



UNIVERSIDAD POPULAR AUTONOMA DEL ESTADO DE PUEBLA

LABORATORIOS CLINICOS DE PUEBLA

**ENUMERACIÓN DE CÉLULAS CD3+,CD4+,CD25+ EN
PACIENTES CON VIH/SIDA**

TRABAJO DE TESIS QUE PRESENTA:

LETICIA AGUILAR ROMERO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA

DIRECTOR

DR. ALEJANDRO RUIZ ARGÜELLES



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyła**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES.....	2
VIH.....	6
Estructura y genes del VIH.....	6
AUTOINMUNIDAD EN EL SIDA.....	9
LINFOCITOS CD4+	11
CÉLULAS T REGULADORAS.....	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	14
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	14
MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
Pacientes y controles.....	15
Enumeración de los antígenos CD3+,CD4+,CD25+.....	15
Análisis citofluorométrico.....	16
Cuantificación de la carga viral por NASBA.....	19
Aislamiento del ácido nucleico.....	19
Amplificación del ácido nucleico.....	19
Detección del ácido nucleico.....	22

Análisis estadístico.....	23
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN.....	27
AGRADECIMIENTOS.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30

RESUMEN

Se han realizado múltiples estudios de las células T reguladoras (T_{reg} = CD3+,CD4+,CD25+) por el rol que pueden desempeñar en la autoinmunidad. Los pacientes con VIH/SIDA cursan con manifestaciones autoinmunes de los que esta población celular podría ser responsable.

Se estudiaron 70 pacientes VIH/SIDA y 17 sujetos con anticuerpos anti VIH-1 y 2 negativos como controles, en los que mediante citometría de flujo se estudiaron las poblaciones celulares CD3+CD4+, CD3+CD4+CD25+ y CD3+CD25+ y se analizó su asociación con la carga viral de los pacientes. Se encontró una evidente disminución de todas estas poblaciones celulares en los pacientes con VIH/SIDA, pero no hubo correlación significativa entre la disminución de las células T_{reg} y la carga viral. Sí se confirmó la correlación inversa entre el total de células CD4+ con la carga viral, y una correlación directa entre el total de las células T CD4+ y células T_{reg} .

1. INTRODUCCION

Los linfocitos T_{reg} expresan en su membrana los antígenos CD3+CD4+CD25+; están involucrados en suprimir la producción de anticuerpos por parte de las células B, y en la prevención del desarrollo de enfermedades autoinmunes. Los pacientes con VIH/SIDA cursan con destrucción principalmente de las células T cooperadoras, lo que predispone al paciente a desarrollar inmunodeficiencia, que se manifiesta principalmente por infecciones oportunistas. Adicionalmente, los pacientes con VIH/SIDA tienen manifestaciones autoinmunes, en las que la disminución de las células T_{reg} podría jugar algún papel.

2. ANTECEDENTES

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH-1) es en la actualidad una enfermedad que ha transformado al mundo, se considera como un problema de vasta importancia y ha captado el interés en su investigación de destacados científicos del mundo. Esta enfermedad (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida) es un desastre pandémico que, en comparación con los desastres que el mundo ha sufrido, amenaza la esencia de la mayoría de los aspectos productivos de nuestra sociedad. [1]

Los primeros casos reportados de la infección con el VIH-1, fueron identificados en la ciudad de Kinshasa en la República Democrática del Congo en 1959. La fuente más probable de infección humana por el VIH es la introducción del virus de inmunodeficiencia del simio (VIS). [2] de los chimpancés (*Pan trogloditas* y *Cercocebus atys*).[3].

En 1984, investigadores del instituto Pasteur aislaron un retrovirus de un individuo con linfadenopatía generalizada. Posteriormente los investigadores del instituto Nacional de Cancerología de los E.U.A. y de la universidad de California en San Francisco, reportaron hallazgos similares. Por consenso este virus fue nombrado virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1). [4].

En 1986 un segundo retrovirus conocido como VIH-2 fue aislado en pacientes con SIDA del oeste de África, el cual comparte un 40-60% de homología con el VIH-1.[5] A pesar de que el HIV-1 y HIV-2 parecen haber entrado en la población humana hace muchas décadas, el VIH-1 es mucho más virulento que VIH-2. [2].

A veinte años de la descripción del padecimiento, este se ha convertido en la epidemia más devastadora a la que se ha enfrentado la especie humana. Desde su inicio, más de 60 millones de personas se han infectado por el virus que la causa. En la actualidad es la primera causa de muerte en África subsahariana, y la cuarta en el ámbito mundial.[6].

A finales del año 2002, se estimaba que había cerca de 45 millones de personas viviendo con el VIH. En muchos países en vías de desarrollo, la mayoría de nuevas infecciones ocurren en adultos jóvenes, con aumento creciente de la prevalencia en mujeres. Aproximadamente una tercera parte de las personas que actualmente están infectadas por el VIH tienen entre 15 y 24 años de edad, y la mayoría de ellas lo ignoran. [6].

El SIDA es una inmunodeficiencia que afecta principalmente a los linfocitos cooperadores o de ayuda, que se identifican por expresar los antígenos CD3 y CD4, cuyas cifras disminuyen porque progresivamente se destruyen durante la evolución de la enfermedad; los mecanismos de la destrucción de las células CD3+CD4+ por la infección viral parecen ser múltiples: 1) por efecto citopático directo, 2) por formación de sincicios, 3) por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de las células infectadas en un intento de eliminar la infección y 4) por apoptosis mediada por mecanismos no bien definidos por productos de las células CD8. [6].

La habilidad del VIH de producir efecto citopático en las células CD4+, es la causa fundamental de la marcada inmunodeficiencia clínicamente manifestada como SIDA. A pesar de los esfuerzos considerables de la investigación, el mecanismo preciso (o mecanismos) por el cual HIV-1 extermina a las células CD4 permanece incierto. Otros mecanismos de citopaticidad inducidos por el VIH-1 incluyen la alta replicación viral asociada a daño en la membrana, acumulo de DNA no integrado del VIH-1, alteración de la producción de segundos mensajeros y cambios en la permeabilidad de la membrana, además de la destrucción autoinmune de las células T infectadas con VIH-1 por respuesta dependiente de anticuerpos y mediada por células T citotóxicas.[7].

Es característico de este síndrome que la respuesta humoral este dañada por una depleción de células CD4+ y por activación policlonal de linfocitos B. Hay una producción anormal o deficiente de anticuerpos que es manifestada por susceptibilidad aumentada a las infecciones, respuestas humorales inadecuadas a ciertas vacunas y producción de anticuerpos inusuales; otros componentes del sistema inmune que son afectados por el VIH incluyen las células NK (del inglés Natural Killer) o asesinas naturales y los macrófagos.[8].

A medida que desaparecen las células T de memoria preexistentes (o se vuelven anérgicas), una persona con la infección por VIH no puede generar respuestas inmunes secundarias eficaces contra patógenos, lo que ocasiona incapacidad para generar cualquier respuesta eficiente de células T o inmunodeficiencia. [9].

En la actualidad se desconocen las implicaciones exactas del mecanismo de homeostasis sobre la progresión descendente de las células T CD4+ en la enfermedad por VIH-1, pero los nuevos conocimientos acerca de la alta tasa de recambio de células T CD4+ han descubierto la naturaleza dinámica de la respuesta inmune contra VIH e incrementan la necesidad de comprender como se regula esta respuesta. [9].

