

**CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN INMUNOLÓGICA EN
PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH-1 BAJO ATENCIÓN INTEGRAL
ESPECIALIZADA AMBULATORIA,
CALI-COLOMBIA**

XIMENA GALINDO ORREGO

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Santiago de Cali
2013**

**CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN INMUNOLÓGICA EN
PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH-1 BAJO ATENCIÓN INTEGRAL
ESPECIALIZADA AMBULATORIA,
CALI-COLOMBIA**

XIMENA GALINDO ORREGO

**Trabajo de investigación presentado para optar al título de
Magister en Ciencias Biomédicas**

**Tutora: BEATRIZ PARRA PATIÑO. Bact. MSc. PhD.
Profesora Departamento de Microbiología
Facultad de Salud**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Santiago de Cali
2013**

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. MARCO TEÓRICO	21
1.1. Epidemiología del VIH/SIDA	21
1.2. Infección por VIH, y clasificación clínica y fisiopatología	22
1.3. Mecanismos de disfunción inmunológica en la infección por VIH	26
1.4. Papel de la activación inmunológica en la patogénesis de la enfermedad por VIH	28
1.5. Causas de activación inmunológica en la infección por VIH	29
1.6. Marcadores de activación inmunológica	31
1.7. Marcadores de activación inmunológica y progresión de la enfermedad	34
1.8. Marcadores de activación inmunológica y respuesta al tratamiento antirretroviral	35
2. HIPÓTESIS	37
3. OBJETIVOS	38
3.1. Objetivo General	38
3.2. Objetivos Específicos	38
3.2.1. Objetivo específico 1:	38
3.2.2. Objetivo específico 2:	38
4. MATERIALES Y METODOS	39
4.1. Tipo de estudio y diseño experimental	39
4.2. Consideraciones Éticas	41
4.3. Sujetos del estudio	43
4.4. Metodología de laboratorio	46
4.5. Análisis estadístico	49
4.5.1. Gerencia y análisis de datos	49
4.5.2. Plan de análisis de datos	49
5. RESULTADOS	53
5.1. Descripción de los individuos de estudio	53

5.2. Frecuencia de LT activados durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA, de acuerdo al control inmunoviroológico de la infección y al estadio clínico.	56
5.2.1. Expresión de la molécula CD38 en los LT de pacientes VIH+ en la fase crónica de la infección	56
5.2.2. Expresión de la molécula HLA-DR en los linfocitos T durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA	61
5.2.3. Co-expresión de las moléculas CD38 y HLA-DR en los linfocitos T (LT CD38/HLA-DR doblemente positivos) durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA.	64
5.3. Correlación de los marcadores de activación inmunológica con el nivel de LT CD4+, y la carga viral plasmática.	68
5.4. Desempeño diagnóstico o exactitud (Area under ROC curve [AUC]) de los marcadores de activación inmunológica en LT para identificar correctamente cada grupo de pacientes VIH+	71
6. DISCUSIÓN	75
7. CONCLUSIONES	80
REFERENCIAS	81
ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Descripción del curso de la infección por el VIH-1 y marcadores inmunoviroológicos de acuerdo a las fases de la infección	23
Figura 2. Análisis FACS de la expresión de la molécula CD38 en los linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+.	60
Figura 3. Mayor frecuencia de LT CD38+ en la infección con VIH se relaciona con pobre control de la replicación viral y enfermedad avanzada.	61
Figura 4. Análisis FACS de la expresión de la molécula HLA-DR (Panel A) y co-expresión de las moléculas HLA-DR y CD38 (Panel B) en los linfocitos T CD4+ o LTCD8+.	63
Figura 5. Mayor frecuencia de LT HLA-DR+ en la infección crónica con VIH se relaciona con pobre control de la replicación viral y enfermedad avanzada.	64
Figura 6. Co-expresión de las moléculas CD38 y HLA-DR en los linfocitos T (LT CD38/HLA-DR doblemente positivos) durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA.	65

Figura 7. Niveles aumentados de las subpoblaciones de LT activados inmunológicamente se correlacionan con altos niveles de replicación del VIH y bajos recuentos de LT CD4+ en la fase crónica de la infección con VIH-1. 69

Figura 8. Curvas ROC y habilidad diagnóstica de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ y LT CD4+ activados, a seleccionados valores de puntos de corte, para identificar pacientes VIH+ en diferentes fases de progresión crónica de la infección. 74

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la infección por VIH-1 según criterios del CDC, 1993.	24
Tabla 2. Comparación de las frecuencias relativas (%) y densidad media (MFI) de la expresión de CD38 en linfocitos T CD4+ y LT CD8+ de pacientes VIH+ que no han recibido terapia antirretroviral y de controles normales.	43
Tabla 3: Características demográficas y clínicas de los pacientes del estudio.	54
Tabla 4. Niveles de expresión (Intensidad media de fluorescencia o MFI) de las moléculas CD38+ y/o HLA-DR en los linfocitos T CD4 o CD8 en la fase crónica de la infección con VIH-1 en individuos con o sin tratamiento antirretroviral.	67
Tabla 5. Correlación de marcadores de activación inmunológica con variables conteo de LT CD4 y carga viral.	70
Tabla 6. Desempeño diagnóstico o exactitud (Area under ROC curve [AUC]) de los marcadores de activación inmunológica en LT para identificar correctamente cada grupo de pacientes VIH+ con o sin terapia ARV en diferentes estadios clínicos e inmunoviológicos.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ARV: Antirretroviral

AUC: Area under ROC curve o Área bajo la curva ROC

BD: Becton Dickinson

CAM: Centro de Análisis Molecular

CDC: Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos

CIREH: Comité Institucional de Revisión de Ética en Humanos

CRF: Formato de recolección de datos

CV: Carga Viral

DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FACS: Fluorescent Antibodies Cell Sorting o Citometría de flujo.

