se han asociado con una vuelta al estado normal de la activación de CD8 incluso después de 6 meses de tratamiento, sugiriendo que la replicación viral persiste en tejidos linfoides (Hogan et al., 2001). El conteo de CD8+ no es tan útil como el CD4+ en la mayoría de los casos y generalmente permanece elevado por muchos años luego de la infección. Sin embargo, en inmunodeficiencia avanzada de CD4+, el conteo de CD8+ disminuye indicando un

pobre pronóstico, por lo que las decisiones clínicas actuales no se basan en ese conteo (Kiepiella et al., 2005)

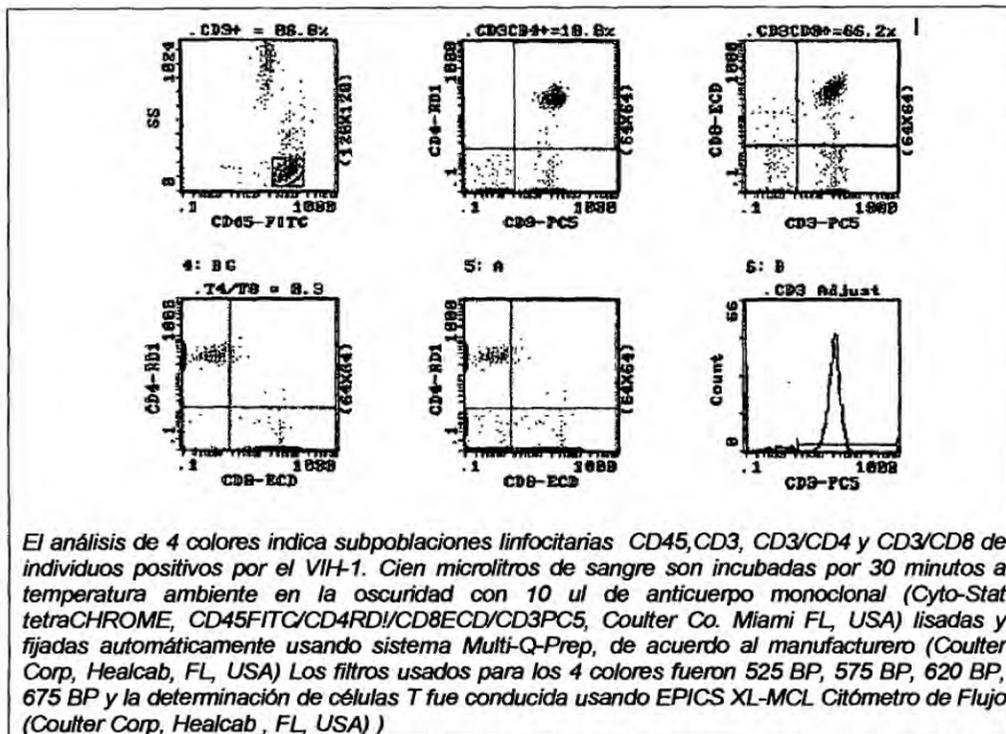
Los linfocitos T CD4⁺ representan el resultado del daño y forman parte de las guías de tratamiento de enfermedades relacionadas con la infección por el VIH-1 (inicio de terapia cuando <200/ μ l) y el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en el año de 1993 incluye esos conteos de los linfocitos T CD4⁺ en su definición de SIDA (< 200/ μ l). Pascale et al. (1997) encontraron un conteo de T CD4⁺ en individuos normales de 1,120 células/ μ l, mientras que en los pacientes con SIDA el conteo fue de 238 células/ μ l. Estos investigadores observaron una gradual inversión en los valores del índice CD4/CD8 asociada a presencia de VIH y progresión al SIDA.

El periodo asintomático de la infección depende de la virulencia de la cepa viral y el estado inmune del paciente. Estudios realizados por Chan et al. (1990) evidenciaron que la carga viral refleja la magnitud de esa replicación viral y es un indicador sensible de respuesta al tratamiento. Ortigao de Sampaio et al. (1999) en sus investigaciones demostraron que el conteo de linfocitos T CD4⁺ es la prueba más confiable para monitorear la progresión de la enfermedad en niños infectados con VIH y que reciben tratamiento anti-retroviral. Más recientemente, Kiepiella et al. (2005) demostraron que conteo de linfocitos T CD4⁺ es un predictor de riesgo para la progresión al SIDA. Altas cantidades de carga viral se correlacionan con conteos bajos de CD4⁺; sin embargo, su pronóstico en cuanto a progresión a SIDA y muerte es independiente del conteo de CD4⁺.

Existen varias tecnologías disponibles para la medición de la carga viral como por ejemplo, Branched DNA (bDNA) que detecta un mínimo de 500 copias/ml, NASBA

(Amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos) y el Cobas Amplico Monitor Test , estos dos últimos con un límite de detección de 50 copias/ml. El r carga viral en individuos no tratados va de 10^2 a 10^7 copias/ml y llega a ser mu incluso indetectable con un tratamiento exitoso.

De acuerdo con la Guía de Atención integral para personas viviendo VIH/SIDA (2002) en nuestro país, los pacientes sin tratamiento con recuentos d entre 250 y 350 células/ μ l, se les debe realizar el recuento de CD4+ con una peric no mayor a los 4 meses (es decir, 3 veces al año) y la carga viral cada 6 meses (d al año). En los pacientes con CD4+ mayor de 350 células/ μ l se les debe h seguimiento del recuento de CD4+ cada 4-6 meses (2 a 3 veces al año) y la carga se recomienda a menos que esté disponible. Con el propósito de evaluar la r clínica, inmunológica y en lo posible virológica en los pacientes con antiretroviral, el monitoreo debe incluir el recuento de CD4+ cada 4 meses (3 año) y carga viral dos meses después de iniciado el tratamiento y posteriormer cuatro meses.



Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 95(3), May/Jun. 2000

Figura 10. Histogramas para 4 colores

Save's et al. (2001) demostraron que tanto el conteo de células T CD4+ como la carga viral en el plasma del ARN del VIH-1 (carga viral) son altos predictores de progresión al SIDA. Sin embargo, señalan que se requiere una combinación con otros marcadores en el plasma con el fin de llenar a cabalidad pues, aunque los linfocitos TCD4+ y la carga viral son altamente predictores de progresión o muerte, no pueden explicar todas las variaciones de la progresión hacia la enfermedad y su valor pronóstico no es el mismo en diferentes estadios de la enfermedad. Kiepiella et al. (2005) apoyan ésta idea sugiriendo en el futuro la incorporación de pruebas que midan estatus de la función inmune e incluso la determinación de factores genéticos del huésped (HLA, CCR5) dentro de la evaluación de cuando iniciar terapia antiretroviral y en que pacientes.

Los marcadores de activación inmune en el plasma son un factor importante en la infección por el VIH-1 y, tal como hemos visto anteriormente, la activación del sistema inmune refleja una disregulación de la respuesta inmune del hospedero a la infección por el VIH-1 y sus secuelas. Esto explica que los productos de esa activación representan cambios inmunológicos en el cuerpo humano (Immanuel et al., 2005). Dentro de los marcadores de activación inmune podemos mencionar algunos como por ejemplo, citoquinas (INF γ , IL-6, INF α endógeno), neopterina, β -2Microglobulina (β -2M), Receptor soluble de la IL-2 (sIL-2R) y receptor II soluble del TNF α (sTNFRII), entre otros.

En los pacientes con la infección por el VIH-1, el INF γ se incrementa. La gp120 del VIH-1 puede ser responsable de esa inducción endógena en esos pacientes y su índice elevado es indicativo de que esa citoquina esta citoquina es bioactiva y, por lo tanto, induce cambios bioquímicos en los macrófagos. En una situación aguda, el INF γ se

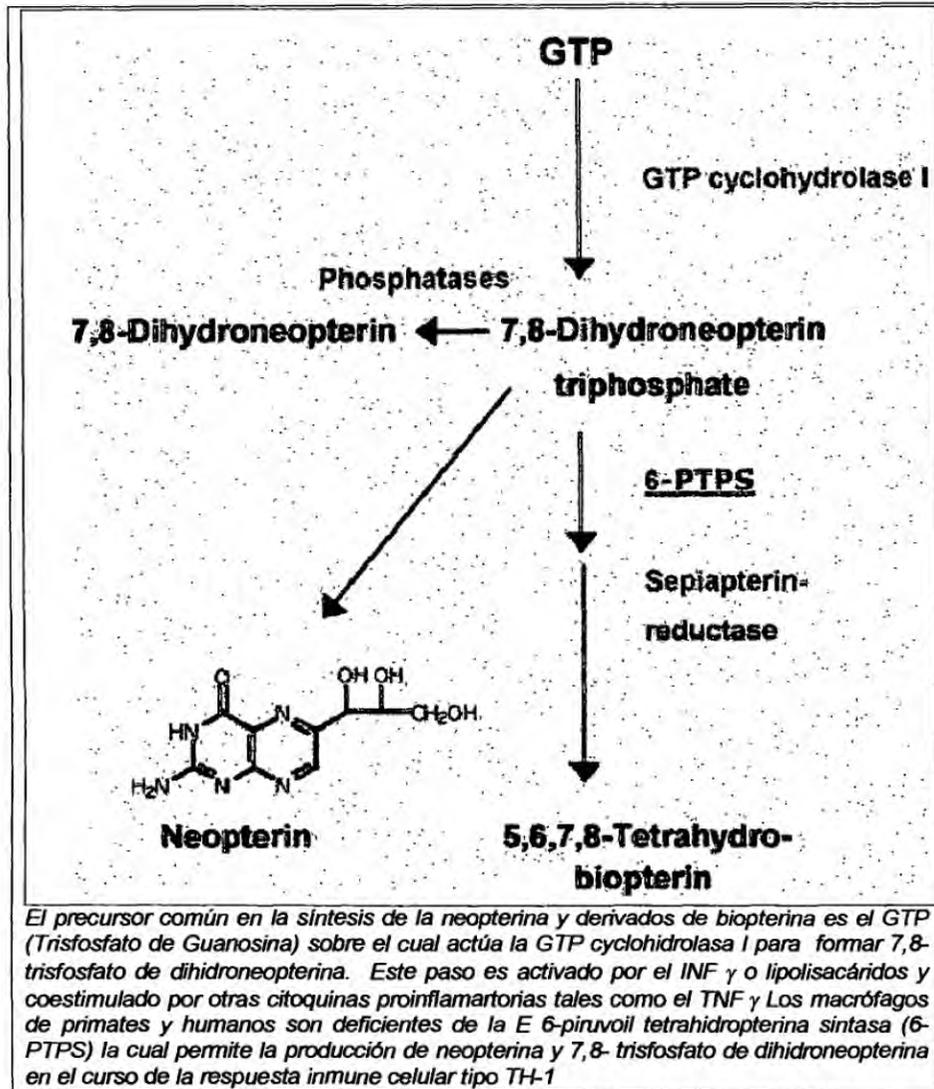
requiere para establecer la respuesta inmune mediada por células (Th1) y altas concentraciones en las infecciones crónicas están asociados con el desarrollo de inmunodeficiencias. El INF γ es el regulador más potente de la respuesta inmune celular vía modulación de la presentación antigénica, así como diferenciación y proliferación de linfocitos, promueven la respuesta inmune mediada por CTLs y la terapia refleja una disminución en su producción (Murr et al., 2002). La activación de citoquinas pro inflamatorias tales como el INF γ y el TNF α son críticos en la patogénesis del VIH-1 (Wirleitner et al., 2005). En ese mismo año, Mildvan et al. encontraron que la IL-6 y el INF α endógeno son buenos predictores tempranos de progresión o riesgo.