No se conoce en detalle si la destrucción de las células CD4 afecta por igual a todos sus compartimentos especialmente a las células T_{reg} (CD4+, CD25+). Es esperable que si existe destrucción de las células T_{reg} como parte del proceso de destrucción de todas las células T CD4+, su disminución en cifras absolutas podría estar involucrada en el desarrollo de las manifestaciones de autoinmunidad que caracterizan a la infección por VIH.

Debido a la historia natural de la enfermedad, que indica que pueden transcurrir hasta 20 años entre la infección por el VIH y el diagnóstico de SIDA, aún sin terapia antirretroviral y profiláctica, a la presencia de sintomatología en forma temprana no diagnosticada como SIDA; a la carga psicológica de conocerse seropositivo y al período de sobrevivencia de cuatro años en promedio una vez diagnosticado como paciente con SIDA, la carga de la enfermedad correspondiente al VIH/SIDA debe medirse no solo como mortalidad, sino con un componente que mida morbilidad y discapacidad.[10].

VIH

Es un miembro de la familia *lentivirus* de los retrovirus animales.[5]. Los miembros de la familia *Retroviridae* se pueden definir como aquellos que presentan genoma diploide de RNA y una enzima con actividad de polimerasa de DNA dependiente de RNA; y cuya duplicación depende de un intermediario de DNA. [9].

Se han identificado dos tipos íntimamente relacionados de VIH, el VIH-1 y el VIH-2. El tipo 1 es la causa más frecuente del SIDA, aunque el tipo 2 que difiere del primero en su estructura genómica y en su antigenicidad, produce un síndrome clínico similar.[11].

Estructura y genes del VIH

La partícula infecciosa del VIH está formada por dos cadenas idénticas de ARN empaquetadas en un núcleo de proteínas víricas y rodeadas por una envoltura de fosfolípidos en forma de bicapa procedente de la membrana de la célula huésped, pero que incluye también proteínas de membrana codificadas por el virus (figura 1). El genoma ARN del VIH tiene una longitud aproximada de 9.2 kb y una organización básica de las secuencias del ácido nucleico que es característica de todos los retrovirus conocidos. Las repeticiones terminales largas (RTL) en los dos extremos del genoma regulan la integración del virus en el genoma del huésped, la expresión de los genes y la replicación del virus. Las secuencias *gag* codifican proteínas estructurales nucleares, mientras que las *env* codifican las nucleoproteínas gp 120 y gp 41 de la envoltura necesarias para la infección de las células.

Las secuencias *pol* codifican la transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa del virus, todas ellas esenciales para su replicación. Además de estos genes típicos de los retrovirus, el VIH-1 posee asimismo otros seis genes reguladores, *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr* y *vpu*, cuyos productos regulan la reproducción vírica de varias formas.(figura 2) [11].

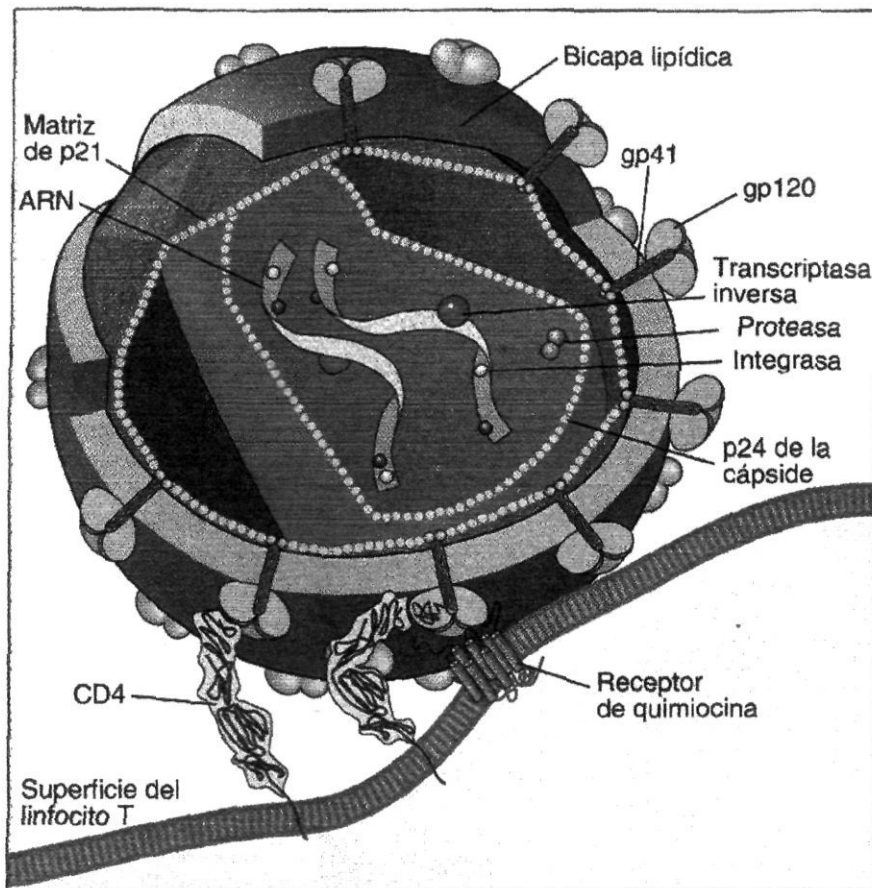
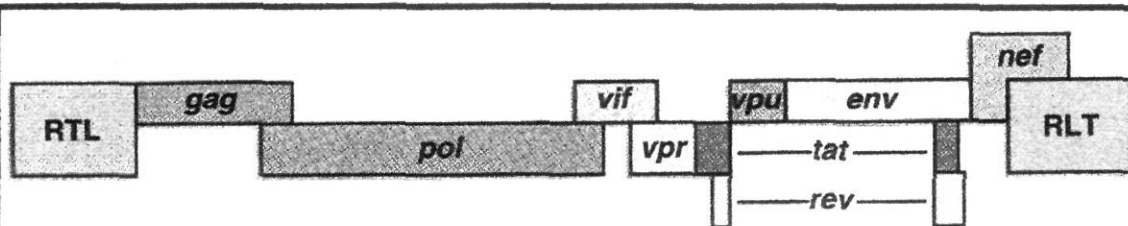


Figura 1.- Estructura del VIH-1 [11]



RTL .- Integración del ADN vírico en el genoma de la célula huésped; lugar de unión de los factores de transcripción del huésped.

gag.- Proteínas del centro de la nucleocápside y de la matriz

pol.- Transcriptasa inversa, proteasa, integrasa y ribonucleasa

env.- Proteínas de la cubierta vírica (gp120 y gp41) que intervienen en la unión con CD4 y el receptor de quimiocina y la fusión a la membrana

vif.- Potencia la infecciosidad de las partículas víricas

vpr.- Favorece la importación del ADN vírico al núcleo; detención del ciclo celular en G2

tat.- Necesario para el alargamiento de los productos de transcripción víricos

rev.- Favorece la salida del ARN vírico no procesado o incompletamente procesado desde el núcleo

vpu.- Reduce la expresión de CD4 en la célula huésped y potencia la liberación de virus a partir de las células

nef.- Reduce la expresión de CD4 en la célula huésped y potencia la liberación del virus a partir de las células, reduce la expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase I de la célula huésped

Figura 2

Genoma del VIH-1.- Ciertos genes utilizan algunas de las mismas secuencias que otros, como demuestra la superposición de los bloques, pero la ARN polimerasa de la célula huésped los lee de manera diferenciada. De igual forma los bloques compartidos divididos por líneas indican genes cuyas secuencias de codificación están separadas en el genoma y que requieren el procesamiento del ARN para producir un ARN mensajero funcional. RTL repeticiones terminales largas. [11].