FSC: forward scatter

GALT: Tejido Linfoide Asociado a mucosa Gastrointestinal

GR: Glóbulos Rojos

IFN- α : Interferón alfa

LB: Linfocito B

LPS: Lipopolisacárido

LT: Linfocito T

LTNP: No progresores a largo plazo

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia

NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NK: Natural Killer o células asesinas naturales

OMS: Organización Mundial de la Salud

PLT: Plaquetas

ROC: Receiver Operating Characteristic, o Característica Operativa del Receptor

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

SIV: Virus de la Inmunodeficiencia del Simio

SSC: Sidescatter

UIP: números únicos de identificación de pacientes

VIH-1: Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento Informado.

Anexo 2: Formato de recolección de datos (CRF).

Anexo 3: Carta de compromiso del Centro de Análisis Molecular.

Anexo 4: Instructivo para toma y envío de muestras.

Anexo 5: Tabla 1 y Tabla 2.

Tabla 1. Frecuencia de LT activados (CD38+ y/o HLA-DR+) en la fase crónica de la infección con VIH-1 en individuos con o sin tratamiento antirretroviral.

Tabla 2. Correlación de marcadores de activación inmunológica con variables conteo de LT CD4+, porcentaje LT CD4+, conteo LT CD8+, porcentaje LT CD8+ y carga viral.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La activación inmunológica crónica en los individuos VIH-1 positivos parece tener un papel fundamental en el deterioro inmunológico que conduce al desarrollo del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Específicamente los niveles de activación de los linfocitos T se han relacionado con la velocidad de progresión de la enfermedad y con la respuesta al tratamiento antirretroviral (ARV). Las moléculas de activación inmunológica, CD38 o el antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR) expresadas en la superficie de los linfocitos T (LT) parecen ser mejores marcadores para monitorizar activación inmunológica en los pacientes VIH-1+ y por consiguiente predecir el avance de la enfermedad en la fase crónica de la infección, que el recuento de los LT CD4+ utilizado de rutina. No obstante la abundante información al respecto, aun no hay claridad sobre los valores de estas moléculas y linfocitos activados en cada una de las fases de la infección, ni validado su utilidad para predecir la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento antirretroviral (ARV). La información disponible al respecto en pacientes colombianos es aun escasa.

OBJETIVOS: Determinar el estado de activación inmunológica de los linfocitos T, según la expresión de las moléculas CD38 y HLA-DR, en pacientes VIH-1+ en la fase crónica de la infección con y sin tratamiento antirretroviral y establecer si existe asociación entre estos marcadores y los desenlaces clínicos, inmunoviológicos y terapéuticos.

METODOLOGÍA: Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el que se analizaron por citometría de flujo las moléculas CD38 y HLA-DR, en la superficie de los LT, en 96 pacientes con infección crónica por VIH-1 con sin tratamiento ARV y 29 individuos control, VIH negativos. Los pacientes VIH-1+ fueron divididos para el análisis en cuatro grupos de acuerdo a su estado clínico e inmunoviológico y a la respuesta al tratamiento ARV. De los pacientes sin tratamiento ARV previo, 24 pacientes estaban en fase no avanzada (ARV-Naïve) y 32 pacientes en fase avanzada con indicación de inicio de tratamiento (Inicia-ARV). Los pacientes bajo tratamiento ARV se clasificaron de acuerdo a una adecuada respuesta a este tratamiento en 23 de ellos (ARV-Exitoso), o en falla clínica e inmunoviológica en 17 pacientes (ARV-Falla). Se compararon los valores de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y LT CD8+ (CD38+ o HLA-DR+ o CD38+/HLA-DR+ doblemente positivos) entre los grupos. También se analizó la correlación entre la expresión de estos marcadores de activación en LT con la carga viral y el recuento absoluto de LT CD4+. Finalmente mediante análisis de curvas ROC, se estimó la exactitud (Área bajo la curva ROC [AUC]) de las subpoblaciones de LT inmunológicamente activados para discriminar los grupos VIH-1+ del estudio de los pacientes con el mejor control virológico de la infección (ARV-exitoso) y se escogieron los valores de corte con la mejor habilidad diagnóstica. **RESULTADOS:** Se encontró significativamente mayores niveles de LT activados en los pacientes en estados más avanzados sin terapia ARV y en los que tenían falla terapéutica, comparados con los individuos con un buen control inmunoviológico independientemente de la terapia ARV. Consistente con la reconstitución inmunológica por el tratamiento ARV, los niveles de LT activados