La β -2 M por su parte, es una molécula (subunidad del HLA clase I) presente en la superficie de muchas células nucleadas, incluyendo células inmunes. Esta molécula ha sido blanco de muchos estudios; su principal fuente es el linfocito B; su concentración en el suero aumenta en la infección por el VIH-1 durante la activación inmune y destrucción de células linfoides y representa la activación de muchas células inmunes y no de una citoquina. (Chan et al., 1990). Pascale et al. (1997) encontraron que valores arriba de 4 mg/l tiene valor predictivo en el 81 % de los pacientes con SIDA.

Otros marcadores de activación inmune estudiados son el sIL-2R y el sTNFRII; éstos son liberados a partir de linfocitos activados y reflejan activación de células T y actividad inmune en respuesta a la infección por el VIH-1.

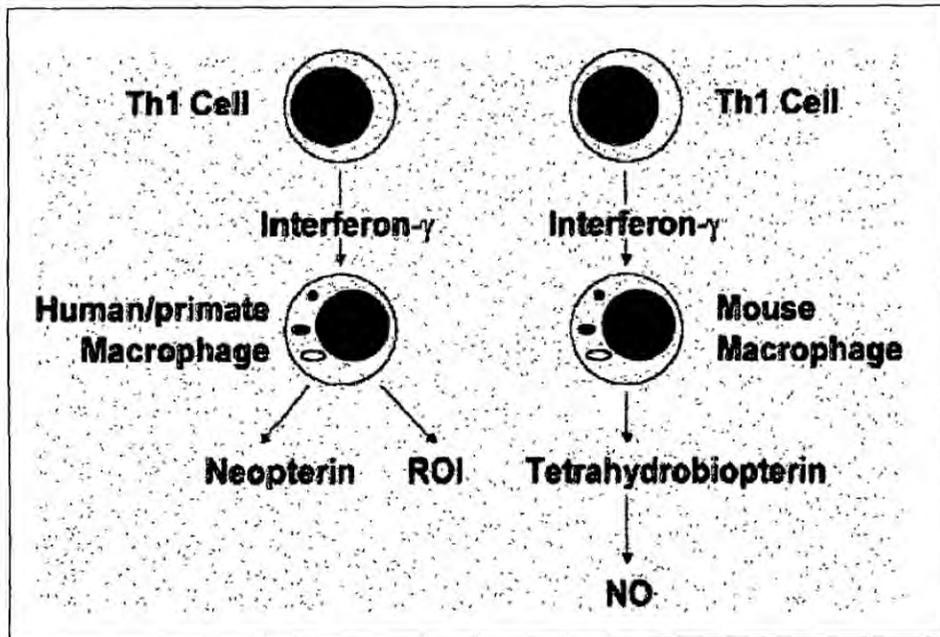
La neopterina (6-D-eritrotrishidroxipropilpterina) es otro importante marcador de activación inmune, punto de enfoque de nuestra investigación. Se trata de un compuesto de bajo peso molecular (253 g/mol) liberado predominantemente por los macrófagos (los linfocitos B también lo liberan, pero en menor cantidad). Su precursor es el trifosfato de

guanosina (GTP). La enzima GTP ciclohidrolasa I actúa sobre ese precursor al ser estimulada por el INF γ (Figura 11). El INF γ es una citoquina proinflamatoria Th1 con un papel central en la patogénesis de la infección por VIH e influye en la inmunodeficiencia y la neurodegeneración de dichos pacientes (Figura 12). Altas concentraciones de neopterina en los pacientes VIH+ indican incremento en la producción endógena de INF γ y representan altos índices de replicación viral. La excreción de la neopterina se da por vía renal y la vida media de la neopterina dentro del sistema circulatorio ha sido calculada en aproximadamente 90 minutos. Estudios de seguimiento han revelado que incrementos en la neopterina se dan en los fluidos corporales al final del periodo de incubación en las infecciones virales, incluso antes de que aparezcan síntomas clínicos y en la infección por el VIH-1 su concentración parece seguir el curso de la carga viral. Durante la seroconversión la concentración se normaliza después que el sistema inmune ha eliminado exitosamente al patógeno (Wirleitner et al., 2005). Ellos encontraron que durante la infección aguda, la concentración de neopterina se eleva antes de la producción de anticuerpos (Figura 13). En el primer año de la infección se ha observado una correlación inversa entre el aumento de la neopterina y la disminución del CD4+. Los estadios asintomáticos subsiguientes, se han asociado con continuos aumentos de neopterina, asociados también con aislamiento positivo del virus y altos índices de replicación viral. Con la progresión a la enfermedad, la neopterina se eleva y altas concentraciones de neopterina han sido encontradas en pacientes con SIDA, lo cual sugiere que una progresión rápida puede ser inducida por incrementos altos de neopterina.



B. Wirleitner et al. / Molecular Immunology 42 (2005)

Figura 11. Biosíntesis de la neopterina



Current Drug Metabolism, 2002, Vol. 3, No. 2 Murr et al.

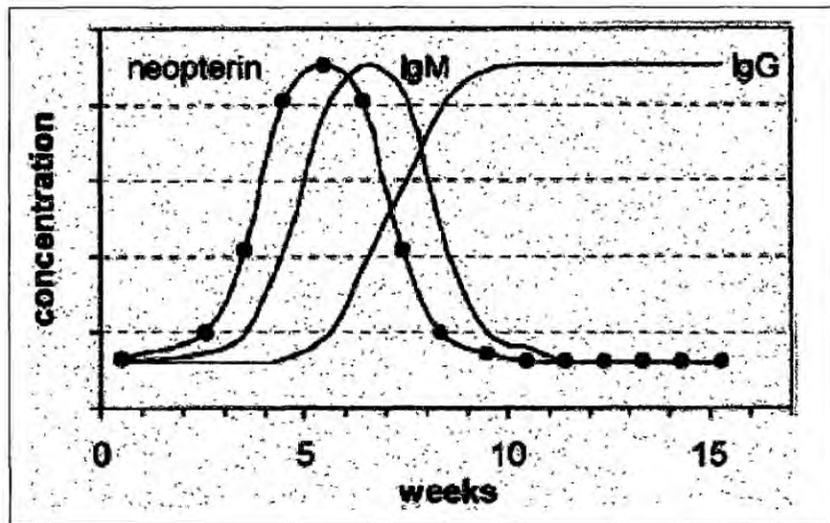
Figura 12. Producción de neopterina promovida por el INF γ

Satoh et al. (1998) analizaron las concentraciones séricas de neopterina en adolescentes sanos para un rango de edad comprendido entre los 12 y 19 años. Este estudio demostró que el suero de estos individuos no contiene concentraciones significativas de neopterina y que no existen diferencias estadísticamente significativas relacionadas con la edad o el género. Sack et al. (1998) tampoco encontraron diferencias en cuanto a género y, demostraron además, que las concentraciones de neopterina en el suero de los niños están dentro de rango de los adultos o ligeramente por debajo. Sin embargo, en estudios conducidos por Diamondstone et al. (1994), ya habían encontrado que las concentraciones de neopterina se incrementaban con la edad en individuos sanos de 20 a 69 años; sin embargo, se observó que la diferencia entre cada uno de sus rangos de edades no era significativa. Investigaciones llevadas a cabo por Schennach et al. (2002) sugirieron que las concentraciones de neopterina están asociadas con la edad, estatus de fumadores, presión diastólica y BMI (índice de masa corporal), aunque tales asociaciones no están muy claras.

Concentraciones elevadas de neopterina se han observado en fluidos humanos tales como suero, fluido cerebro espinal, saliva, fluido ascítico, y otros, durante respuesta inmune celular. Sin embargo, es importante señalar que el incremento de neopterina no es específico de la infección por el VIH+. Al respecto, Bedowska et al. (2001) detectaron incrementos para varias infecciones por virus (VIH, Citomegalovirus, virus de la hepatitis B y C), bacterias intracelulares (malaria), parásitos (schistosomiasis), transplantes de órganos, desórdenes autoinmunes, uremia, desórdenes neuro- degenerativos, problemas cardiovasculares, malignidades, entre otros. Algunas de estas condiciones no están necesariamente asociadas con activación inmune. Se han realizados diversos estudios

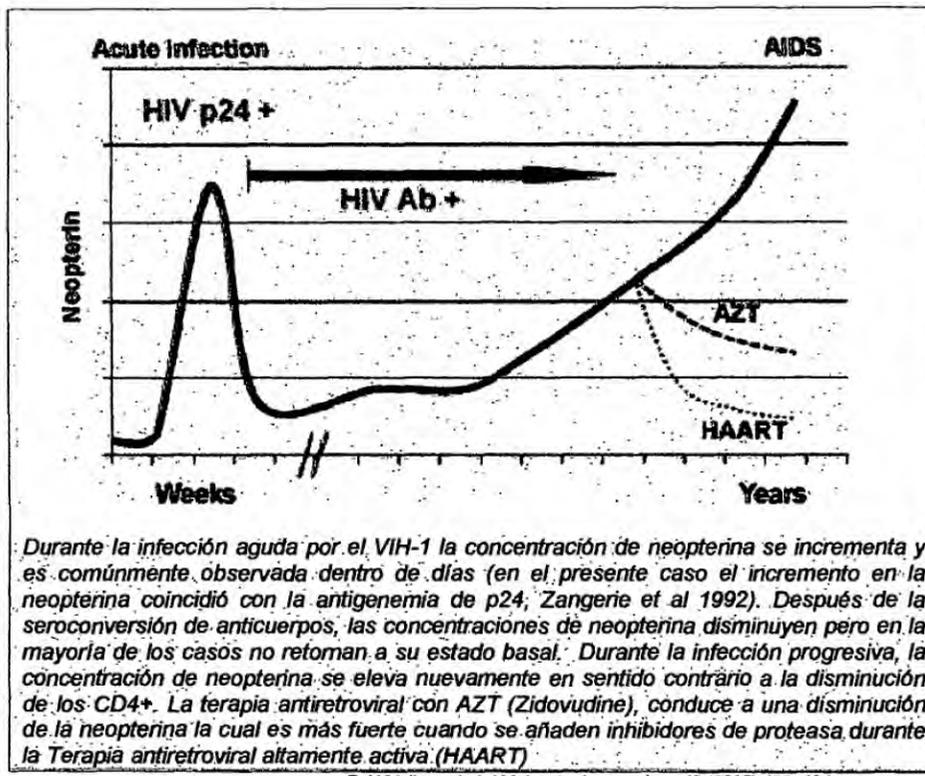
sobre su aplicabilidad en donantes, enfermedades malignas, indicación temprana de complicaciones en receptores de injertos, indicación de actividad de la enfermedad en enfermedades autoinmunes, entre otros. Immanuel et al. (2005) encontraron altas concentraciones de neopterina (37.8 nmol/L) en los pacientes con VIH+ con tuberculosis en comparación con los pacientes con solamente VIH+ (13.5 nmol/L) para una $p < 0.001$. La correlación con el CD4+ fue de $r = -0.450$. Señalan en su estudio que existen muchas ventajas al combinar linfocitos T CD4+ con las concentraciones de neopterina y obtener un índice como marcador pronóstico.