AUTOINMUNIDAD EN EL SIDA

Se ha encontrado en el suero de los pacientes con SIDA un incremento de los niveles de autoanticuerpos.[12] Estos autoanticuerpos son típicamente IgM, los cuales generalmente no son patogénicos. Probablemente se deben a una manifestación de activación policlonal por una infección crónica. El mecanismo de la activación policlonal de las células B en el SIDA no es claro. Este puede ser un signo de la disminución de la Inmunorregulación debido a la falta de células TCD4+ o por el efecto que causa el VIH sobre la célula B. No hay una evidencia convincente de que autoanticuerpos plaquetarios sean la causa de la común trombocitopenia en los pacientes con SIDA. [13]. Karpatkin encontró complejos que consisten en autoanticuerpos contra anticuerpos anti -VIH que se absorben en la superficie plaquetaria. Se ha encontrado en una gran proporción de pacientes con SIDA un autoanticuerpo IgG contra el CD43, la cual es una sialoglicoproteína de membrana presente en las células hematopoyéticas.[14]. El CD43 induce cambios de glicosilación durante la maduración de la célula T. El CD43 de la célula T inmadura es mucho más glicosilado que el de la célula T madura. Este autoanticuerpo se ha encontrado unido a superficies de células T en la sangre de pacientes con SIDA; más aún, hay una correlación negativa entre la presencia del autoanticuerpo anti CD43 y el número de células T CD4+ en los pacientes con SIDA, esto es: alto nivel de autoanticuerpos y cuenta baja de células T CD4+. Estos datos aumentan la posibilidad de que hay un ataque autoinmune contra células T que contribuye a la deficiencia de células T CD4+ en el SIDA. [15].

LINFOCITOS CD4+

Los precursores linfoides se originan en la médula ósea y se programan para realizar funciones específicas en los órganos primarios: en el microambiente del timo se diferencian los linfocitos T y en la médula ósea los linfocitos B. En el proceso de maduración, las células tímicas adquieren y pierden ciertos determinantes de membrana que pueden ser reconocidos por diversos anticuerpos monoclonales. En la figura 3 se muestra las etapas de diferenciación de los linfocitos T. La mayoría de los sujetos sanos tienen más de 500 células CD4 por cada microlitro de sangre (μL); en cambio, los individuos con SIDA a menudo tienen 200 o menos de estas células CD4 por cada μL de sangre.[16][17].

La cuenta absoluta de linfocitos CD4+ se basa en dos pruebas independientes: a) la biometría hemática, de donde se obtiene la cuenta total de glóbulos blancos en sangre periférica y el porcentaje de linfocitos totales y, b) el porcentaje de células CD4+. Tanto el número de linfocitos totales, como el número absoluto de linfocitos CD4 positivos son cálculos hechos con las mediciones mencionadas anteriormente.[18][19][20].

CÉLULAS T REGULADORAS (T_{reg})

Diversos estudios indican que los linfocitos reguladores de los seres humanos son linfocitos T CD4+ que expresan una concentración elevada de la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25), pero no otros marcadores de activación. Los linfocitos T reguladores pueden generarse tras el reconocimiento de autoantígenos en el timo o en los órganos linfáticos periféricos, pero no se conocen las condiciones especiales por las que la exposición al antígeno genera estas células. La IL-2 puede desempeñar alguna función en el desarrollo o función de los linfocitos T reguladores, de forma que una carencia de IL-2 o de su receptor puede provocar defectos en los linfocitos reguladores. Estos defectos pueden contribuir a la autoinmunidad observada en los ratones que carecen de IL-2 o de su receptor. Presumiblemente, los linfocitos T reguladores reconocen autoantígenos, pero esta especificidad no está bien definida. [21]. Tienen un rol crítico en la inmunotolerancia y en el control de la autoinmunidad. [22].

Algunos estudios indican que los linfocitos T reguladores inhiben las respuestas inmunitarias secretando citocinas inmunodepresoras, tales como IL-10 y factor transformador del crecimiento beta (TGF- β) el cual es un inhibidor de la proliferación de los linfocitos T y B, mientras que IL-10, que se sintetiza en los linfocitos T cooperadores (y otras células), inhibe la activación de los macrófagos y antagoniza la acción de la principal citocina activadora de los macrófagos, el interferón gama (IFN)- γ . Por lo tanto, los linfocitos T que secretan estas citocinas pueden suprimir las respuestas de otros linfocitos T. Otros estudios señalan que los linfocitos T reguladores actúan mediante la interacción directa con las células presentadoras de antígeno o linfocitos T efectoras y no mediante la secreción de citocinas. [11]. Se ha demostrado que la función de las células T reguladoras requiere de su activación por la vía del receptor de células T o TCR (del inglés T cell receptor) in vitro. [21][23].

Estudios en animales definen a las células T CD4+CD25+ como un compartimiento que protege contra la inflamación de origen autoinmune [24] y son atraídas a estos sitios para regular o prevenir la enfermedad. [25].

También se han propuesto como el regulador principal de la autotolerancia y la del trasplante. [26]. Se ha visto que la tolerancia de las células T a los antígenos propios es en parte inducida en el timo por la apoptosis o anergia de timocitos potencialmente autorreactivos. Algunas células T autorreactivas nunca migran a los órganos linfoides periféricos porque son controlados por la población de células T CD4+CD25+. Estas células inhiben mejor la autoinmunidad que las respuestas comunes específicas de antígenos no propios. Esta población es probablemente autoespecífica. [27].

La falla en el mantenimiento y función de células T reguladoras predispone a desarrollar enfermedades autoinmunes [28] [29]. Se ha encontrado un decremento de las células T_{reg} en pacientes con vitiligo no segmentario [30], así como menor cantidad de ellas en enfermedades autoinmunes como la alopecia areata. [31]. Hay evidencia de la supresión activa de la autoreactividad por las T_{reg}, las cuales son un potente inhibidor de la activación de las células T in vivo e in vitro.[32].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los pacientes con SIDA hay fenómenos de autoinmunidad. Si la disminución de las células T CD4+ comprende asimismo la disminución del compartimento CD4+CD25+ (T_{reg}), este fenómeno podría estar involucrado en el desarrollo de manifestaciones autoinmunes. Si la disminución de células T_{reg} fuese consecuencia de la progresión de la infección, su número debería ser inversamente proporcional a la carga viral.

4. HIPÓTESIS

Las células CD3+ CD4+ CD25+ se encuentran disminuidas en número en pacientes con VIH y guarda relación inversamente proporcional a la carga viral.

5. OBJETIVOS

- 1.-** Cuantificar las células CD3+ CD4+ CD25+ en pacientes con VIH
- 2.-** Comparar el número de células CD3+ CD4+ CD25+ con el de sujetos normales .
- 3.-** Analizar si existe correlación entre el número de células CD3+ CD4+ CD25+ y la carga viral.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Pacientes y controles

Se incluyeron 70 pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana confirmado por medio de la determinación de anticuerpos contra VIH1,2, a los cuales se les cuantificó su carga viral. Se tomaron muestras de 17 sujetos con determinación de anticuerpos anti-VIH 1,2 negativo como controles.