del grupo ARV-exitoso fueron muy similares al grupo de VIH negativos en todas las subpoblaciones de LT examinadas. Los únicos marcadores inmunológicos que diferenciaron a los pacientes en estadios menos avanzados de la infección (ARV-naïve) del grupo con los más bajos niveles de activación inmunológica y mejor control virológico (ARV-exitoso), fueron medidos en la superficie de los LT CD8+ (% de LT CD8+CD38+, Intensidad media de fluorescencia [MFI] de la molécula CD38 en LTCD8+, % de LT CD8+HLA-DR+ y % de LT CD8+CD38+/HLA-DR+ doblemente positivos). Este resultado sugiere que en la fase crónica de la infección por VIH-1 los cambios en la activación inmunológica de los LT CD8+ preceden a esos cambios fenotípicos en los LT CD4+ y a su disminución en sangre periférica. De manera similar la expresión de la molécula CD38 en los LT CD8+ distinguió mejor a los individuos con falla virológica e inmunológica a la terapia del grupo con terapia exitosa, que la expresión de este mismo marcador en LT CD4+. Los niveles de activación inmunológica se correlacionaron positivamente con los niveles de carga viral plasmática e inversamente el conteo de linfocitos T CD4+. Consistente con los resultados anteriores, el análisis de curvas ROC mostró que los niveles de LT CD8+ activados (% de LT CD8+CD38+, MFI de la molécula CD38 en LT CD8+, % de LT CD8+HLA-DR+ y % LT CD8+CD38+/HLA-DR+ doblemente positivos) tuvieron una alta exactitud (AUC >87) para identificar los pacientes naïve a ARV en diferentes estados de avance de su infección crónica o los pacientes con falla terapéutica de los pacientes VIH-1+ bajo tratamiento ARV exitoso y mejor control virológico. La cantidad de la molécula CD38 (valores MFI) en los linfocitos T CD8+, al contrario del recuento de LT CD4+, tuvo una excelente exactitud para identificar activación inmunológica en

los pacientes VIH-1+ en estadios menos avanzados de la infección sin tratamiento ARV y distinguirlos de los pacientes controlados exitosamente por el tratamiento ARV o los individuos VIH negativos.

CONCLUSIONES: Los resultados confirman que la activación de LT es un buen marcador de progresión de la enfermedad y de respuesta al tratamiento antirretroviral. De manera novedosa, estos resultados sugieren que la activación inmunológica de LT CD8+, de acuerdo a los marcadores CD38 y/o HLA-DR precede a las alteraciones fenotípicas de estos mismos biomarcadores inmunológicos en los LT CD4+ y a los cambios cuantitativos en los LT CD4+, el biomarcador de elección actual para decisiones clínicas y terapéuticas en estos pacientes.

Palabras Clave: VIH-1, Activación inmunológica en Linfocitos T, Moléculas CD38 y Human Leukocyte Antigen –DR (HLA-DR).

INTRODUCCIÓN

La enfermedad por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es hoy en día un grave problema de salud pública en aumento en el mundo entero, causando una importante mortalidad especialmente en los países más pobres. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) existen en el mundo alrededor de 34 millones de personas infectadas con VIH, la mayoría de ellas se encuentra en países de bajos o medianos recursos. Hasta la fecha el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) ha cobrado la vida de unos 25 millones de personas, y se calcula que en 2011 unos 1,7 millones de personas murieron por esta causa ⁽¹⁾. En Colombia en el año 2009 el promedio diario de casos nuevos de SIDA fue de 18 ⁽²⁾, y en el año 2011 se registraron 5.650 casos de muerte por SIDA ⁽³⁾. En el Valle del Cauca la mortalidad relacionada con SIDA fue de 1.6 x 100.000 habitantes en año 2009 ⁽²⁾, en Cali se reportaron 465 casos nuevos de infección por VIH en el año 2011, de los cuales el 20% fueron diagnosticados en etapa de SIDA y se reportaron 38 fallecimientos por esta causa ⁽³⁾.

Aunque existe tratamiento para controlar la enfermedad este no elimina la infección y el acceso a este tratamiento es aún limitado, especialmente en países como Colombia, donde la cobertura es solo alrededor de 66.3% ⁽³⁾.

Aún no se conoce por completo la fisiopatología de la enfermedad por VIH, pero se cree que la activación inmunológica crónica tiene un papel fundamental en las

alteraciones inmunológicas que sufren estos pacientes y el subsecuente progreso al Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) ⁽⁴⁾. Desde el establecimiento de la infección por VIH-1, se desencadenan en el sistema inmunológico múltiples alteraciones, tanto por efecto directo del virus como por un daño indirecto, que conducen al deterioro crónico de los linfocitos T CD4+. La pérdida de los linfocitos T CD4+ que caracteriza la infección por VIH se atribuye a la apoptosis mediada por proteínas virales, o al daño de los órganos linfoides, pero principalmente a la muerte celular secundaria a un estado de hiperactivación inmunológica ⁽⁵⁾. Esta activación inmunológica descrita como “aberrante” por su magnitud y extensión (tanto en linfocitos como en el sistema inmune innato), se atribuye principalmente a la pérdida de la integridad de la mucosa gastrointestinal, la cual permite la translocación permanente de productos microbianos a la circulación sistémica y subsecuente estimulación crónica del sistema inmune ⁽⁶⁻⁸⁾. Además, como resultado de la activación inmunológica también se aumentan las células blanco de la infección y por consiguiente la replicación viral contribuyendo al progreso clínico ⁽⁴⁾.