Cuando la respuesta inmune ha eliminado exitosamente al patógeno, las concentraciones de neopterina disminuyen y se normalizan durante la seroconversión, pero esto no ocurre con los pacientes infectados por el VIH-1 en donde las concentraciones no se normalizan luego de la seroconversión. (Figura 14). Wirleitner et al. (2005) midieron en individuos sanos un valor de neopterina de 5.3 nmol/L y encontraron que las concentraciones permanecen fuera del rango normal en el 80% de los pacientes VIH+ que no reciben tratamiento con altos índices de replicación viral. Fahey et al. (1998a y 1998b) ya habían encontrado en individuos sanos una concentración promedio de neopterina de 6.25 nmol/L (4.9-9.4) y en pacientes con el VIH una correlación de neopterina con la carga viral de $r = 0.500$ y de neopterina con los T CD4+ de $r = -0.360$. Ellos demostraron que altas concentraciones de neopterina indican gran probabilidad de desarrollar SIDA en 3 años cuando la carga viral es alta. La mayor frecuencia de SIDA (93%) estuvo con neopterina > 20 nmol/L y CD4 < 200 células/ μ l y la menor frecuencia de SIDA (7%) correspondió con concentraciones de neopterina < 12 nmol/L y CD4 > 500 células/ μ l.



Current Drug Metabolism, 2002, Vol 3, No. 2 Murr et al.

Figura 13. Curso de la neopterin y detección de anticuerpos en la infección por el VIH-1



B. Winkelner et al. / Molecular Immunology 42 (2005) 183-194

Figura 14. Diagrama esquemático del curso de la neopterin en los pacientes VIH-1

La utilidad de la neopterinina en la evaluación de la eficacia anti retroviral ha sido planteada por Amirayan-Chevillard et al. (2000). Estos investigadores encontraron concentraciones de neopterinina aumentados en pacientes VIH+ en comparación con individuos sanos ($p < 0.0001$) y en pacientes con carga virales altas en relación con cargas virales bajas ($p < 0.05$). En las infecciones tempranas esas elevaciones incluso preceden a la disminución de linfocitos T CD4+. También observaron que concentraciones altas de neopterinina circulantes persisten a través del curso de la enfermedad y que pudiera predecir más eficientemente la mortalidad relacionada con VIH-1 que la misma progresión de la enfermedad. Adicionalmente, el tratamiento disminuyó la carga viral, disminuyó la neopterinina y aumentó el CD4+. Evidenciaron por tanto, que los efectos del tratamiento sobre la neopterinina fueron específicos y reversibles. Esta investigación sugiere que un tratamiento prolongado puede normalizar los valores de neopterinina y que dichos valores se relacionan con la carga viral. El mantenimiento de la activación de monocitos puede contribuir a falla en el tratamiento, debido a toxicidad de drogas anti retrovirales, desarrollo de resistencia viral o falta de adherencia al régimen prescrito. Al respecto, otros estudios (Tsoukas et al., 1994) también apoyan la idea de que la medición de neopterinina pudiera ser útil en la evaluación del efecto de terapias antiretrovirales sobre la respuesta del huésped.

Con el fin de buscar métodos alternos para países en vías de desarrollo, Hosp. et al. (2000) evaluaron la correlación entre linfocitos CD4+ y neopterinina resultando una correlación inversa ($r = -0.410$) y demostraron alta sensibilidad de la neopterinina en comparación con otros marcadores de activación inmune, como por ejemplo, la β -2 M en la evaluación clínica. También hay estudios que sostienen la idea (Balakrishnan et al.,

2005) de que una combinación de los valores de CD4 con la β 2-M o con la concentración de neopterina pudiera tener un buen valor predictivo. La literatura insiste en la necesidad de implementar metodologías apropiadas en los países con escasos recursos con el fin de lograr un monitoreo a bajo costo.

En la literatura aparecen algunos planteamientos contradictorios respecto a la utilidad práctica de estos marcadores de activación inmune en el monitoreo de la progresión del VIH-1 debido a limitaciones relacionadas con la falta de sensibilidad, especificidad o poder predictivo. De acuerdo con Kiepiella et al., (2005), es necesario hacer más investigaciones al respecto pues ninguno de ellos ha demostrado ser el marcador ideal.

Si bien es cierto que el conteo de linfocitos CD4+ y la carga viral por el VIH son por el momento los únicos marcadores subrogados (validados) en el seguimiento de los pacientes infectados por el VIH (Hudges et al. y Portela et al.; 1997) y que hasta la fecha no se ha validado ningún marcador de activación adicional, la carga viral y el conteo de CD4+ representan para el paciente elevados costos económicos y pérdidas cuantiosas para el sistema de salud, sobretodo cuando, por falta de dichos reactivos, el seguimiento se ve interrumpido y no existen datos sobre la respuesta inmunológica al tratamiento. Es por ello que es importante conocer la correlación existente entre la concentración de neopterina con los marcadores actualmente utilizados y el progreso de la infección en los pacientes VIH positivos en Panamá.

7. TRATAMIENTO Y VACUNAS - PERSPECTIVAS

Los esfuerzos en cuanto a tratamiento se han dirigido a reactivos que interfieran en diversas partes del ciclo vital del virus. El tratamiento consiste ahora en la administración de dos clases de fármacos antiretrovirales, utilizados en combinación que se dirigen contra moléculas diana del virus para las que no hay contrapartida en el ser humano. El primer tipo de fármaco fue el de los análogos de nucleótidos que inhiben la actividad de la transcriptasa inversa. Estos fármacos son la 3-azido-3-desoxitimidina (AZT), la 2,3-didesoxiinosina y la 2',3'-didesoxicidina. Cuando estos fármacos se utilizan en monoterapia, a menudo logran reducir significativamente la carga viral plasmática del ARN del virus durante semanas o años. Habitualmente no detienen la progresión de la enfermedad, sobre todo por la evolución del virus con formas mutadas de la transcriptasa inversa que son resistentes a los medicamentos. Mas recientemente, se han desarrollado inhibidores de la proteasa viral que bloquean el procesamiento de proteínas precursoras a proteínas virales maduras de la cápside y del "core". Cuando estos se usan en monoterapia, surgen rápidamente virus mutantes resistentes a sus efectos. Estos medicamentos se pueden usar con dos inhibidores diferentes de la transcriptasa inversa. Esta nueva triple terapia denominada terapia antiretroviral altamente activa o HAART (del inglés, *highly active aniretroviral therapy*) ha demostrado ser muy eficaz en la reducción plasmática del ARN viral a cantidades indetectables en la mayoría de los pacientes tratados hasta 3 años. En cuanto a avances actuales en lo que respecta a combinaciones de terapia antiretroviral altamente activa,

Neves et al. (2000) han inducido profundas y rápidas caídas en carga viral del VIH en plasma generando cambios en el curso del SIDA hacia un nuevo panorama para el control de la progresión a la enfermedad. Berrey et al. (2001) asociaron el uso de HAART con reducción del VIH-1 en plasma y compartimientos celulares, evidenciando preservación inmune en el conteo de linfocitos T CD4+, disminución de infecciones oportunistas y en la frecuencia de condiciones respiratorias y mucocutáneas, aunque observaron muchos efectos adversos asociados con el HAART.

De igual forma, en estudios prospectivos más recientes llevados a cabo por Sued et al. (2006), la HAART fue efectiva en la gran mayoría de los pacientes con carga viral indetectable. Luego de un seguimiento por 3 años, la posibilidad de progresión clínica inmunológica disminuyó en comparación con pacientes no tratados, aunque siguen señalando en sus estudios una alta frecuencia de efectos adversos como factor limitante. Respecto al momento de inicio de la terapia, Altfeld et al. (2001) encontraron que las respuesta CTLs son relativamente modestas y estrechamente dirigidas en individuos tratados con infección aguda antes de la seroconversión, pero que el tratamiento temprano permite la generación de una fuerte respuesta de células T colaboradoras VIH-específicas, la conservación de una población viral bien homogénea y una correlación inversa entre la respuesta CTLs y la carga viral. En los individuos tratados luego de la fase aguda, las células T virus-específicas se pierden, la población es altamente diversificada, no hay correlación inversa entre CTLs y la carga viral (incluso con respuesta CTLs más fuertes), lo cual sugiere una compleja interacción entre la diversidad viral, las células T colaboradoras virus-específicas y las CTLs en la infección por el VIH-1. Estos investigadores concluyeron que los individuos que son tratados en la

infección aguda por el VIH-1 se pueden beneficiar de estrategias dirigidas a resaltar respuestas de CTLs específicas mientras que aquellos que son tratados más adelante se pueden beneficiar de estrategias dirigidas a realzar funciones de las células T colaboradoras específicas y en respuestas de ensanchamiento de CTLs con el fin de combatir la creciente diversidad viral. Estudios de cohorte más recientes realizados por Smith et al. (2004) demostraron que la progresión clínica y el desarrollo del SIDA son mayores en los pacientes que no reciben HAART durante la fase aguda en comparación con los que si la recibieron. Por su parte, Choi et al. (2006) determinaron que frente a interrupciones estructuradas del tratamiento (STIs, del inglés *Structured Treatment Interruptions*) la respuesta inmune celular VIH específica puede ser estimulada por STIs en koreanos infectados crónicamente por VIH. Sin embargo, frente a estos planteamientos, es importante señalar que la población utilizada en dichos estudios fue pequeña (n=10).

A pesar del fuerte efecto anti retroviral de las CTLs, la mayoría de las personas infectadas tienen pobre control de la viremia y progresan a SIDA sin terapia anti retroviral efectiva. Varios estudios indican que una terapia antiviral resulta en la generación de una fuerte respuesta de células T colaboradoras VIH-específicas, sin embargo, los efectos de la terapia sobre las CTLs aún no se está bien definida (Hogan et al., 2001).

Diversos estudios pusieron en evidencia la habilidad de la terapia para producir una supresión viral. Esto condujo a la hipótesis de que el VIH-1 podía ser erradicado dentro de 2 ó 3 años. Sin embargo, este optimismo duró poco cuando otros hallazgos mostraron la otra cara de la moneda. Se presentaron pacientes tratados con carga viral

indetectable de hasta 30 meses los cuales mantenían un reservorio latente de células T de memoria que llevaban consigo al virus replicándose de manera competente. Se sabe que ese reservorio es establecido bien temprano durante la infección primaria y que el inicio del tratamiento durante la seroconversión aguda sintomática no previene ese establecimiento. La vida media de esas células T de memoria se ha estimado en 6 a 44 meses y pueden repletarse por la persistencia de la viremia o una replicación de bajo nivel no reconocida.

Aún no se sabe si se desarrollará resistencia o no a tratamientos mantenidos durante periodos muy largos. Aunado a esto, hay varios inconvenientes que pueden limitar su uso: los efectos adversos en los pacientes, su elevado costo y la complejidad de las pautas de administración. Se requiere, por lo tanto, la utilización de regímenes terapéuticos con alta potencia, pero más tolerantes y más estudios para ver si los beneficios obtenidos son sostenidos a largo plazo. El desarrollo de una vacuna eficaz se ha convertido en una de las principales prioridades de las instituciones de investigación biomédica donde la variabilidad genética del virus plantea un problema para su diseño. La depleción inicial de las células T CD4+ VIH-específicas planteada anteriormente por Hel et al. (2006) ha tenido implicaciones en el desarrollo de la vacuna. La inducción de respuesta de células T CD4 virus-específicas es un importante aspecto que ha sido considerado en su desarrollo y constituye el reconocimiento del rol central de las células T CD4+ colaboradoras en el desarrollo, maduración y mantenimiento de las células CTLs y respuesta humoral. Sin embargo, la falta de conocimiento sobre la correlación inmunológica definitiva de protección sigue siendo uno de los mayores impedimentos para el desarrollo exitoso de una vacuna eficaz contra el VIH-1.