6.2 Enumeración de células CD3+ CD4+ CD25 +

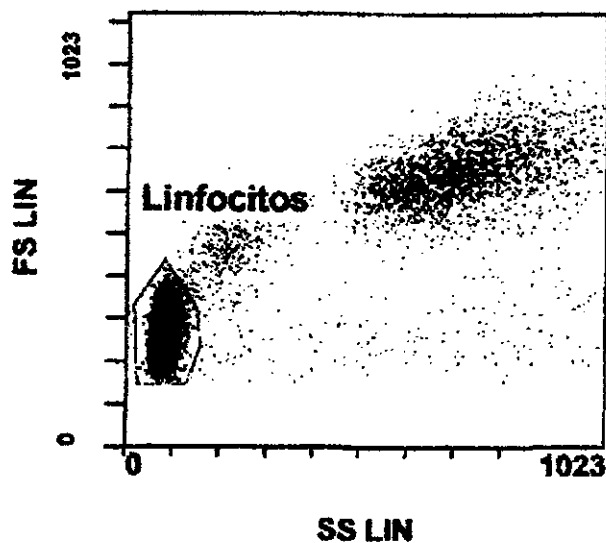
De las muestras venosas previamente obtenidas con EDTA_{K3} se tomaron 50 μ L de sangre. En un mismo tubo de polipropileno la muestra de sangre se incubó a temperatura ambiente con anticuerpos monoclonales de la marca Beckman Coulter[®], anti CD3+, anti CD4+, Anti CD25+ conjugados con los fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FICT), ficoeritrina (PE) Y proteína peridinin clorofila (PerCP). Luego de 20 minutos de incubación se lisaron los eritrocitos de la muestra mediante un estuche "ImmunoPrep[®]" (Beckman Coulter[®]), utilizando una estación de trabajo Coulter "Q-Prep", que consta de: Agente lítico, estabilizador de leucocitos y soluciones amortiguadoras, todo en un ciclo de 35 segundos. La excitación de los fluorocromos se llevó a cabo en una longitud de onda de 488 nm y la emisión fue detectada a 525 (FICT), 575 (PE) Y 675 (PerCP) nm.

6.3 Análisis citofluorométrico

Se realizó en un Citómetro Beckman Coulter® EPICS Elite ESP o en EPICS XL MCL (Coulter®), mediante el programa EXPO V.2. se construyeron histogramas biparamétricos para diferenciar a las poblaciones celulares.

Se construyó un histograma biparamétrico de FS y SS se definieron las poblaciones celulares presentes en la muestra. Creando una ventana electrónica se seleccionaron a las células mononucleares. Una vez establecida la población a estudiar se construyeron histogramas biparamétricos logarítmicos de diferentes fluorescencias para analizar la intensidad y el patrón de coexpresión de los antígenos marcados con los anticuerpos monoclonales conjugados con fluorocromos detectados en las longitudes de onda antes mencionadas. Se evaluó la expresión simultánea de los antígenos CD3+ con CD4+, CD4+ con CD25+ y CD3+ con CD25+ (figuras 4 y 5) y se tomaron los porcentajes correspondientes de cada coexpresión de antígenos reportados por el citómetro, para luego calcular los porcentajes y valores absolutos de cada población celular en estudio, con la cuenta total de leucocitos y el porcentaje de linfocitos realizados en un contador electrónico de hematología (HMx, Coulter®).

[Ungated] SS Lin/FS Lin - ADC



[Linfocitos] FL2 Log/FL1 Log - ADC

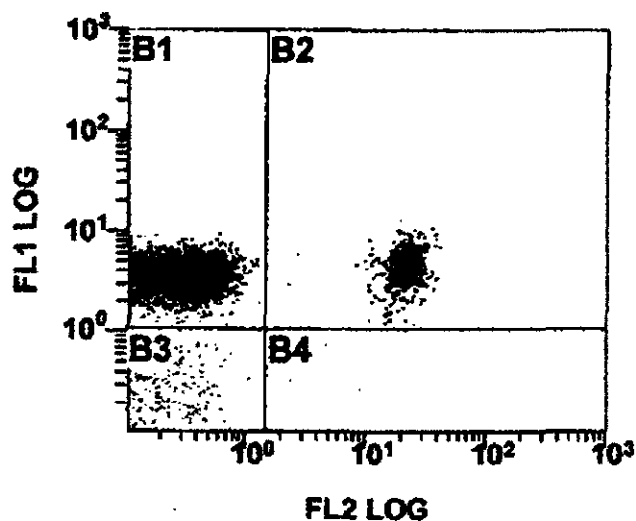


Figura 4

Histogramas biparamétricos. Arriba: población de células mononucleares en ventana electrónica por tamaño (eje de las X) y textura, (eje de las Y). Abajo: Se busca la expresión simultánea de los antígenos CD3+(FL1) y CD4+(FL2), la cual se observa en B2.

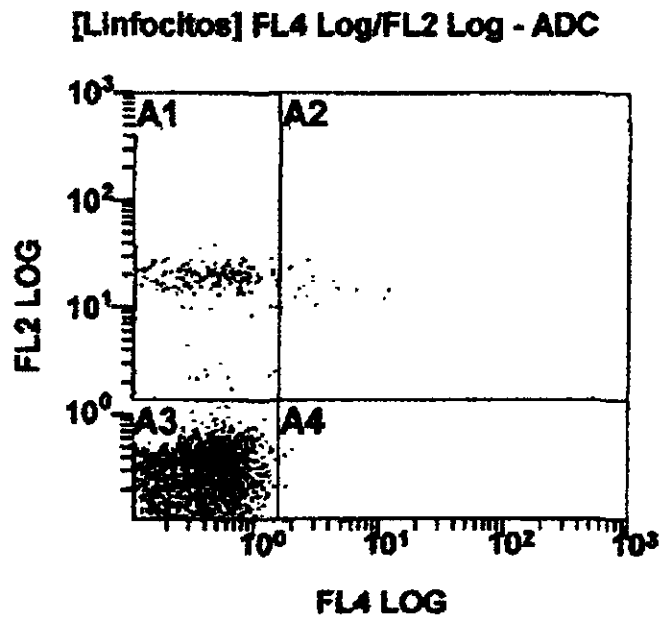
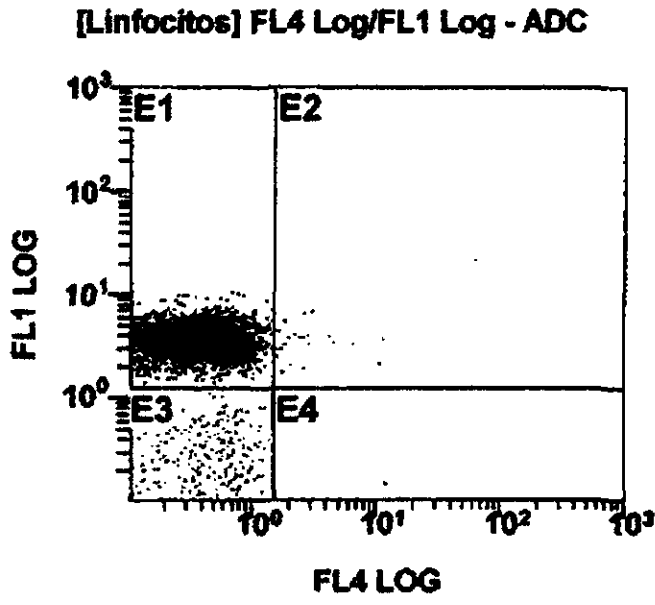


Figura 5

Histogramas biparamétricos: Arriba: E2: población celular que expresa simultáneamente los antígenos CD3+(FL1) y CD25+(FL4). Abajo: A2: población celular que expresa los antígenos CD4+(FL2) y CD25+(FL4).