Existen diferencias en la velocidad con la que progresa la enfermedad y no está claro cuál es el mecanismo fisiopatológico más importante. Sin embargo múltiples estudios coinciden en el papel fundamental que parece tener la activación inmunológica en la patogénesis de la enfermedad por VIH. Por ejemplo se conoce que la activación de linfocitos T, medida especialmente por la expresión en la superficie celular de las moléculas de activación, CD38 y HLA-DR, está relacionada con progresión de la enfermedad ^(9,10). Se han demostrado niveles

mucho mayores LT positivos para estos biomarcadores de activación inmunológica en los individuos que progresan en la enfermedad al compararlos con individuos progresores lentos o no progresores ^(11,12). Además estudios de seguimiento a corto y a largo plazo han demostrado que los pacientes con mayores niveles de activación inmunológica progresan más rápido que los individuos con niveles más bajos de esta ^(9,13). Así mismo, mayores niveles de activación de LT se relacionan con la caída más rápida de los LT CD4 de sangre periférica, y los niveles aumentados de LT CD8+ activados pueden predecir la disminución de los linfocitos T CD4+ y por tanto la progresión de la enfermedad⁽¹³⁾.

Por otra parte, se conoce que la activación inmunológica también se relaciona con la respuesta a la terapia antirretroviral (ARV). Por ejemplo, los cambios tempranos en los niveles de activación de linfocitos T, de acuerdo a la expresión de la molécula CD38, pueden predecir el éxito del tratamiento ARV ^(14,15).

Actualmente se monitoriza la progresión de la enfermedad y la necesidad de inicio de tratamiento ARV con los niveles de carga viral (CV) plasmática y el valor absoluto de linfocitos T CD4+. Sin embargo estos dos marcadores convencionales, no reflejan la complejidad de las alteraciones inmunológicas de estos pacientes. La disminución de los LT CD4+ en sangre parece ser un evento tardío, precedido por una serie de procesos dentro de los cuales el más importante parece ser la activación inmunológica. Por lo tanto es de crucial importancia realizar estudios que permitan determinar si los cambios tempranos en la activación inmunológica de los LT pueden predecir mejor el deterioro inmunológico y disminución de los LT CD4+, que el sólo conteo de estos linfocitos. Lo anterior

permitiría anticipar con mejor exactitud el progreso clínico y realizar una intervención terapéutica más temprana que prevenga el avance de la enfermedad. Igualmente se necesita establecer cuáles biomarcadores de activación inmunológica y los niveles de estos serían los mejores predictores de progresión de la enfermedad. Tampoco se conoce suficientemente si los cambios en la activación inmunológica en individuos bajo tratamiento antirretroviral pueden predecir el riesgo de tener falla al tratamiento. Por otra parte, nuevos enfoques de tratamiento basados en inmunomodulación de estos potenciales blancos terapéuticos podrían ser una mejor alternativa, sin los problemas de resistencias y los efectos secundarios de la actual terapia antirretroviral o un complemento de la misma.

No obstante la intensa investigación internacional alrededor del tema y los avances en el conocimiento, son muy pocos los estudios a este respecto en Latinoamérica y particularmente en Colombia ⁽¹⁶⁾.

Resulta entonces necesario para el control de la infección y enfermedad por el VIH/SIDA en Colombia y la toma de mejores decisiones clínicas basadas en evidencia, caracterizar el estado de activación inmunológica en pacientes colombianos con infección por el VIH-1. Por ejemplo, determinar la asociación de activación inmunológica con el estadio clínico en presencia o ausencia de tratamiento antirretroviral exitoso constante, establecer los niveles o magnitud de los biomarcadores a medida que se progresa en la etapa crónica y además determinar los cambios iniciales que puedan ocurrir a partir de la instauración del primer régimen de tratamiento antirretroviral, son estudios preliminares que

aportarían evidencia para justificar estudios multicéntricos de seguimiento a largo plazo.

Este estudio caracterizó de manera preliminar el estado de activación inmunológica en una muestra representativa de pacientes VIH+, pertenecientes a una cohorte dinámica de seguimiento y control bajo el modelo de atención integral especializada ambulatoria diseñado y desarrollado por la Corporación de Lucha Contra el Sida.

Se caracterizó la activación inmunológica de LT basados en la expresión de las moléculas CD38 y HLA-DR en pacientes con infección crónica por VIH-1 en diferentes estadios de la enfermedad, con y sin tratamiento ARV. Los resultados confirman que la activación inmunológica en estos pacientes se relaciona con el desenlace clínico, el estado inmunovirológico y la respuesta al tratamiento ARV. De manera novedosa aporta nueva información con respecto a que los cambios en el estado de activación inmune de los linfocitos T CD8+ preceden a estos cambios en los linfocitos T CD4+ y a la disminución del recuento absoluto de los mismos. Actualmente se realiza seguimiento a corto plazo (seis meses) de los cambios en los marcadores de activación inmunológica en estos pacientes y esperamos confirmar y extender los resultados obtenidos en este estudio transversal.