JUSTIFICACIÓN Y USO DE RESULTADOS

Actualmente en nuestro país, el monitoreo de los pacientes con VIH/SIDA incluye la utilización de reactivos costosos, infraestructura especial y entrenamiento especializado como el conteo de linfocitos TCD4+ (costo para el paciente de B/. 60.00) y la cuantificación de la carga viral del VIH (costo para el paciente de B/. 120.00). La falta de recursos económicos provoca muchas veces una ausencia de monitoreo lo cual, además de perjudicar al paciente, acarrea pérdidas cuantiosas para el sistema de salud. Una interrupción en el seguimiento de los pacientes infectados con VIH/SIDA tal como ya se ha dado, nos priva de datos sobre la respuesta inmunológica al tratamiento. Es necesario poder contar con otros marcadores de activación inmune validados en nuestro país que ayuden a complementar el monitoreo de la progresión a la enfermedad y respuesta al tratamiento en los pacientes con VIH/SIDA.

El sistema de salud requiere de opciones metodológicas baratas y de fácil ejecución, sobretodo cuando se cuenta con recursos limitados, con el fin mejorar la capacidad pronóstica en la infección por el VIH (Pascale et al., 1997). La neopterina, además de sencilla y barata (costo para el paciente de B/. 5.00), representa una alternativa que no requiere infraestructura especial, ni equipos costosos, ni personal altamente entrenado (Mildvan et al., 2005). Por tanto, sería de mucha utilidad práctica contar con una metodología accesible, confiable y validada en nuestro país para el seguimiento de los pacientes infectados por el VIH en Panamá. Es importante determinar la probable utilidad de la neopterina como un marcador adicional de progreso hacia el SIDA ya que con su valoración se podría reducir el número anual de pruebas solicitadas (linfocitos T CD4+ y/o carga viral por el VIH) y por ende reducir el costo asociado con el monitoreo.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existe correlación entre la concentración de neopterina con los marcadores actualmente utilizados para el monitoreo y el progreso de la infección en los pacientes VIH positivos en Panamá.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el valor pronóstico de la neopterina en el progreso de la infección por VIH y su correlación con otros marcadores utilizados actualmente en la evaluación de activación inmune en pacientes VIH positivos en Panamá

Objetivos Específicos:

1. Medir el conteo de linfocitos T CD4+ en la sangre total de los pacientes infectados por el VIH.
2. Cuantificar la carga viral en el plasma de los pacientes VIH+.
3. Medir la concentración de neopterina por inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo en el plasma de los pacientes VIH+.
4. Correlacionar la concentración de neopterina con el conteo de T CD4+, T CD8+ y la carga viral y el progreso de la enfermedad en pacientes VIH positivos.
5. Calcular el índice CD4/neopterina y correlacionarlo con el progreso de la enfermedad en pacientes VIH positivos.

ASPECTOS METODOLOGICOS

1. Sujetos de estudio:

Se trata de un estudio retrospectivo utilizando datos clínicos y de laboratorio que incluyeron determinaciones simultáneas de linfocitos T CD4+, TCD8+ y carga viral por VIH-1 en una misma muestra archivada y almacenada en una seroteca de 108 muestras de las cuales 88 muestras fueron de pacientes infectados por el virus del VIH procedentes de toda la República de Panamá que han sido referidos por el servicio de infectología de sus respectivas regiones al ICGES. Estos pacientes fueron clasificados de acuerdo con las definiciones de grupo del sistema de clasificación de 1993 para la infección por VIH del CDC y cumplieron con los criterios de inclusión establecidos en el estudio. En la seroteca se contó con dos muestras archivadas de sangre total (con EDTA como anticoagulante) de cada paciente. A una de ellas se le hizo inmediatamente la cuantificación de linfocitos T CD4+ por citometría de flujo. En la otra muestra, el plasma fue separado en dos alícuotas. Una alícuota se utilizó para la medición de carga viral por el VIH y en la otra alícuota se evaluó la concentración de neopterina con el fin de validar dicho marcador. El estudio incluyó, también, 20 muestras de seroteca como grupo control (muestras de paciente VIH negativos) procedentes de donantes del Banco de Sangre del Hospital Santo Tomás.

Para controlar la variabilidad del estudio y darle más precisión al mismo se controlaron variables intrínsecas que podían influir en la interpretación de resultados tales

como la presencia o ausencia de tratamiento, la calidad de los reactivos utilizados (Azíz et al. 1999a y 1999b) y el debido entrenamiento del personal a cargo de la ejecución de las pruebas. De igual forma se verificó el cumplimiento de las variables extrínsecas (externas o contaminantes) como el envío, embalaje y conservación adecuados.

2. Universo de estudio, selección y tamaño de la muestra

Todas las muestras archivadas en seroteca de pacientes infectados por el virus del VIH ≥ 5 años de edad con determinaciones simultáneas de linfocitos T CD4+, TCD8+ y carga viral los cuales fueron referidos por el Servicio de Infectología de sus respectivas regiones a nivel nacional al ICGES durante el periodo comprendido entre julio de 2003 a marzo de 2005.

Las muestras archivadas en seroteca de los pacientes fueron clasificadas de acuerdo con las definiciones de grupo del sistema de clasificación de 1993 para la infección por VIH del Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC) y cumplen con los criterios de inclusión establecidos en el estudio.

3. Unidad de análisis y observación:

Cada muestra archivada en la seroteca fue un elemento de la población y los Servicios de Infectología de cada región involucrada contribuyeron a la unidad de muestreo.

4. Criterios de inclusión y exclusión:

Inclusión:

-Todas las muestras archivadas en seroteca de los pacientes infectados por el VIH con edades ≥ 5 años que fueron referidas por el Servicio de Infectología de cada región del país al ICGES y a las cuales se les efectuaron determinaciones simultáneas de linfocitos T CD4+, T CD8+ y Carga Viral por VIH en una misma muestra.

Exclusión: -

-Muestras archivadas en seroteca de pacientes infectados por el VIH con edades < 5 años y que fueron referidos del Servicio de Infectología de cada región del país al ICGES y a las cuales NO se les efectuaron determinaciones simultáneas de linfocitos T CD4+, T CD8+ y Carga Viral por VIH en una misma muestra.

-Muestras de mujeres embarazadas

-Muestras que no llegaron con el almacenamiento adecuado

5. Recolección de la información y medición de marcadores:

La recolección de la información se hizo a partir del formulario de seroteca (ver anexo 1) de la Sección de Genómica y Proteómica del ICGES . Para la recolección de los datos se utilizaron los formularios de seroteca correspondientes (ver anexos 2 y 3). El método cuantitativo fue la estrategia de trabajo para el análisis de los datos.

Se colectaron las muestras de sangre en tubos con EDTA como anticoagulante. Las muestras llegaron debidamente embaladas e identificadas. Todas las muestras fueron codificadas, archivadas y almacenadas apropiadamente. La determinación de neopterina se hizo por ELISA competitivo; las mediciones de CD4 y carga viral por Citometría de Flujo y Cobas Amplicor HIV-Monitor Test versión 1.5, respectivamente.

a) Conteo de linfocitos T CD4 + / CD8+:

El método para el conteo de los linfocitos CD4+ y CD8+ en muestras de sangre total se realizó por citometría de flujo en Coulter[®] EPICS XL™ EXPO 32 ADC (Figura 15) en una sola plataforma de acuerdo con el manual de procedimientos de la sección de Genómica y Proteómica. La suspensión celular procedente de 100 ul de la sangre total fue preparada previamente con 10 ul anticuerpos monoclonales en 4 colores listos para usar en citometría de flujo CD45/CD4/CD8/CD3 de ratón antihumanos IgG1, marcados con FITC, RD1, ECD y PC5, respectivamente. Se procedió a un periodo de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Al término de ese periodo de tiempo, se procedió a lisar y fijar las células utilizando para ello el reactivo Immunoprep (utilizando el Sistema Q-prep, Coulter). La muestra preparada la muestra fue introducida

en el sistema hidráulico del citómetro, de manera que las células atravesaron individualmente la cámara de flujo, donde el haz del láser interceptó las células. El contacto del haz del láser con una célula produjo dos tipos diferentes de dispersión: *frontal* y *lateral* (90°). La dispersión frontal (Forward Scatter) nos dió información acerca del *tamaño celular*, mientras que la dispersión lateral (Side Scatter) nos proporcionó información acerca de la *complejidad celular*. Los anticuerpos monoclonales adheridos a la superficie celular fueron a la vez excitados por la luz del láser y generaron fluorescencias que fueron recogidas por fotomultiplicadores que transformaron la señal óptica en eléctrica, enviando toda la información al sistema informático para su análisis.



Figura 15. COULTER® EPICS XL™ y EXPO 32 ADC utilizado en el conteo de linfocitos T CD4+ y T CD8+

b) Carga Viral:

El ARN del VIH-1 se cuantificó en el plasma con el Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test versión 1.5 (Figura 16), siguiendo estrictamente instrucciones de la prueba (Roche Diagnostics System) Este ensayo consiste en la amplificación *in vitro* de ácido nucleico para la determinación cuantitativa del ARN del virus del VIH-1 en el plasma humano, mediante el analizador Cobas Amplicor. Esta prueba pudo determinar cuantitativamente el ARN del VIH-1 entre límites de 50 a 750,000 copias/ml, usando una combinación de dos procedimientos de preparación de especímenes, el procedimiento estándar (HIM)-cuyos límites de detección son de 400 a 750,000 copias/ml y el procedimiento ultrasensible (HIS)-con límites de detección de 50 a 100,000 copias/ml. La prueba está basada en cinco procesos principales: preparación del espécimen, transcripción reversa del ARN objetivo para generar ADN complementario (cDNA), amplificación por PCR del cDNA objetivo usando iniciadores complementarios específicos para el VIH-1, hibridación del ADN amplificado a sondas oligonucleotídicas específicas para los objetivos y detección del DNA amplificado conjugado con la sonda mediante determinación colorimétrica.



Figura 16. Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Test (Roche Diagnostics System) utilizado en la cuantificación del RNA del VIH-1 (carga viral)

c) Neopterina:

Las concentraciones de neopterina se midieron por el método de ELISA convencional competitivo enzimático (IBL, Immuno-Biological Laboratories, USA) siguiendo instrucciones dadas por el instructivo de la prueba. Una cantidad desconocida de antígeno en la muestra y una cantidad fija de un antígeno marcado con una enzima, compitieron por el sitio de unión con el anticuerpo (anti-neopterina de conejo). Los complejos antígenos anticuerpos se unieron a los pocillos del microplato que estaban cubiertos con anticuerpo de cabra anti-conejo. Los antígenos no unidos fueron removidos por lavados. La intensidad del color desarrollada después de la incubación con el sustrato es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra. Los resultados de las muestras fueron determinados directamente usando una curva patrón. Los valores esperados que estipula la prueba para individuos sanos es de < 10 nmol/L y la sensibilidad analítica (límite de detección) es de 0.7 nmol/L.

6. Análisis estadístico:

Las evaluaciones estadísticas de los datos y las comparaciones entre las pruebas serán realizadas por medidas computarizadas no-paramétricas (rango de correlación de Sperman). Cualquier valor de $p \leq 0.05$ será considerado estadísticamente significativo. Los programas utilizados fueron Excel, Epi-Info 6.01, S-Plus versión 6.2 para WP edición 2003 e INSTAT 1.2 para Macintosh. Cargas virales en el plasma que estaban por debajo o por encima del límite detectable de la prueba se les asignó el valor del límite de detección inferior o superior, respectivamente, de acuerdo con la metodología aplicada a

la muestra, es decir, 50 y 100,000 copias/ml en el procedimiento ultrasensible (HIS) y 400 y 750,000 copias/ml en el procedimiento estándar (HIM)

7. Consideraciones éticas

Las muestras archivadas en seroteca de pacientes infectados por el VIH sólo fueron utilizadas para fines del estudio previamente explicados. Todas las muestras del estudio tenían asignado un código numérico con el fin de proteger la confidencialidad del paciente de forma tal que el nombre no fuera usado en ningún artículo que se publique. Los resultados de las pruebas de laboratorio se mantendrán en las oficinas de la Sección de Genómica y Proteómica del ICGES restringido a personal ajeno a la investigación. El presente estudio recibió aprobación por el Comité Nacional de Bioética del ICGES.