6.4 CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL POR NASBA (Nucleic Acid Sequence Base Amplification)

6.4.1 Aislamiento de ácido nucleico

Se añaden tres ARN (Ácido Ribonucleico) sintéticos (Qa,Qb,Qc) de una elevada concentración conocida, alta, media y baja, respectivamente, al tampón de lisis que contiene el ácido nucleico liberado a partir de la muestra. Estos ARN actúan de calibradores internos y cada uno se distingue del tipo salvaje (WT, del inglés "wild type") del ARN del VIH-1 por una pequeña secuencia. En condiciones de salinidad elevada, todos los ácidos nucleicos del tampón, incluyendo los calibradores, se unen a partículas de dióxido de silicio. [33] Dichas partículas, que actúan como la fase sólida, se lavan varias veces. Finalmente el ácido nucleico se eluye de la fase sólida.

6.4.2 Amplificación del ácido nucleico

Cualquier ARN del VIH-1 WT se convierte en una molécula de ADN de doble cadena mediante la acción concertada de tres enzimas y dos oligonucleótidos. [34]. Uno de estos oligonucleótidos contiene una secuencia promotora de polimerasa T7 ARN 5' -terminal además de una sección de nucleótidos complementaria a una secuencia de ARN del VIH-1 WT. El segundo oligonucleótido incluye una breve secuencia que es idéntica a un segmento del ARN y que se halla más arriba de la región en la que el oligonucleótido que contiene el promotor T7 puede reasociarse.

Juntos, estos oligonucleótidos definen la secuencia de la región gag del VIH-1 que se convierte en un producto intermedio de ADN con un promotor T7 funcional. Este proceso se inicia con la hibridación del oligonucleótido que contiene el sitio de unión de la ARN polimerasa T7 al ARN diana (Cebador 1).

La transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT) alarga el oligonucleótido, creando una copia de ADNc de la plantilla de ARN y formando un híbrido ARN/ADN. La porción de ARN de este híbrido es hidrolizada por ARNasa H, quedando ADN de cadena sencilla al cual puede reasociarse el segundo oligonucleótido (cebador 2; Figura 5), formándose así de nuevo sustrato adecuado para la extensión por la transcriptasa inversa. Dicha extensión finalmente revela un producto intermediario de ADN de doble cadena con una porción promotora T7 transcripcionalmente activa.

Al reconocer el ahora promotor funcional, la ARN polimerasa T7 produce múltiples copias de fragmentos transcritos de ARN de sentido contrario a la secuencia de ARN blanco original. Cada molécula de ARN de sentido contrario recién sintetizada puede actuar como una plantilla por sí misma y convertirse de nuevo en producto intermedio de ADN con un promotor T7 funcional de modo similar al ARN diana original, salvo que los cebadores de oligonucleótido se reasocian en orden inverso porque las moléculas de ARN recién generadas presentan una orientación contraria a la blanco original y el producto intermedio de ADN resultante es de doble cadena sólo parcialmente. De nuevo, se generan muchas copias de ARN a partir de cada ARN blanco que se reincorpora a la reacción lo que supone una síntesis exponencial de productos de ARN.

Esta reacción se esquematiza en la figura 6 .

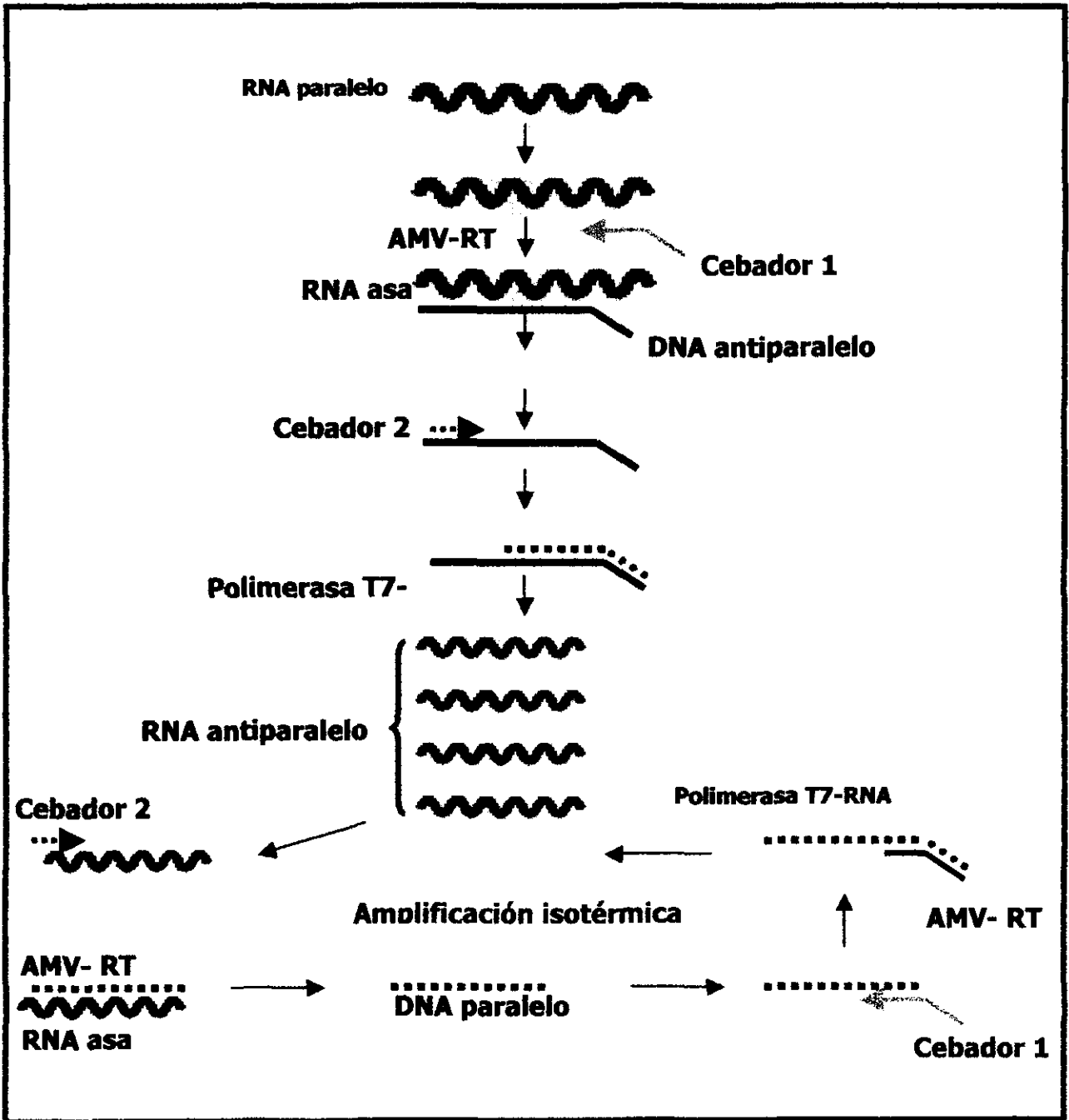


Figura 6. Principio de amplificación de NASBA

6.4.3 Detección del ácido nucleico

Tras la amplificación basada en NASBA, los amplicones derivados del ARN de VIH-1 de cadena simple pueden detectarse mediante un procedimiento de hibridación de ácido nucleico empleando el principio de electroquimioluminiscencia (ECL). [35,36] Los amplicones son capturados por hibridación en un oligonucleótido inmovilizado en partículas paramagnéticas (oligobeads). Para distinguir los amplicones derivados del ARN del VIH-1 (WT) y los calibradores(Qa,Qb, Qc) ARNs se añaden alícuotas de la reacción de amplificación a cuatro soluciones de hibridación que, además de los oligobeads, contienen una sonda de oligonucleótido marcado con rutenio quelado específica del ARN WT, ARN Qa, ARN Qb, o ARN Qc.