En resumen, esta investigación aporta evidencia preliminar con impacto en la toma de decisiones para el inicio oportuno de tratamiento ARV, lo cual permitiría preservar la calidad y mejor funcionalidad de la respuesta inmune. Lo anterior

podría contribuir al éxito de la terapia, prevenir complicaciones asociadas y mejorar la calidad de vida de los individuos que conviven con la infección por VIH en Colombia.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Epidemiología del VIH/SIDA

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) hay 34 millones de personas infectadas con VIH en el mundo, aunque solo el 50% de ellas conocen su estado serológico. La mayoría de estas personas se encuentran en países de bajos o medianos recursos. Se calcula que en 2011 se infectaron con VIH unos 2,5 millones de personas, que hasta la fecha, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) ha cobrado la vida de unos 25 millones de personas y que solo en 2011, 1,7 millones de personas murieron por esta causa ⁽¹⁾. A finales de 2011, en los países de ingresos bajos y medianos más de 8 millones de personas seropositivas tenían acceso al tratamiento antirretroviral (ARV), en general, la cobertura del tratamiento con antirretrovirales en estos países ha aumentando pero continua siendo baja, ya que para ese año alcanzó el 54% de los casi 15 millones de personas que necesitaban tratamiento ⁽¹⁾. Se calcula que en América latina hay 1.4 millones de infectados, 83.000 nuevas infecciones en 2011 y 54.000 muertes relacionadas con SIDA entre adultos y niños en el mismo año ⁽¹⁾.

En Colombia, de acuerdo a los datos reportados al Sivigila, entre 1983 y 2010 ha habido un total de 78.999 casos notificados de infección por VIH ⁽²⁾. Se estima una prevalencia de 0.52 entre personas de 15 y 49 años de edad. En el año 2011 se notificaron 6687 casos de VIH/SIDA ^(2,3). Y la tasa de mortalidad por SIDA en el país en el año 2009 según DANE fue 5,21 por 100.000 habitantes ⁽²⁾.

El Valle del Cauca ocupa el segundo lugar en Colombia en número de casos acumulados desde 1983 hasta 2010 con 14.884 casos de VIH en este periodo ⁽²⁾. Llama la atención que el departamento del Valle siendo el segundo en número de casos acumulados, registra la mayor proporción de casos incidentes en el 2010 junto con Barranquilla; y una concentración mayor en población joven ^(2,3). En 2010 se estimó que la cobertura de tratamiento ARV era del 80% según el Ministerio de Protección Social, pero se calcula que en población no asegurada esta cobertura solo alcanzó el 23.5% ⁽²⁾.

1.2. Infección por VIH, y clasificación clínica y fisiopatología

El virus de la inmunodeficiencia humana o VIH pertenece a la familia *Retroviridae*, se transmite a través de fluidos corporales, específicamente sangre y secreciones genitales, e infecta algunas células del sistema inmune (LTCD4+, monocitos, macrófagos, células dendríticas) y establece una enfermedad crónica en la cual ocurre una disfunción progresiva del sistema inmune lo que lleva al desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ⁽¹⁷⁾.

La historia natural de la infección por el VIH-1 de acuerdo a los dos biomarcadores actualmente utilizados para seguir el proceso de la infección, conteo de linfocitos T CD4+ y carga viral, se resume abajo en la grafica 1. En la fase aguda de la infección, la viremia (nivel del virus en sangre) es muy alta, al cabo de algunas semanas esta disminuye considerablemente y generalmente se mantiene estable durante años, hasta que aumenta nuevamente cuando se llega a la etapa de SIDA. Los linfocitos T CD4+ de sangre periférica disminuyen al inicio de la

infección y luego se recuperan parcialmente y se conservan en niveles relativamente adecuados, hasta la etapa de SIDA cuando disminuyen dramáticamente. Desde el inicio de la infección se presenta una destrucción masiva y muy rápida (2-3 semanas) de los linfocitos T CD4 de mucosas, especialmente de la mucosa del tracto gastrointestinal, y estos linfocitos no se recuperan completamente durante el curso de la infección. Desde muy temprano se establece una hiperactivación inmunológica, la cual aumenta en el transcurso de la infección ⁽¹⁸⁾ y se correlaciona con el colapso del sistema inmunológico en la fase de SIDA.