RESULTADOS

La población en estudio comprendió 108 muestras de seroteca procedentes de pacientes con edades \geq a 5 años (edad promedio de 30.2 ± 1.4). Ochenta y ocho (88) muestras corresponden a pacientes VIH positivos dentro de las cuales clasificamos un grupo sin SIDA ($n= 32$) y un grupo con SIDA ($n= 56$). Para efectos de los análisis, ambos grupos fueron estratificados de acuerdo con la presencia o ausencia de tratamiento. El estudio también incluyó 20 muestras de seroteca VIH negativas como grupo control. Del total de muestras estudiadas, el 36.1% (39) pertenecieron al sexo femenino y el 63.9% (69) al sexo masculino. La asociación edad y el sexo no fue significativa para el grupo estudiado.

Conteo de linfocitos T CD4+:

El promedio del conteo de linfocitos T CD4+ en el grupo control fue de 971.7 células/ μ l (IC: 822.2-1121.1). Se observó una disminución del conteo en los pacientes infectados por el virus del VIH desde los pacientes sin SIDA hasta los pacientes con SIDA (Figura 17). Con respecto al grupo control, esas disminuciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.01$), a excepción de los pacientes sin SIDA con tratamiento donde tal diferencia no fue significativa ($p=0.69$). Hubo diferencias estadísticamente significativas en el conteo de linfocitos CD4+ respecto al tratamiento en los pacientes con SIDA, sin embargo, no fue así en los pacientes sin SIDA ($p=0.1402$) (Cuadro I).

Cuando estratificamos el conteo de los linfocitos T CD4+, más del 70% de los pacientes sin SIDA con tratamiento presentaron conteos ≥ 500 células/ μl mientras que más del 60% de los pacientes sin SIDA sin tratamiento, presentaron conteos de T CD4+ entre 201-499 células/ μl (Cuadros II). En los pacientes con SIDA sin tratamiento, más del 80% de ellos presentaron conteos de T CD4+ ≤ 200 células/ μl (Cuadros III).

Conteo de linfocitos T CD8+:

El promedio de linfocitos T CD8+ en el grupo control fue de 510.7 células/ μl (IC: 416.5-604.9). Se observaron conteos elevados de linfocitos T CD8+ en los pacientes infectados por el virus del VIH-1 (Figura 17), los cuales son estadísticamente significativos con respecto al grupo control a excepción del grupo con SIDA sin tratamiento donde no existió tal diferencia ($p=0.1687$). Los conteos de linfocitos T CD8+ en las muestras sin SIDA con tratamiento y sin tratamiento no mostraron diferencias significativas ($p=0.2947$) (Cuadro I).

CUADRO I

MARCADORES EVALUADOS EN LOS GRUPOS DE MUESTRAS DE PACIENTES INFECTADOS CON EL VIH (SIN SIDA Y CON SIDA) Y EN EL GRUPO CONTROL

GRUPOS ESTUDIADOS	MARCADORES EVALUADOS ¹					
	CD4+ (células / ul)	CD8+ (células/ul)	ARN del VIH (Carga Viral) ² copias / ml	Neopterina (nmol / L)	R (CD4/CD8)	CD4/NPT
Grupo Control(n=20)	971.7 (822.2-1121.1)	510.7 (416.5 - 604.9)	-----	5.7 (4.9-6.5)	2.16 (1.7-2.7)	182.2 (149.1-215.4)
Grupo sin SIDA(n=32)						
Sin Tratamiento	432.9 (341.6-524.2)	1058.8 (781.5-1336.1)	116996.7 (-44940-278933.7)	15.96 (8.8-23.1)	0.46 (0.3-0.6)	37.2 (25.6-48.8)
Con Tratamiento	1024.8 (775.8-1273.9)	1269.7 (959.2-1580.1)	9861.6 (65.6-19657.6)	10.9 (7.7-14.1)	0.88 (0.6-1.1)	118.4 (81.6-155.3)
Grupo con SIDA(n=56)						
Sin Tratamiento	105.7 (59.6-151.8)	723.8 (522.2-925.5)	387003.7 (284992.9-489014.5)	45.8 (31.8-59.8)	0.17 (0.09-0.23)	3.2 (1.6-4.8)
Con Tratamiento	287.8 (131.4 - 444.2)	1014.3 (804.6-1224.0)	42669.5 (-15199.7-100538.8)	15.95 (9.9-22.0)	0.29 (0.19-0.39)	35.8 (20.1-51.5)

¹ Promedio (IC: Intervalos de Confianza de 95%)

² Si el valor es menor que el límite de detección, el valor del límite de detección ha sido aplicado.

CUADRO II

PORCENTAJE DE MUESTRAS SIN SIDA SEGÚN CONTEOS ESPECÍFICOS DE LINFOCITOS T CD4+, CARGA VIRAL Y NEOPTERINA

MARCADOR	ESTRATIFICACIÓN DE MARCADORES					
	TOTALES	Linfocitos T CD4+ (células / ul)			ARN del VIH (Carga Viral) ¹ copias / ml	
		≤ 200	201-499	≥ 500	< 100,000	≥ 100,000
NEOPTERINA						
(nmol / L)						
Con Tratamiento						
	(n=17)					
< 10	52.9	0	22.2	77.8	100	0
10-20	41.2	0	28.6	71.4	100	0
> 20	5.9	0	0	100	100	0
Sin Tratamiento						
	(n=15)					
< 10	33.3	0	100	0	80	20
10-20	53.3	0	62.5	37.5	100	0
> 20	13.3	0	100	0	0	100

Los valores están expresados en porcentajes (%)

¹ Si el valor es menor que el límite de detección, el valor del límite de detección ha sido aplicado.

Cuantificación del ARN del VIH (carga viral):

La diferencia en la cantidad de carga viral en las muestras de pacientes sin SIDA respecto al tratamiento no fue estadísticamente significativa ($p=0.1414$), mientras que en las muestras de pacientes con SIDA la diferencia fue significativa con una $p=0.001$ (Cuadro I). Los pacientes sin SIDA con tratamiento presentaron carga viral $< 100,000$ copias/ml en el 100% de los casos. Los pacientes con SIDA sin tratamiento presentaron carga viral $> 100,000$ copias/ml en la mayoría de los casos (50-85.7%).

La carga viral fue estratificada en dos categorías: $< 100,000$ y $\geq 100,000$ copias/ml.

El mayor porcentaje de pacientes con SIDA sin tratamiento correspondieron a cargas virales $\geq 100,000$ copias/ml (Cuadro III).

CUADRO III

PORCENTAJE DE MUESTRAS CON SIDA SEGÚN CONTEOS ESPECÍFICOS DE LINFOCITOS T CD4+, CARGA VIRAL Y NEOPTERINA

MARCADOR	ESTRATIFICACIÓN DE MARCADORES					
	TOTALES	Linfocitos T CD4+ (células/ul)			ARN del VIH (Carga Viral) ¹ copias/ml	
		≤ 200	201-499	≥ 500	< 100,000	≥ 100,000
NEOPTERINA						
(nmol/L)						
Con Tratamiento						
(n=29)						
< 10	31.0	33.3	55.6	11.1	100	0
10-20	48.3	35.7	57.1	7.1	92.9	7.1
> 20	20.7	66.7	33.3	0	83.3	16.7
Sin Tratamiento						
(n=27)						
< 10	0	0	0	0	0	0
10-20	22.2	100	0	0	50	50
> 20	77.8	80.9	19.1	0	14.3	85.7

Los valores están expresados en porcentajes (%)

¹ Si el valor es menor que el límite de detección, el valor del límite de detección ha sido aplicado.

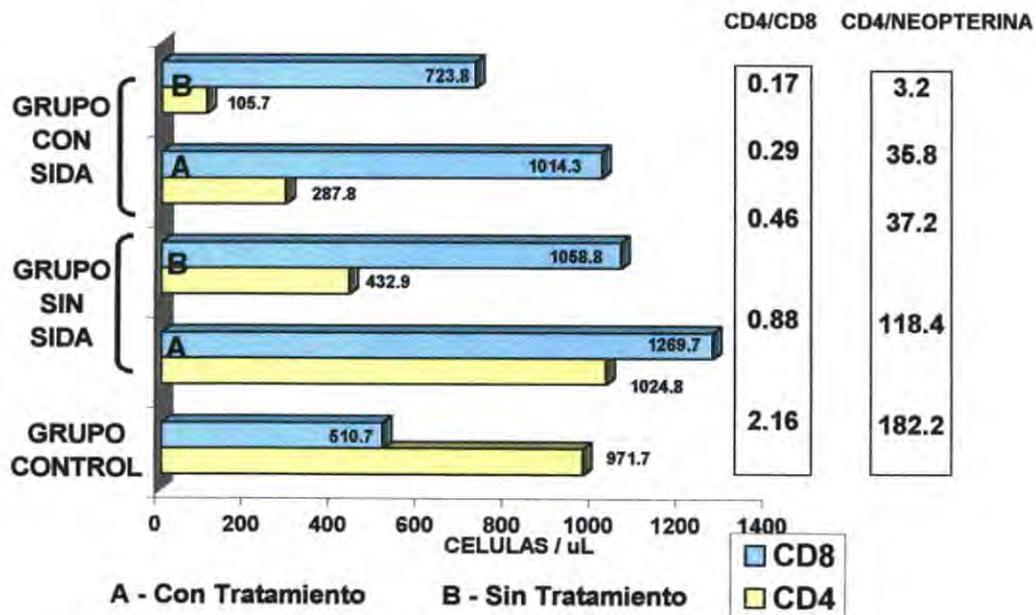


Figura 17 Conteos de linfocitos T CD4+, T CD8+ y carga viral y la relación CD4/CD8 y CD4/neopterin en la población estudiada

Neopterina:

El valor promedio de neopterina en el grupo control fue de 5.7 nmol/L (IC de 4.9 - 6.5 nmol/L). Se presentaron valores altos de neopterina en los pacientes sin SIDA y con SIDA cuyas diferencias fueron estadísticamente significativas respecto al grupo control ($p < 0.05$). Respecto al tratamiento, en los pacientes con SIDA se observó una diferencia significativa ($p = 0.0001$) en la concentración de neopterina; sin embargo, en los pacientes sin SIDA no hubo diferencia significativa ($p = 0.1586$) en la concentración de neopterina con respecto al tratamiento (Figura 18).

Se observaron concentraciones de neopterina aumentados (47.1 nmol/L) en pacientes VIH+ con cargas virales altas ($\geq 100,000$ copias/ml) en relación con las concentraciones de neopterina (14.5 nmol/L) cuando las cargas virales fueron bajas ($< 100,000$ copias/ml). En este caso la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) (Figura 21).

Se encontró una fuerte correlación entre neopterina y carga viral en las muestras de pacientes sin SIDA sin tratamiento ($r = 0.814$) (Figura 19). Se encontró una correlación inversa entre neopterina y T CD4+ de $r = -0.485$. La correlación entre neopterina y T CD8+ fue de $r = 0.427$ (Cuadro IV).

En los pacientes sin SIDA con tratamiento, valores de neopterina por debajo de 20 nmol/L se presentaron en más del 92 % de los casos y la mayoría de ellas tenían conteos de linfocitos T CD4+ ≥ 500 células/ μ l y el 100% correspondían con cargas virales $< 100,000$ copias/ml. En los pacientes infectados por el VIH sin SIDA sin

tratamiento, valores de neopterinina > 20 nmol/L se encontraron en el 13.3 % de los casos de y de ellos el 100% correspondían a cargas virales $\geq 100,000$ copias/ml (Cuadro II).