La detección se realiza añadiendo tripropilamina (TPA) como sustrato a las mezclas de reacción de hibridación seguida de un análisis automático con un lector NucliSens®. En la cámara de detección del instrumento, las partículas paramagnéticas que llevan los complejos amplicón/sonda quedan capturados en la superficie de un electrodo mediante un imán. Al aplicar voltaje a dicho electrodo se estimula la reacción de ECL en la que se produce luz por oxidación-reducción cíclica de ión metálico de rutenio en presencia de TPA.

El lector NucliSens® registra los resultados como valores ECL. Los cálculos basados en cantidades relativas de los cuatro amplicones revelan la cantidad original de ARN del VIH-1 WT presente en la muestra.

6.5 Análisis estadístico

La diferencia entre las medias aritméticas de las cuentas relativas y absolutas de las células de los controles y los pacientes, se determinó por la prueba de t de Student (valor de p). La correlación entre la carga viral con la cuenta absoluta de células CD3+ CD4+, CD4+ CD25+ y CD3+ CD25+ se realizó mediante el análisis de correlación.

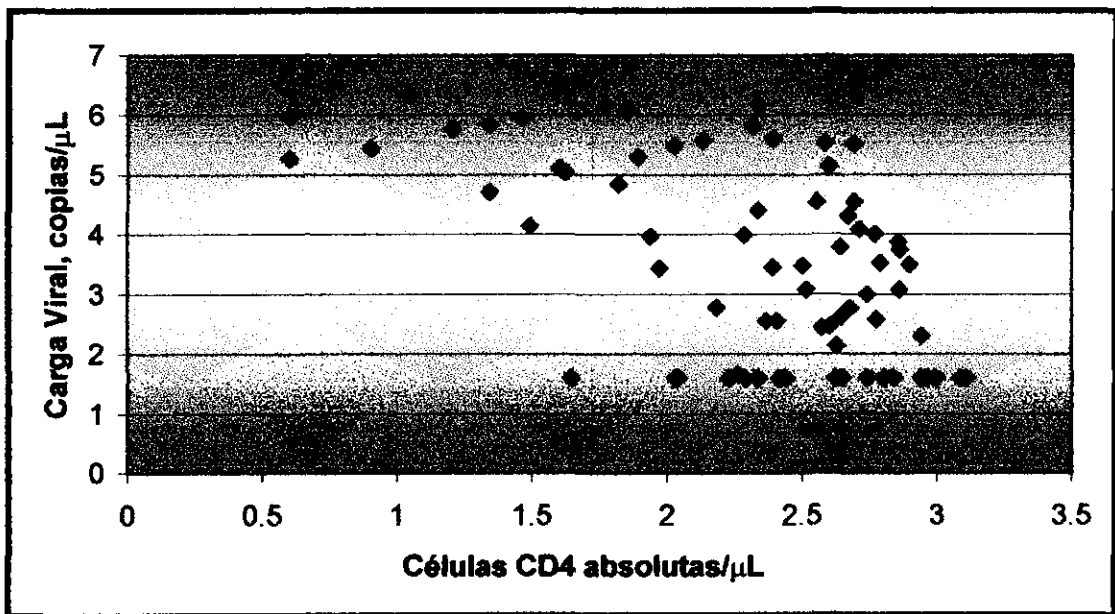
7. RESULTADOS

En la población estudiada de 70 pacientes y 17 controles obtenidos de las muestras que se procesaron se confirmó una disminución muy pronunciada del número absoluto de células T CD4+, células T_{reg}, y células CD3+CD25+ en los pacientes.

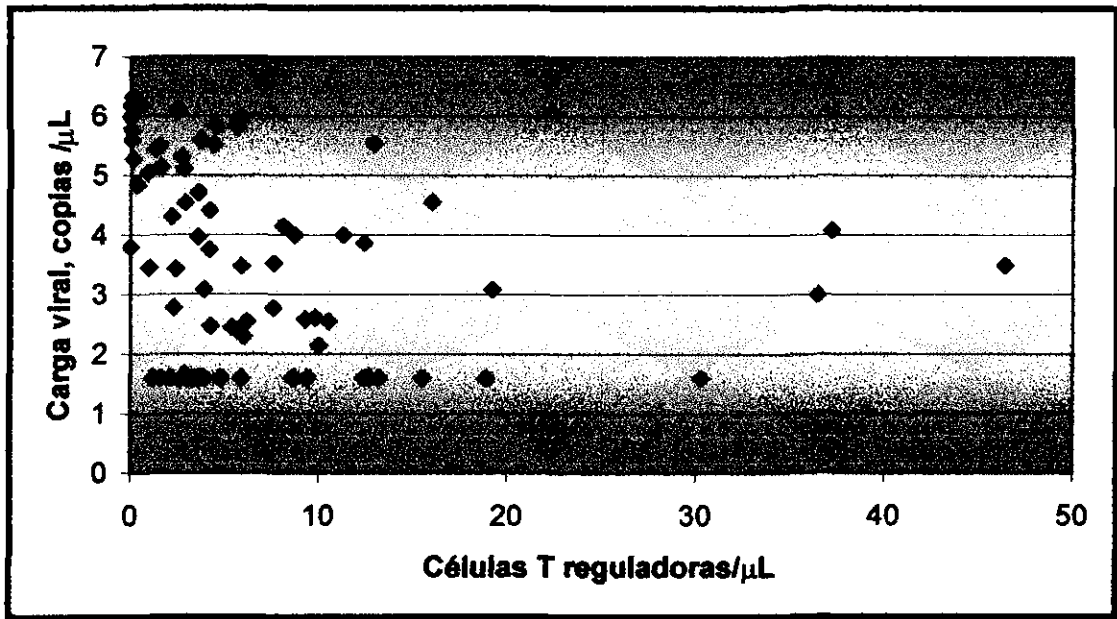
Se observó correlación inversa estadísticamente significativa ($p= 0.00027$) entre la disminución de células T CD4 totales y la carga viral. Se observó correlación entre la disminución de las células células T reguladoras y la carga viral ($r^2= -0.37024076$). Entre la cuenta absoluta de la población celular CD4+ y las células T reguladoras se observó una correlación directa ($r^2= 0.55567434$) aunque la disminución de las células CD4+ absolutas y T_{reg} en los pacientes no es paralela. Esto se muestra en la tabla 1 y gráficas 1, 2, 3, y 4.