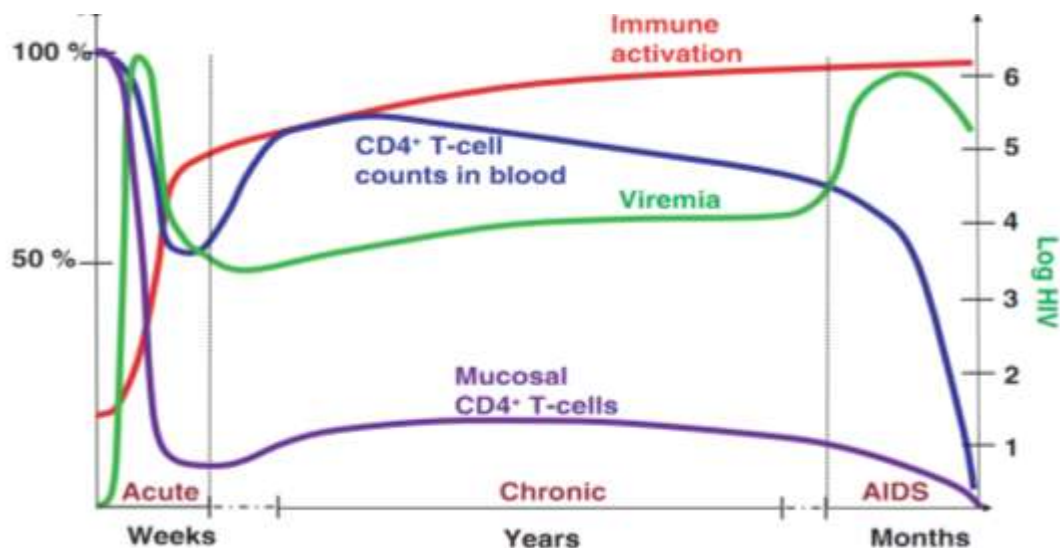


Figura 1. Descripción del curso de la infección por el VIH-1 y marcadores inmunoviroológicos de acuerdo a las fases de la infección ⁽¹⁸⁾.

Los individuos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) pueden ser clasificados, según la velocidad con la que progresa la enfermedad, en

progresores rápidos (2 – 3 años) que corresponden a un 10% de la población con infección por VIH-1, progresores típicos (8 – 10 años) que corresponden al 80% y progresores lentos (12 – 15 años) los cuales corresponden a otro 10% de esta población. Dentro de los mecanismos implicados en esta variabilidad en la progresión se encuentran factores genéticos, ambientales, virales e inmunológicos.

Para facilitar el manejo y monitoreo de los pacientes, e unificar criterios para evaluar los ensayos clínicos de diferentes tratamientos, establecer el valor pronóstico de determinados marcadores o conocer la historia natural de la infección, se han propuesto varias clasificaciones de la enfermedad por VIH. La clasificación más utilizada en los países con acceso a las ayudas diagnósticas, ha sido la del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) de 1993 ⁽¹⁹⁾, la cual categoriza a los pacientes del 1 al 3 según su recuento de linfocitos T CD4+ y en categorías A, B y C, según su estado clínico, considerando con enfermedad avanzada los pacientes que se encuentran en categorías C o 3.

Tabla 1. Clasificación de la infección por VIH-1 según criterios del CDC, 1993 ⁽¹⁹⁾.

CLASIFICACION CDC 1993	CATEGORIAS CLINICAS		
	A	B	C
Categorías de linfocitos CD4	Infección asintomática o LGP. INFECCION AGUDA	Sintomática no A no C	Indicadoras de SIDA
≥ 500 cel/mm ³	A1	B1	C1
200-499/mm ³	A2	B2	C2
< 200/m L	A3	B3	C3

La infección por el virus del VIH-1 desencadena un proceso fisiopatológico muy complejo; si bien se creía que las alteraciones inmunológicas se limitaban solamente al nivel de linfocitos T CD4 (LTCD4+) y que eran alteraciones cuantitativas, hoy se conoce que las alteraciones inmunes que sufren estos pacientes son extremadamente complejas y que básicamente afectan a todas las células del sistema inmune, tanto innato como adaptativo ⁽⁴⁾. Algunas de estas células son blanco de la infección viral, sin embargo otras células que no son infectadas por el virus, tales como los linfocitos T CD8+ (LTCD8+) o los linfocitos B (LB), también son afectadas como consecuencia de la disfunción inmune de los LTCD4+.

Las células blanco de la infección son los linfocitos T CD4, especialmente los LT CD4+ de tejido linfoide asociado a mucosas, y entre los más afectados están los LT CD4+ de la mucosa del tracto gastrointestinal, los cuales sufren una depleción masiva desde el principio de la infección, y no se recuperan completamente durante todo el curso de esta ^(6,7,20). Las alteraciones de los LT CD4+ no solo ocurren en el número de células, sino que también se afecta su función, al igual que las funciones de muchas otras células del sistema inmune.

Uno de los paradigmas que ha cambiado en relación con la infección por el VIH-1 es el tipo de infección que este virus establece. Estábamos acostumbrados a ver la infección como crónica, hoy sabemos que el VIH establece una infección bimodal, con una fase aguda muy temprana durante la infección, en la cual ocurre una eliminación masiva de los linfocitos T CD4 en el tejido linfoide asociado a las mucosas, principalmente en la mucosa del tracto gastrointestinal ⁽²⁰⁾, que

escasamente se refleja en sangre periférica. En respuesta a este fenómeno, desde esta fase aguda se establece una hiperactivación inmunológica no solo de LT CD4+ sino de todas las células del sistema inmune, como consecuencia de la alteración en la integridad de la mucosa gastrointestinal la cual permite la translocación permanente de productos microbianos a la circulación sistémica y subsecuente estimulación crónica del sistema inmune ⁽²¹⁾. La magnitud del daño que ocurre en esta fase aguda y la capacidad de reparación que exhibe el sistema inmune determinan qué tan rápido se pasa a la fase crónica, donde se da una eliminación paulatina de todas las otras sub poblaciones de linfocitos T, hasta el momento crítico cuando se llega a la etapa de SIDA ^(5,22).