En los pacientes con SIDA sin tratamiento, el 100% de los casos presentó valores de neopterinina por encima fuera del rango normal y el 31 % de las muestras del grupo con SIDA con tratamiento presentaron valores de neopterinina por debajo de 10 nmol/L (Cuadro III).

Valores promedios de neopterinina de 47.1 nmol/L (IC de 32.8 - 61.4) y de 14.5 nmol/L (IC de 11.2 - 17.8) fueron encontrados con carga viral correspondientes a $\geq 100,000$ copias/ml y $<$ de 100,000 copias/ml, respectivamente (Cuadro V).

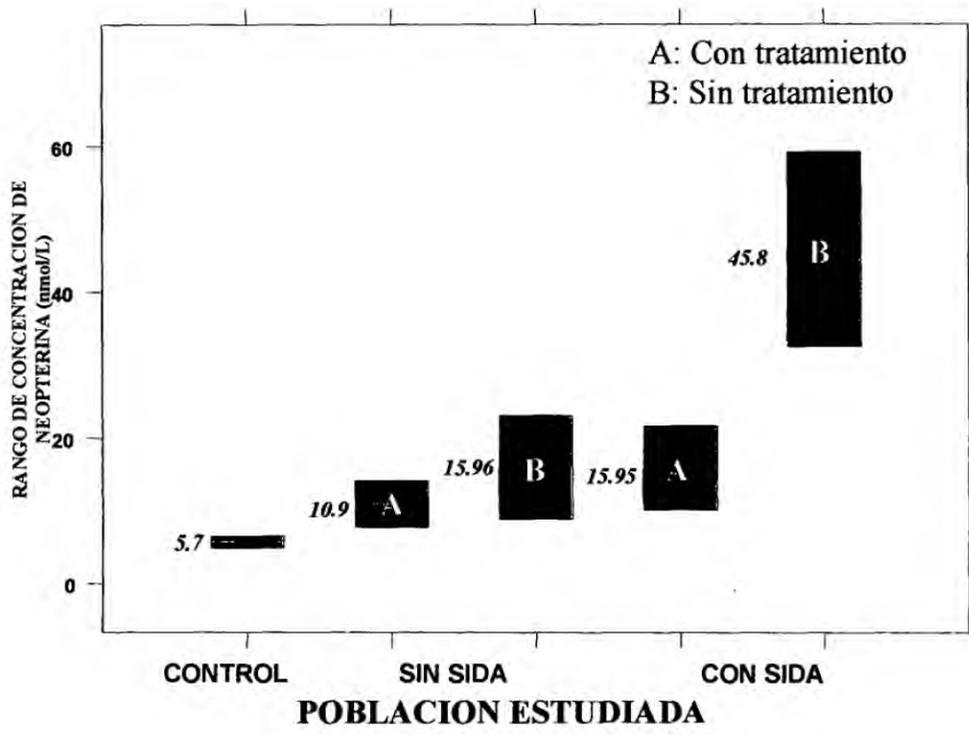


Figura 18. Concentración de neopterina en la población estudiada. El número a la izquierda de cada rango (en *cursiva*) indica el valor promedio de la concentración de neopterina para cada grupo estudiado.

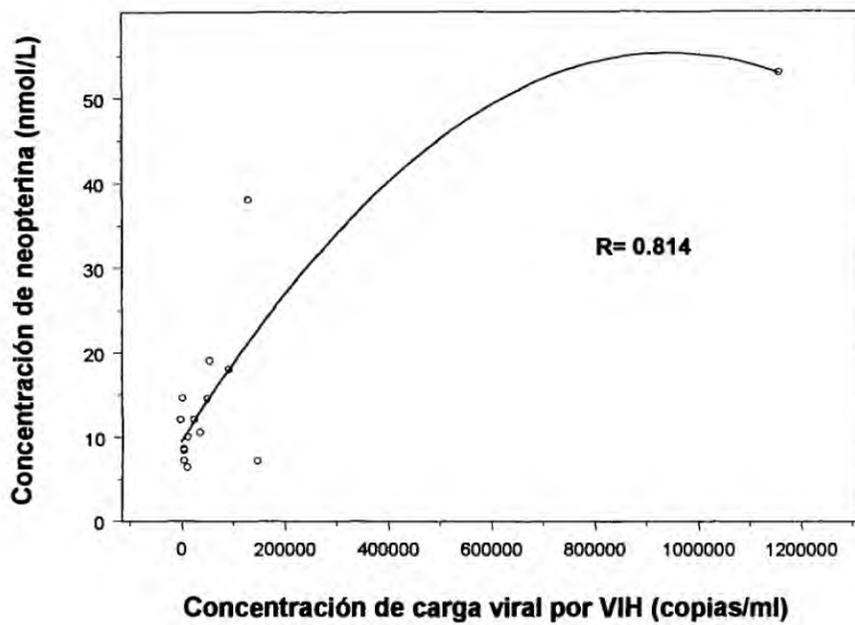


Figura 19. Correlación entre neopterina y carga viral en el grupo sin SIDA sin tratamiento

CUADRO IV

CORRELACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES PARÁMETROS ESTUDIADOS (r)

Marcadores estudiados	Correlación (r) ¹			
	SIN SIDA		CON SIDA	
	En tratamiento	Sin Tratamiento	En tratamiento	Sin Tratamiento
Neoptarina				
CD4+	-0.100	-0.485	-0.218	-0.220
CD8+	0.192	0.427	0.063	0.191
CARGA VIRAL ³	0.393	0.814	0.300	0.160
CD4/ NPT ²				
R (CD4/CD8)	0.277	0.439	0.973	0.323

¹ Programa Instat 1.2

² Hubo una correlación de 0.640 con respecto a la R (CD4/CD8) para toda la población estudiada

³ Si el valor es menor que el límite de detección, el valor del límite de detección ha sido aplicado.

CUADRO V

VALORES DE NEOPTERINA Y DE CD4/NPT POR ESTRATIFICACIÓN DE LA CARGA VIRAL EN LA POBLACIÓN ESTUDIADA

Marcadores estudiados ¹	CARGAS VIRALES ²		
	Grupo Control	< 100,000 copias/ml	≥ 100.000 copias/ml
Neopterina (nmol/L)	5.7 (4.9-6.5)	14.5 (11.2-17.8)	47.11 (32.8-61.4)
CD4/NPT	182.2 (149.1-215.4)	57.9 (38.3-77.6)	5.2 (0.6-9.8)

¹ Promedios (Intervalos de confianza 95%)

² Si el valor es menor que el límite de detección, el valor del límite de detección ha sido aplicado.

Índices CD4/CD8 y CD4/neopterinina:

El índice CD4/CD8 y CD4/neopterinina obtenido en el grupo control fue de 2.16 y 182.2, respectivamente. Se observó una disminución de ambos índices en las muestras de pacientes por el VIH (sin SIDA y con SIDA) con respecto al grupo control y alcanzó su límite más bajo cuando el paciente ha desarrollado el SIDA y no recibe tratamiento (Figura 17). No hubo diferencias significativas en el índice CD4./CD8 de los pacientes sin SIDA ($p=0.07$) y de los pacientes con SIDA ($p=0.14$) respecto al tratamiento. De igual forma, el índice CD4/neopterinina obtenido en el grupo sin SIDA y con SIDA tampoco hubo diferencia significativa con respecto al tratamiento ($p=0.051$ y $p= 0.052$). Se observó una alta correlación entre el índice CD4/CD8 y CD4/neopterinina ($r= 0.973$) en el grupo con SIDA con tratamiento (Figura 20),. mientras que para la población estudiada tal correlación fue de 0.640 (Cuadro IV).

Índices de CD4/neopterinina fue de 57.9 (IC de 38.3 - 77.6) y de 5.2 (IC de 0.63 -9.8) correspondieron a valores de carga viral de $< 100,000$ y $\geq 100,000$ copias/ml, respectivamente. Los valores de ambos índices con respecto a la carga viral ($p=0.027$) y con respecto al grupo control ($p=0.0045$) mostraron diferencias estadísticamente significativas (Figura 21).

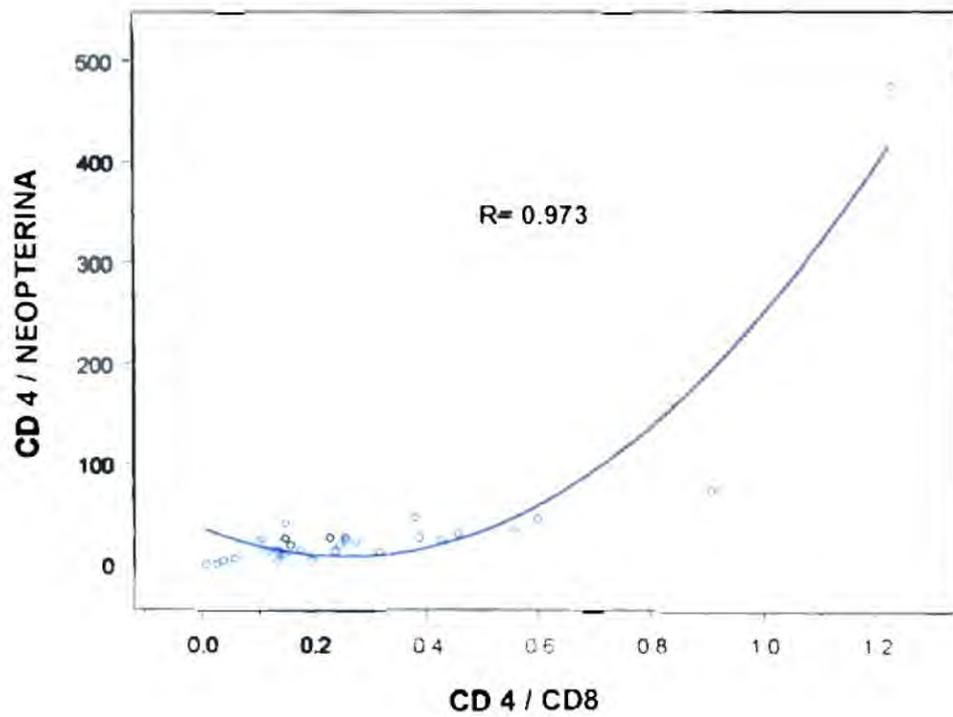


Figura 20. Correlación entre los índices (CD4/NPT y CD4/CD8) en los pacientes con SIDA con tratamiento