CELULAS	PACIENTES	CONTROLES	P
CD3+ CD4+	471.6 ± 150.6	675.4 ± 173.2	0.0000128
CD3+ CD25+	9.6 ± 15.2	21.0 ± 9.8	0.046216751
CD3+ CD4+ CD25+	7.81 ± 4.17	14.10 ± 12.5	0.029770

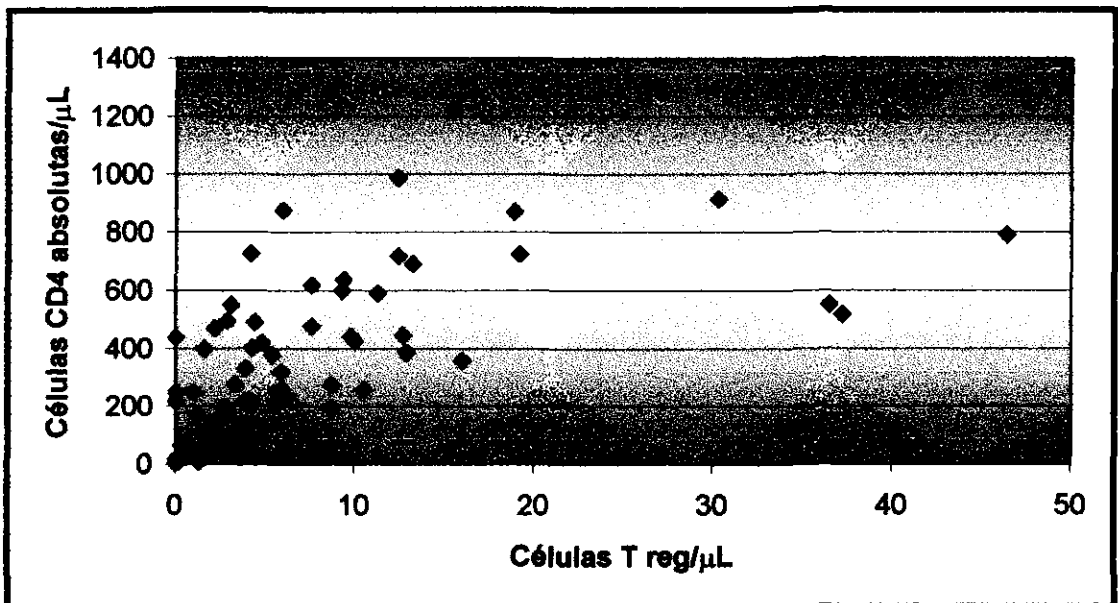
Tabla 1. Muestra la media de las poblaciones celulares totales (células/ μ L) \pm 1 desviación estándar y el valor de p.



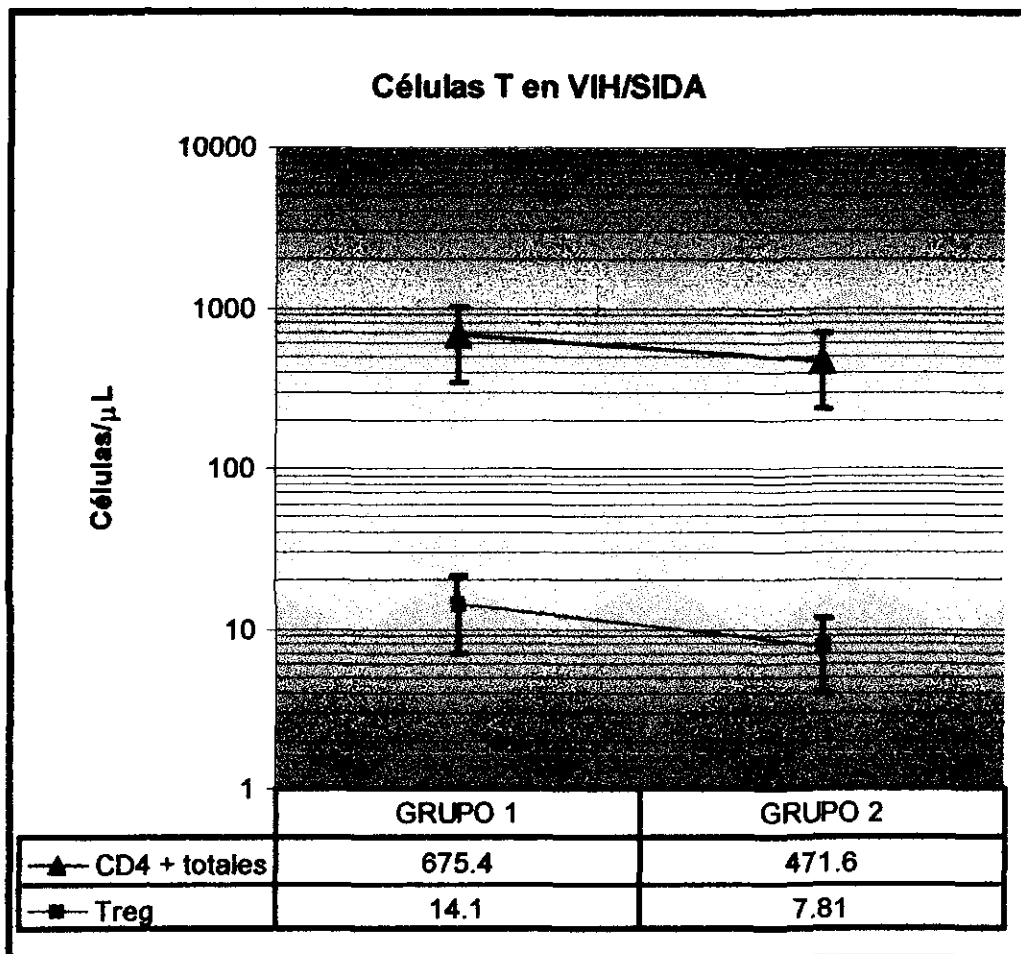
Grafica N° 1. Muestra la correlación entre la carga viral y las células CD4+ absolutas. $r^2 = -0.55984268$. $p = 0.00027$



Gráfica N° 2. Muestra la correlación entre la carga viral y las células T_{reg}. $r^2 = -0.37024076$.



Gráfica N° 3. Muestra la correlación entre las células CD4+ absolutas y las células T_{reg}. $r^2 = 0.55567434$. $p = 0.00004$



Gráfica N° 4. Muestra los valores de la media (células/ μ L) y se representa ± 1 desviación estándar de las células CD4+ totales y T_{reg} en el grupo 1 (controles) y grupo 2 (pacientes).

8. DISCUSION

Este trabajo comprueba la observación previa de que la carga viral y el número absoluto de células T CD4+ guardan una asociación inversa. Demuestra además que efectivamente hay una disminución significativa en el número absoluto de células T_{reg} que, sin embargo, no guarda una asociación significativa con la carga viral. De hecho, no hay paralelismo entre la reducción del número de células CD4+ totales y el sub-compartimento de las células T_{reg}. Así, en el grupo de pacientes estudiado, el promedio de la disminución de las células CD4+ totales fue de 31% en relación al grupo de control, mientras que las células CD4+CD25+ (T_{reg}) estuvieron disminuidas en un 45% en relación al grupo de sujetos sanos.

La razón de una disminución relativa más acentuada de las células T_{reg} en comparación con el de las CD4 totales no es clara. Si esta reducción fuese resultado directo de los efectos citopáticos del VIH, porque esta subpoblación fuese más susceptible, sería de esperarse una correlación negativa entre la carga viral y el número de células T_{reg}. Como se expresó anteriormente, esta asociación no pudo documentarse.

Entre múltiples explicaciones que pueden darse a este hallazgo, la más plausible es que la acentuada reducción de células T_{reg} en pacientes con VIH/SIDA forme parte del proceso de desregulación inmunológica que ocurre en pacientes con esta infección.