1.3. Mecanismos de disfunción inmunológica en la infección por VIH

Los mecanismos por los cuales el VIH induce la disfunción inmunológica, clínicamente definida como SIDA, ha sido objeto de intenso estudio desde el descubrimiento del virus a principios de la década de los 80s. Estudios virológicos iniciales demostraron bajos niveles de replicación viral en pacientes con SIDA, sugiriendo que el virus por sí solo no es capaz de inducir el SIDA, y que debían existir factores adicionales que jugaban un papel en la disfunción inmunológica asociada al VIH. Este concepto ha sido enfatizado desde la observación de que, a pesar de que el nivel de replicación viral está significativamente correlacionado con el riesgo de progresión de la enfermedad ⁽²³⁾, este parámetro solo predice en una pequeña parte la variación en la tasa de progresión en los pacientes infectados por VIH ⁽²⁴⁾.

A mediados de la década de los 90s, con mejoras en las técnicas disponibles para detectar el virus en sangre se demostró que la replicación del virus permanecía activa durante todo el curso de la enfermedad ^(25,26). Adicionalmente, la observación de que la inhibición de la replicación viral con medicamentos antirretrovirales atenuaba sustancialmente la progresión de la enfermedad, estableció claramente que la replicación del virus es responsable de la patogenicidad. Sin embargo, lo que está aun pobremente definido es el mecanismo por el cual la replicación viral conduce directa o indirectamente a la disfunción inmunológica y posterior desarrollo del SIDA.

También a mediados de los 90s se presentó un modelo de depleción de linfocitos T CD4 basado enteramente en la infección y eliminación de estas células directamente por el virus. Este modelo proponía que la progresión a SIDA en personas infectadas por el VIH es el resultado de una falla en la respuesta hemostática del sistema inmune para enfrentar una alta tasa de pérdida de linfocitos T CD4 ^(27,28). El modelo ofrecía una explicación para el rápido aumento en el número de linfocitos T CD4 tras la inhibición de la replicación viral con el tratamiento antirretroviral. Sin embargo, este modelo y sus versiones posteriores ^(29,30), fueron desafiados por motivos teóricos y experimentales pues no parecían explicar la complejidad de la dinámica de las células T en respuesta a la replicación viral continua y además parecía una visión simplista de la patogénesis de la enfermedad ⁽³¹⁻³⁸⁾.

1.4. Papel de la activación inmunológica en la patogénesis de la enfermedad por VIH

La idea de que la activación inmunológica crónica desempeña un papel fundamental en la patogénesis del SIDA fue primero presentada por Ascher S y Sheppard ⁽³⁹⁾ y, en paralelo pero desde una perspectiva diferente, por Grossman y colaboradores a finales de los años 80 y principios de los 90 ^(40,41). Poco tiempo después, Giorgi y colaboradores publicaron una serie de estudios clínicos que apoyaban el concepto de que una excesiva/aberrante activación inmunológica es el principal mecanismo que lleva a la disfunción inmunológica asociada al VIH. Estos estudios encontraron que la activación de linfocitos T CD4+ y CD8+, determinada por la expresión de CD38 y HLA-DR, se correlacionaba mejor con la progresión de la enfermedad que la carga viral ^(9,10,13,42).

Un apoyo indirecto, pero muy importante para el papel crucial de la activación inmune en la patogénesis de la infección por VIH, es proporcionado por estudios de la infección por SIV (Virus de Inmunodeficiencia del Simio) en hospederos naturales, en los cuales los altos niveles de replicación viral no son suficientes para inducir progresión de la enfermedad, en ausencia de niveles aumentados de activación inmunológica ⁽⁴³⁻⁴⁹⁾. Se han hecho múltiples estudios en los hospederos naturales del SIV; una especie de simios, los *Sooty Mangabey*, a pesar de que tienen niveles muy altos de carga viral en sangre, no desarrollan la enfermedad, mientras que otra especie, los *Macaco Rhesus*, con cargas virales igualmente altas, sí exhiben disfunción inmunológica y progresión de la enfermedad. Se encontró que los simios *Sooty Mangabey* presentaban menores niveles de

activación inmunológica que los Macaco Rhesus ⁽⁵⁰⁾, lo cual hizo pensar que existía otro mecanismo, adicional al efecto directo del virus, en la progresión de la enfermedad, y se postuló que debía ser la activación excesiva y crónica del sistema inmune.

Igualmente se han encontrado niveles mucho más bajos de activación inmunológica en los pacientes VIH+ denominados los LTNP (no progresores), los cuales son individuos que no desarrollan inmunosupresión y no presentan síntomas de SIDA, comparados con pacientes progresores que sí desarrollan la enfermedad (SIDA) ⁽⁵¹⁾.

En resumen, todo lo anteriormente mencionado evidencia el papel central de la activación inmune en la patogénesis del SIDA.