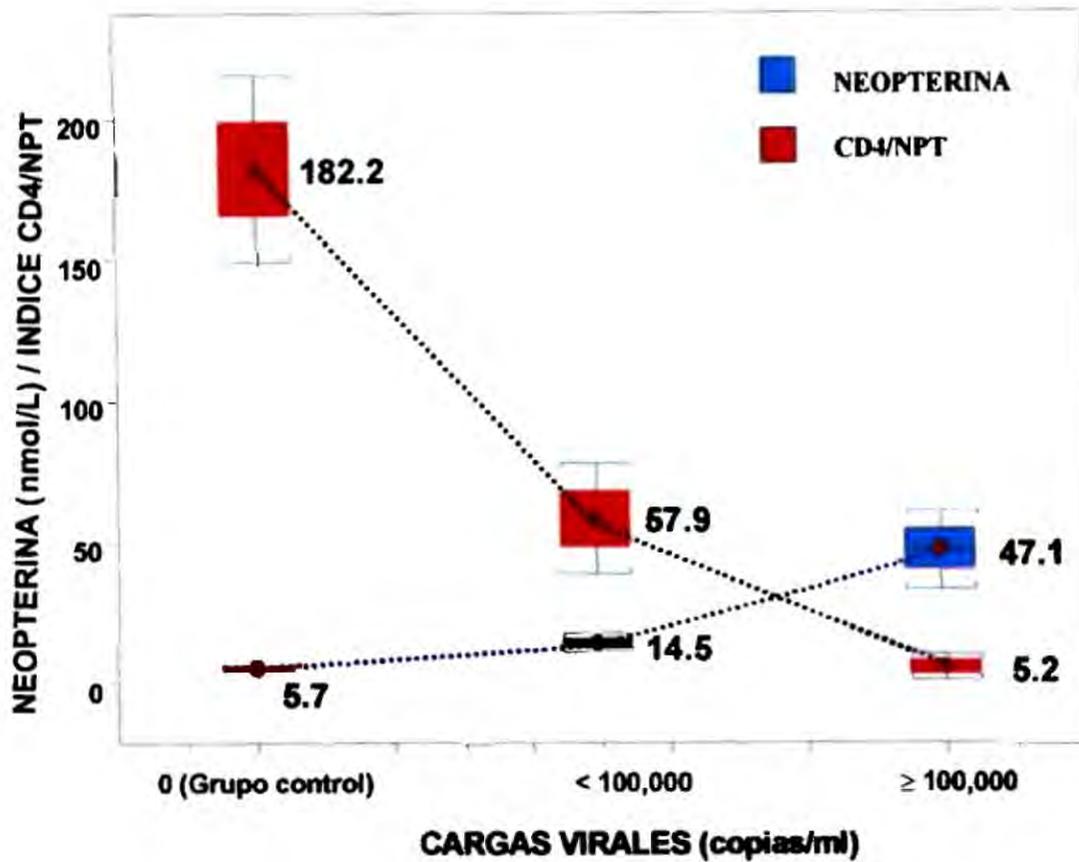


Figura 21. Valores promedios de NPT y CD4/NPT en el grupo control y de acuerdo con la carga viral

DISCUSIÓN

La infección por el VIH involucra interacciones entre el virus y el sistema inmune. Daños en la respuesta inmune han sido ampliamente descritos en estudios previos como los principales factores causales en el desarrollo del SIDA. En nuestro estudio investigamos la probable utilidad de la neopterina plasmática como un marcador adicional de activación inmune en el progreso al SIDA durante la evaluación de pacientes VIH+.

La correlación inversa encontrada entre neopterina y T CD4+ ($r=-0.485$) en nuestro estudio concuerda muy bien con la encontrada por Immanuel et al. (2005) y Fahey et al. (1998), estudios que arrojaron coeficientes de correlación de -0.450 y -0.360 , respectivamente. Nuestros valores apoyan la idea de que la correlación entre neopterina y T CD4+ no es fuerte; sin embargo, Immanuel et al. señalan que la neopterina tiene similar capacidad pronóstica que los T CD4+ aunque ambas representan elementos esenciales diferentes en la patología de la enfermedad. Por su parte, Amirayan-Chevillard et al. (2000) también sostienen que el aumento de neopterina precede incluso a la disminución de los linfocitos T CD4+.

La fuerte correlación obtenida entre el índice CD4/neopterina y el índice CD4/CD8 ($r = 0.973$) en el grupo con SIDA con tratamiento es de suma importancia pues ese es precisamente el grupo que la normativa en nuestro país estipula un mayor número

de determinaciones de carga viral y conteos de T CD4 (tres determinaciones anuales de cada una).

En vista de que estudios previos han demostrado que altas concentraciones de neopterina en los pacientes VIH+ indican incremento en la producción endógena de INF γ y representan altos índices de índices de replicación viral (Wirleitnera et al. en 2005), correlacionamos la neopterina con la carga viral y obtuvimos una correlación ($r = 0.814$) en el grupo sin SIDA sin tratamiento que al compararla con la obtenida por Fahey et al. ($r = 0.500$) en 1998 resultó ser más fuerte. En el 100% de las muestras de los pacientes con cargas virales $\geq 100,000$ copias/ml, las concentraciones de neopterina alcanzaron valores promedios de 47.1 nmol/L en comparación con los valores promedios de neopterina de 14.5 nmol/L cuando las cargas virales fueron $< 100,000$ copias/ml.

Dada la fuerte correlación obtenida entre carga viral por el VIH-1 y neopterina, calculamos el índice CD4/neopterina en el grupo control (182.2) y seguidamente calculamos los índices CD4/neopterina y los relacionamos con la cantidad de carga viral por el VIH-1 ($< 100,000$ y $\geq 100,000$ copias/ml). Nuestros estudios demuestran que índices por el orden de 57.9 (IC de 38.3 - 77.6) corresponden a carga viral $< 100,000$ e índices de 5.2 (IC de 0.63 - 9.8) corresponden a cargas virales $\geq 100,000$ copias/ml. y que los valores de ambos índices con respecto a las cargas virales tuvieron significancia estadística ($p=0.027$). Con respecto al grupo control, también hubo diferencias estadísticamente significativas ($p=0.0045$) en los valores de estos índices. Estos datos son importantes pues frente a un desconocimiento de la cantidad de carga viral en los pacientes VIH+, ya sea por desabastecimiento de reactivos de carga viral por el VIH o si llegase a dar una reducción en el número de sus determinaciones, podemos predecir en

base a nuestros intervalos de confianza posibles rangos de carga viral sin tener que cuantificarla necesariamente.

En nuestro estudio encontramos que el plasma de individuos sanos (grupo control) no contiene concentraciones significativas de neopterina ($5.7 \text{ nmol/L} \pm 0.4$) lo cual coincide con los valores encontrados por Fahey et al. (6.25 nmol/L) en 1998 y, más recientemente, con Wirleitner et al. (5.3 nmol/L) en 2005. Estos últimos investigadores encontraron, además, que 80% de los pacientes VIH+ sin tratamiento permanecen fuera del rango normal de neopterina. En nuestro estudio encontramos que el 94.3 % de esos pacientes permanecen fuera del rango normal y ellos corresponden a aquellos que no reciben tratamiento. Se presentaron valores altos de neopterina en los pacientes infectados por el virus del VIH y la diferencia fue estadísticamente significativa respecto al grupo control en concordancia con los hallazgos de Mildvan et al., (2005).

Se detectaron concentraciones de neopterina aumentados en pacientes VIH+ con cargas virales altas en relación con cargas virales bajas ($p < 0.05$). Hallazgos similares habían sido encontrados en estudios realizados por Amirayan-Chevillard et al. (2000).

El 13.3% los pacientes sin SIDA sin tratamiento presentan valores de neopterina $> 20 \text{ nmol/L}$ y de ellos el 100 % presentan valores de carga viral $100,000 \text{ copias/ml}$. Este hallazgo es importante de considerar pues estudios de seguimiento realizados por Fahey et al (1998) han señalado que altas concentraciones de neopterina indican gran probabilidad de desarrollar SIDA en 3 años dentro de la mayor categoría de carga viral.

Estudios previos han establecido que el tratamiento es un gran supresor de la carga viral y responsable del aumento de los linfocitos T CD4+. Nosotros encontramos

que la diferencia en los valores de carga viral en el grupo con SIDA respecto al tratamiento, fue estadísticamente significativa ($p \leq 0.001$). Estos resultados son consistentes con los datos presentados por Chan et al. (1990) donde demostraron que la carga viral refleja la magnitud de la replicación viral y, por lo tanto, es un indicador sensible de respuesta al tratamiento.

Amirayan-Chevillard et al. (2000) también habían demostrado que la terapia antiretroviral contra el VIH tiene efecto específico y reversible sobre la concentración de neopterina en los pacientes con SIDA. En nuestro estudio encontramos diferencia significativa ($p < 0.0001$) en los valores de neopterina entre los pacientes con SIDA respecto al tratamiento. Un tratamiento prolongado puede incluso normalizar la neopterina, tal como ocurrió en nuestro estudio en el 31.0 % de los pacientes en el grupo de muestras con SIDA con tratamiento. Esto apoya la utilidad de medir la neopterina en la evaluación del efecto de terapia antiretrovirales sobre la respuesta del huésped.

Immanuel et al (2005) y Fahey et al (1998) sostienen que las infecciones coexistentes pueden incrementar la activación inmune y la concentración de esos marcadores en el plasma. En nuestro estudio, los pacientes con SIDA sin tratamiento y que además tenían infección por tuberculosis, presentaron las concentraciones más altas de neopterina (promedio de 93 nmol/L). Sin embargo, dichas infecciones también hacen referencia al pronóstico de la enfermedad ya que ellas contribuyen a incrementar la activación inmune.

CONCLUSIONES

La neopterina tiene una fuerte correlación directa con la carga viral ($r = 0.814$) y una correlación inversa con el CD4+ ($r = -0.485$) en los pacientes sin SIDA sin tratamiento, lo cual sustenta la utilidad de su medición como marcador previo a la terapia en dicho grupo.

El índice CD4/neopterina presentó una fuerte correlación ($r = 0.973$) con el índice CD4/CD8 en el grupo con SIDA con tratamiento, de forma tal que ambos índices pueden ser usados indistintamente.

El índice CD4/neopterina demostró tener valor predictivo en relación con los valores de carga viral por el VIH-1. En el grupo control fue de 182.2 (IC:149.1-215.4), en los pacientes con cargas virales $< 100,000$ copias/ml fue de 57.9 (IC: 38.3 - 77.6) y en pacientes cargas virales $\geq 100,000$ copias/ml fue 5.2 (IC: 0.63 -9.8).

El plasma de individuos sanos (grupo control) no contiene concentraciones significativas de neopterina ($5.7 \text{ nmol/L} \pm 0.4$), encontrándose diferencias estadísticamente significativas en los pacientes infectados por el virus del VIH con respecto al grupo control.

Todos los pacientes con SIDA sin tratamiento permanecen fuera del rango normal de neopterina y con valores elevados.

El 13.3% de los pacientes sin SIDA sin tratamiento presentaron valores de neopterina $> 20 \text{ nmol/L}$ y de ellos el 100% presentan valores de carga viral $> 100,000$ copias/ml, evidenciando con ello el valor pronóstico de la neopterina en esos pacientes.

La neopterinina tiene utilidad práctica en la evaluación del efecto de terapia antiretroviral en los pacientes con SIDA. Hay diferencia significativa ($p < 0.0001$) en las concentraciones promedio de neopterinina dentro del grupo con SIDA respecto al tratamiento e incluso el 31.0% de los pacientes con tratamiento antiretroviral muestran valores de neopterinina dentro del rango normal.

La determinación de neopterinina es confiable, barata y sencilla (no requiere infraestructura especial, equipos costosos o personal altamente entrenado). Tiene utilidad práctica como marcador inmune de valor pronóstico en el monitoreo de la progresión en los pacientes con VIH/SIDA y en respuesta al tratamiento.

Con base en nuestros hallazgos concluimos que una combinación de los valores de neopterinina, el índice CD4/neopterinina y la carga viral son útiles en el seguimiento de los pacientes VIH+.

RECOMENDACIONES

El índice CD4/neopterina puede ser útil como predictor de carga viral $< 100,000$ copias/ml o $\geq 100,000$ copias/ml sin necesariamente tener que cuantificar la carga viral.

Se recomienda la medición de neopterina en la evaluación del efecto de terapia antiretrovirales sobre la respuesta del hospedero, dado su comprobado efecto específico y reversible en estudios previos y por la tendencia observada en el presente estudio a normalizar sus valores .