Este hallazgo es interesante en sí mismo, y parecería razonable investigar si los números de células T_{reg} en estos pacientes guardan alguna relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, principalmente con aquellas asociadas a fenómenos de autoinmunidad. La asociación de la presencia y niveles de autoanticuerpos séricos y el número de células T_{reg} en pacientes con VIH/SIDA será motivo de un nuevo proyecto en el departamento de inmunología de los Laboratorios Clínicos de Puebla.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Ruiz Argüelles, Director Médico de los laboratorios Clínicos de Puebla por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo, al Dr. Guillermo Ruiz Reyes Director General, a la M.C. Beatriz Pérez Romano, a la M.C. Virginia Reyes Núñez y al personal de Banco de sangre de L.C.P.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Zavala trujillo I. Gorbea Robles M. **"Manejo del paciente con VIH/SIDA"**, 1ª edición, GlaxoWellcome, 1999. pp. 7-28.
- ² De Vita V, Hellman S, Rosenberg S.A. **Aids Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention**, 3ª Edición, J.B.Lippincott Company 1992. pp:6-9.
- ³ Kaufmann S.H.E. Sher A. Ahmed R. **Immunology of Infections Diseases**, ASM PRESS, 2002. pp.453-477.
- ⁴ Phair J.P MD, Murphy R.L MD. **Contemporary Diagnosis and management of HIV/AIDS Infections**. H.H.C 1997. pp. 5-9.
- ⁵ Rowland-Jones SL. AIDS pathogenesis: What have two decades of HIV research taught us?, **Nature Reviews Immunology**, 2003; 3: 343-347.
- ⁶ Ramírez Arias JL, Ruiz-Argüelles A. **Inmunopatología**, parte C, libro 2, Programa de actualización continua para médicos generales. pp. 31-34.
- ⁷ Warner C. Greene, **The medical management of AIDS**, 5ª edición, Saunders, 1997. pp.17-25.
- ⁸ Joseph R. Masci. **Outpatient management of HIV infection**, 2ª edición, Editorial Mosby, 1996. pp. 8-10.
- ⁹ Ponce de León S, Rangel Frausto S. **SIDA aspectos clínicos y terapéuticos** , McGraw-Hill Interamericana pp.11-16.

¹⁰ Izazola Licea JA. **SIDA: Estado actual del conocimiento**, 1ª edición, Noriega editores, 1996, pp. 25.

¹¹ Abbas Abul K, Lichtman Andrew H. **Inmunología celular y molecular**. 5ª edición, Saunders, 2004, pp. 321-232

¹² Morrow WJW, Isenberg DA, Sobol RE. AIDS virus infection and autoimmunity- A perspective of the clinical, immunological, and molecular origins of the autoallergic pathologies associated with HIV disease, **Clin Immunol Immunopathol** 58: 163, 1991.

¹³ Karpatkin S, Nardi MA, Kouri YH: Internal-image anti-idiotypic HIV-1gp 120 antibody in human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) seropositive individuals with thrombocytopenia, **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 1487, 1992.

¹⁴ Ardman B, Sikorski, MA, Settles M et al: Human immunodeficiency virus type 1-infected individuals make autoantibodies that bind to CD43 on normal thymic lymphocytes, **J Exp Med** 172:1151, 1990.

¹⁵ Rich RR, Fleisher TA, Shwartz BD, Shearer WT, Strober w. **Clinical immunology Principles and Practice**. Vol. II, Mosby. 1996.

¹⁶ Danny Zipris, Jan-Luuk, Hillebrands, Raymond M, Welsh. Infections that induce autoimmune diabetes in BBDR rats modulate CD4+CD25+ T populations. **The journal of immunology**. 170:3592-3602,2003.

¹⁷ Ponce de León Rosales S., Del Río Chiriboga C. **Guía para la atención Médica de Pacientes con Infección por VIH/SIDA en consulta externa y hospitales**, 3ª Edición 1997, pp. 87-94.

¹⁸ Henry JB, **Diagnóstico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio**, Masson, Salvat, 9ª Edición, 1993, pp: 817-831.

¹⁹ Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Argüelles A, Basso G, Braylan R, et al. Clinical useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. **Clin Chem** 1999; 45: 1708-1717.

²⁰ Longonbardi AG. **Flow Cytometry Methods**. Wiley-Liss Inc 1992.

²¹ Kawahata K. Misaki Y. Yamauchi M. Tsunekawa S. Setoguchi K. Generation of CD4+CD25+ regulatory T cells from autoreactive T cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive T cells by endogenous TCR expression. **The Journal of Immunology**, 2002, 168: 4399-4405.

²² Viguiier M. Lemaitre F. Verola O. Cho MS. Gorochov G. Dubertret L. Bachelez H. Kourilsky P. Ferradini L. Foxp3 Expressing CD4+CD25 high Regulatory T Cells Are Overrepresented in Human Metastatic Melanoma Lymph Nodes and Inhibit The Function of Infiltrating T Cells. **The Journal of Immunology**, 2004, 173: 1444-1453.

²³ Wohlfert E.A., Callahan M.K. Clark R.B. Resistance to CD4+CD25+ Regulatory T Cells and TGF- β in Cbl-b^{-/-} Mice. **The Journal of Immunology**, 2004, 173: 1059-1065.

- ²⁴ Simark-Mattsson C, Dahlgren U, Roos K. CD4+CD25+ T Lymphocytes in Human Tonsils Suppress the proliferation of CD4+CD25+ Tonsil Cells, **Scand J Immunol** 2002, Jun; 55 (6): 606-11.
- ²⁵ Szanya T, Ermann J, Taylor C, Holness C, Fathman G. The subpopulation of CD4+CD25+ Splenocytes That Delays Adoptive Transfer of Diabetes Expresses L-Selectin and High Levels of CCR7. **The Journal of Immunology**, 2002, 169:2461-2465.
- ²⁶ Graca L, Thompson S, Lin CY, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Both CD4(+)CD25(+) and CD4(+)CD25(-) regulatory cells mediate dominant transplantation tolerance. **J. Immunol** 2002 Jun 1; 168 (11):5558-65.
- ²⁷ Romagnoli P, Hudrisier D, Van Meerwijk JP. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory cells. **J Immunol** 2002 Feb 15;168(4) : 1644-8.
- ²⁸ McHugh RS, Shevach EM. Cutting Edge. Depletion of CD4(+)CD25(+) regulatory cells is necessary, but not sufficient, for induction of organ-specific autoimmune disease. **J Immunol** 2002 Jun 15, 168(12): 5979-83.
- ²⁹ Zipris D, Hillebrands JL, Welsh RM, Rozing J, Xie JX, Morders JP, Grainer DL, Rossini AA. Infections that induce Autoimmune Diabetes in BBDR Rats Modulate CD4+CD25+ T cell populations. **The Journal of Immunology**, 2003, 170: 3592-3602.

- ³⁰ Mahmoud F, Abul H, Haines D, Al-Saleh C, Khajeji M, Whaley K. Decreased total numbers of peripheral blood lymphocytes with elevated percentages of CD4+ CD45 RO+ and CD4+CD25+ of T-helper cells in non-segmental vitiligo. **J Dermatol** 2002 Feb; 29(2): 68-73.
- ³¹ Zoller M, McElwee KJ, Engel P, Hoffmann R. Transient CD44 variant isoform expression and reduction in CD4+/CD25+ regulatory T cells in C3H/HeJ Mice with alopecia areata. **J Invest Dermatol** 2002 Jun; 118(6): 983-92.
- ³² Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: More questions than answers. **Nature Reviews Immunology** 2002; 2:389-400.
- ³³ Bloom R, Sol CJA, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids, **J Clin Microbiol** 1990; 28: 495-503.
- ³⁴ Compton J: Nucleic acid sequence-based amplification. **Nature** 1991; 350: 91-92.
- ³⁵ Blackburn GF, Shah A, Talley DB. Electrochemi-luminescence detection for development of immunoassays and DNA-probe assays for clinical diagnostics. **Clin Chem** 1991; 37: 1534-1539.
- ³⁶ Kenten JH, Gudibande S, Link J, Willey JJ, Curfman B, Major EO, Massey RJ. Improved electrochemiluminescent label for DNA probe assays: rapid quantitative assays of VIH1 polymerase chain reaction products. **Clin Chem** 1992; 38: 873879.