La determinación de concentraciones muy altas de neopterina pueden ser un indicativo de otras infecciones oportunistas o coexistentes, como por ejemplo la tuberculosis, y con ello ayudar al pronóstico de la enfermedad.

La determinación de neopterina puede reducir el número de determinaciones realizadas de rutina (T CD4+ y/o de carga viral por el VIH) y, por ende, el costo asociado con el monitoreo del status inmune de los pacientes HIV positivos.

Se sugiere que un aumento en la población estudiada apoyaría los resultados encontrados y daría mayor precisión a nuestros hallazgos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABBAS A., LICHTMAN A y POBER J. 2002 Inmunología celular y Molecular. 4^{ta} Ed. McGraw-Hill Interamericana, 577 páginas.

ALTFELD M., ROSENBERG ES., SHANKARAPPA R., MUKHERJEE JS., HECHT FM., ELDRIDGE RL., ADDO MM., POON SH., PHILLIPS MN., ROBBINS GK., SAX PE., BOSWELL S., KAHN JO., BRANDER C., GOULDER PJ., LEVY JA., MULLINS JI. AND WALKER BD. 2001. Cellular immune responses and viral diversity in individuals treated during acute and early HIV-1 infection *J Exp Med* 15 (193)2: 169-80.

AMIRAYAN-CHEVILLARD N., TISSOT-DUPONT H., OBADIA Y., GALLAIS H., MEGE J.L. AND CAPOI C. 2000. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART) and Circulating Markers of Immune Activation: Specific Effect of HAART on Neopterin. *Clin Diagn Lab Immunol* 7 (5): 832-834.

AZIZ N., NISHANIAN P., MITSUYASU D., DETELS R. AND FAHEY J.L. 1999a. Variables That Affect Assays for Plasma Cytokines and Soluble Activation Markers *Clin Diagn Lab Immunol*, 6 (1): 89-95.

AZIZ N., NISHANIAN P., MITSUYASU D., TAYLOR J., MITSUYASU R., JACOBSON J., DEZUBE B., LEDERMAN M., DETELS R. AND FAHEY J. 1999b. Stability of Plasma Levels of Cytokines and Soluble Activation Markers in Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection. *J. Infec Dis* 179 : 843-853.

BALAKRISHNAN P., SOLOMON S., KUMARASAMY N AND MAYER K. 2005. Low-cost monitoring of HIV infected individuals on highly active antiretroviral therapy (HAART) in developing countries. *Indian J. Med. Res.* 121: 345-355

BECK J.M. 2005. The immunocompromised host. HIV infection. *Proc Am Thorac Soc.* 2: 423-427.

BERDOWSKA A. AND ZWIRSKA-KORCZALA K. 2001. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J Clin Pharm Therap.* 26: 319-329.

BERREY MM., SCHACKER T., COLLIER AC., SHEA T., BRODIE SJ., MAYER D., COOMBS R., KRIEGER J., CHUN TW., FAUCI A., SELF S. AND COREY L. 2001. Treatment of primary Human Immunodeficiency Virus type I infection with potent antiretroviral therapy reduce of frequency of rapid progression to AIDS *J. Infec Dis.* 183: 1466-75.

CARMICHAEL A., JIN X., SISSONS P. AND BORYSIEWICZ L. 1993. Quantitative analysis of the Human Immunodeficiency Virus type I (HIV-1)-specific Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: Differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J. Exp. Med.* 177: 249-256

CENTER FOR DISSEASE CONTROL. 1993. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and Adults. *Recommendations and Reports.*

CHAN M.M., CAMPOS J.M., JOSEPHS S. AND RIFAI N. 1990. β 2-Microglobulin and Neopterin: Predictive Markers for Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Infect Child J Clin Microbiol*, 28 (10): 2215-2219.

CHOI JY., SONG YG., PARK YS., ION HJ., KIM MS., KIM YK., SHIN SY. AND KIM JM. 2006. HIV-Specific cellular immune responses are stimulated by structured treatment interruption in chronically HIV-1 infected Koreans *Yonsey Med J*, 47 (2): 282-286.

FAHEY J., TAYLOR J., MANNA B., NISHANIAN P., AZIZ N., GIORGI J., AND DETELS R. 1998a. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements *AIDS*, 12: 1581-1590.

FAHEY J. 1998b. Cytokines, Plasma immune activation markers, and clinically relevant surrogate markers in Human Immunodeficiency Virus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 5 (5): 597-603.

GANESHAN S., DICKOVER R., KORBER B., BRYSON I. AND WOLINSKY S. 1997 Human Immunodeficiency Virus type I genetic evolution in children with different rates of development of disease . *J Virol.* 71 (1): 663-677.

HEL Z., MCGHEE J. AND MESTECKY J. 2006 HIV infection: first battle decides the war . *TRENDS in Immunology*, 27 (6): 274-281.

HOGAN CM. AND HAMMER SM. 2001 Review- Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: Cellular and humoral immune responses . *Ann Inter Med*, 134 (9): 761-776.

HOGAN CM. AND HAMMER SM. 2001 Review- Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: Genetics factors and implications for antiretroviral therapeutics . *Ann Inter Med*, 134 (10): 978-996.

HOSP M., LISSE I.M., QUIGLEY M., MWINGA A.M., GODFREY-FAUSSETT P., PORTER J.D.H., LUO N., POBEE J., WACHTER H., McADAM KPWJ. AND FUCHS D. 2000. An evaluation of low-cost progression markers in HIV-1 seropositive Zambians. *HIV Med*, 1: 125-127.

HUDGES M., JOHNSON V., HIRSCH M., BREMER J., ELBELK T., ERICE A., KURITZKES D., SCOTT W., SPECTOR S., BASGOZ N. FISCHL M. AND D'AGUILA R. 1997. Monitoring plasma HIV-1 ARN levels in addition to CD4+ lymphocyte count improves assessment of antiretroviral therapeutic response. *Ann Intern Med*, 126 (12): 929-938.

IMMANUEL C., VICTOR L., CHELVI K., REHMAN F., ILIAYAS S. AND MINATHAN S. 2005. Serum neopterin levels in HIV infected patients with & without tuberculosis. *Ind Journal Med Res* 121, 220-225.

KIEPIELA, P., SMITH, A.N. AND ROSENBERG E. 2005. Laboratory markers associated with progression of HIV infection. *Best Pract & Research Clin Obst and Gynaecol*. 19 (2): 243-254.

LIU SL., SCHACKER T., MUSEY L., SHRINER D., McELRATH MJ., COREY L. AND MULLINS J. 1997 Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: Human Immunodeficiency Virus type I evolution and antiviral responses. *J Virol* 71 (6): 4284-4295.

MARMOR M., HERTZMARK K., THOMAS S.M., HALKITIS P.N. AND VOGLER M. 2006. HIV perspectives after 25 years. Resistance to HIV infection *Journal of Urban Health: Bulletin of the New York Academy of Medicine* 83 (1): 5-17.

MILDVAN D., SPRITZLER J., GROSSBERG S.E., FAHEY J., JOHNSTON D.M., SCHOCK B.R. AND KAGAN J. 2005. Serum Neopterin, an Immune Activation Marker, Independently Predicts Disease Progression in Advanced HIV-1 Infection *HIV/AIDS* 40 (15): 853-858.

MINSA 2002. Guía de atención integral para personas viviendo con VIH/SIDA VII. Capítulo: Tratamiento antiretroviral. Ministerio de Salud, Dirección General de Salud y Programa Nacional de ITS/VIH/SIDA 1: 43-67.

MURR C., WIDNER B., WIRLEITNER B. AND FUCHS D. 2002. Neopterin as marker for immune system activation *Current Drug Metabolism* 3 (2): 175-187.

NEVES I. AND MORGADO MG. 2000. Immunological evaluation of Human Immunodeficiency Virus infected individuals by flow cytometry *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 95 (3): 393-400

ONUSIDA. 2006. Informe sobre la epidemia mundial de SIDA. Edición especial con motivo del décimo aniversario del ONUSIDA.

ORTIGAO DE SAMPAIO M.B., ABREU T.F., LINHARES DE CARVALHO M.I., PONCE DE LEON A. AND CASTELLO BRANCO L.R.R. 1999. Surrogate Markers of

disease progression in HIV infected Children in Rio de Janeiro, Brazil *Journal of Trop Pediatrics*, 45: 299-302.

PASCALE J.M., DIAZ M., CONTRERAS P., GOMEZ B., LOZANO L., AUSTIN E., DE MARTÍN M., GREGORY R., MCLAUGHLIN G. AND AMADOR A. Immunological Markers of Disease Progression in Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus. 1997. *Clin Diagn Lab Immunol* 4 (4): 474-477.

PLAEGER S., BASS H., NISHANIAN P., THOMAS J., AZIZ N., DETELS R., KING J., CUMBERLAND W., KEMENY M AND FAHEY J. 1999. The Prognostic Significance in HIV infection of Immune Activation Represented by Cell Surface Antigen and Plasma Activation Marker Changes. *Clin Immunol*, 90 (2): 238-246.

PORTELA MC. AND SIMPSON KN. 1997. Markers, cofactors and staging systems in the study of HIV disease progression: A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 92 (4): 437-457.

SACK U., BURKHARDT U., BORTE M., SCHADLICH H., BERG K AND EMMRICH F. 1998. Age-Dependent Levels of Select Immunological Mediators in Sera of Healthy Children *Clin Diagn Lab Immunol* 5 (1): 28-32.

SATOH T., BROWN L.M., BLATTNER W., MALONEY E., KURMAN C., NELSON D., FUCHS D., WACHTER H. AND TOLLERUD D. 1998. Serum Neopterin, β_2 -Microglobulin, Soluble Interleukin-2- Receptors, and Immunoglobulin Levels in Healthy Adolescents. *Clin Immunol Immunopathol.* 88 (2): 176-182.

SAVE'S M., MORLAT P., CHE'NE G., PEUCHANT E., PELLEGRIN I., BONNET S.F., BERNARD N., LACOSTE D., SALAMON R. y BEYLOT J. 2001 Prognostic value of plasma markers of immune activation in patients with advanced HIV disease treated by combination antiretroviral therapy. *Clin Immunol.* 99 (3): 347-352.

SCHENNACH H., MURR C., GACHTER E., MAYERSBACH P., SCHONIYTZER D. AND FUCHS D. 2002. Factors influencing serum neopterin concentrations in a population of blood donors. *Clin Chem.* 48 (4): 643-645.

SMITH D.E., WALKER BD., COOPER DA., ROSENBERG E.S. AND KALDOR JM. 2004. Is antiretroviral treatment of primary HIV infection clinically justified on the basis of current evidence? *AIDS.* 18: 709-18.

SUED O., MIRO J., ALQUEZAR A., CLARAMONTE X., GARCIA F., PLANA M., ARNEDO M., LAZZARI E., GIL C., MANZARDO C., BLANCO J., MARTINEZ E., MALLOLAS J., JOSEPH J., PUMAROLA T., GALLART T. AND GATELL J., 2006. Primary human immunodeficiency virus type I infection: Clinical, virological and immunological characteristics of 75 patients (1997-2003). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 24 (4): 238-44.

TSOUKAS CM AND BERNARD NF. 1994. Markers predicting progression of human immunodeficiency virus-related disease. *Clin Microbiol Rev* 7 (1): 14-28.

WANG WK., CHEN MY., CHUANG CY., JEANG KT AND HUANG LM. 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J. Microbiol Immunol Infect.* 33: 131-140.

WIRLEITNER B., SCHROECKSNADELA K., WINKLERB C. AND FUCHSA D. 2005. Review Neopterin in HIV-1 infection. *Mol Immunol.* 42: 183-194.

ANEXOS