1.5. Causas de activación inmunológica en la infección por VIH

Se han enumerado varias posibles causas de esta hiperactivación inmunológica crónica en los pacientes con VIH, dentro de estas se encuentran la destrucción masiva del tejido linfóide asociado a mucosa de tracto gastrointestinal después de la infección aguda, ya mencionada previamente, la cual conlleva a translocación o paso de productos bacterianos del intestino hacia la sangre, la presencia de proteínas virales que pueden estimular directamente receptores de la inmunidad innata y así promover activación inmunológica persistente, la excesiva producción de Interferón alfa (IFN- α) por parte de las células dendríticas plasmacitoides ante la estimulación por el virus, lo que aumenta la expresión de moléculas de

activación y de moléculas de muerte en los linfocitos T CD4, lo cual lleva a apoptosis (muerte celular programada) de estas células ^(52,53).

Los niveles aumentados de Lipopolisacárido (LPS) y de DNA bacteriano en sangre sustentan la translocación microbiana que ocurre en individuos infectados con VIH, al compararlos con individuos sanos, lo mismo que en primates infectados con SIV (virus de inmunodeficiencia de los simios) en comparación con los primates no infectados ^(8,21). El LPS es el mayor componente de la pared de bacterias gram-negativas y un potente producto inmunoestimulador, puede ser cuantificado en plasma, y sus niveles en plasma son comúnmente medidos para determinar el grado de translocación bacteriana que ha ocurrido. Adicionalmente, se ha encontrado que la concentración en sangre de LPS se correlaciona de forma positiva con marcadores de activación inmunológica en sangre como IFN- α y de superficie de linfocitos T como CD38 y HLA-DR ⁽²¹⁾.

Por otro lado, se han encontrado cantidades significativamente mayores de IFN- α en tejido linfoide de pacientes con VIH al compararlos con individuos sanos. Igualmente las cantidades de IFN- α son mayores en pacientes con VIH en los cuales la enfermedad ha progresado, que en pacientes con VIH “no progresores”. Las cantidades de IFN- α son marcadamente más elevadas en pacientes infectados con VIH con infección aguda ^(54,55), lo cual puede indicar que la activación inmunológica inicia desde etapas muy tempranas en la infección por VIH.

La eliminación de células CD4⁺ por efecto indirecto de la infección viral se produce por activación crónica de células del sistema inmune la cual lleva a muerte celular inducida por activación. El mecanismo a través del cual hay una eliminación de células no infectadas es la muerte celular inducida por activación, lo cual aumenta notoriamente el recambio de linfocitos T y lleva, además a daño con fibrosis de los nódulos linfáticos ⁽⁵⁶⁻⁵⁹⁾.

1.6. Marcadores de activación inmunológica

Si bien la caracterización exacta de la activación inmune crónica asociada con VIH sigue siendo incompleta, un fenotipo de activación/disfunción es evidente para muchos tipos diferentes de células del sistema inmune en la infección por el VIH. Con respecto a las células T, la activación inmune puede ser evaluada a través de: (i) alta frecuencia de células T que expresan marcadores de activación y proliferación ⁽⁶⁰⁻⁶²⁾; (ii) altos niveles de apoptosis inducida por activación de las células T no infectadas por el virus ⁽⁶³⁻⁶⁷⁾; (iii) altos niveles de proliferación de células T ⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. La tasa más alta de proliferación en los sujetos infectados por el VIH, en comparación con personas no infectadas no se limita a las células T CD4 y CD8, también se observa en las células B, células asesinas “natural killer” (NK), astrocitos, células dendríticas y monocitos/macrófagos ⁽⁷¹⁾.

Con el panorama clásico de la evolución de la infección e inclusive con el conocimiento actual de que la infección se da en dos fases, los marcadores para medir la progresión de la infección que se han usado y que aún en la actualidad se siguen usando son el recuento de linfocitos T CD4 en sangre periférica y la carga viral en plasma. La correlación de estos dos marcadores con el estado clínico es

relativamente buena pero en muchos casos no es suficiente y la razón es porque más del 99% de las partículas virales son no infecciosas, pero pueden contribuir a las alteraciones funcionales que se producen en las células del sistema inmune y que pueden llevarlas a la muerte, aun sin estar infectadas por el virus. Y por otro lado, si bien es cierto que el virus directamente destruye linfocitos T CD4, el porcentaje de células CD4+ infectadas en sangre periférica es muy bajo para que la infección explique la eliminación de todas las células CD4+.

Para medir activación inmunológica existen múltiples marcadores que se encuentran en la superficie de las diferentes células del sistema inmune, dentro de los cuales se encuentran CD38, el antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR), CD25, Ki-67, CD69, CD70, CD86, Neoptarina, B2-microglobulina, TNFR II.

Se han estudiado los niveles de marcadores de activación inmunológica en pacientes VIH+ frente a controles sanos y se han encontrado niveles significativamente más altos en pacientes VIH+, de estos marcadores los más estudiados han sido CD38 y HLA-DR en la superficie de linfocitos T CD4+ y CD8+ ⁽⁷²⁾. Se ha encontrado además alta coexpresión de varios marcadores en la superficie de linfocitos T CD4 y CD8, principalmente de CD38 y HLA-DR ⁽⁷³⁾, la cual ha sido significativamente más alta en pacientes VIH+ que en individuos sanos.

La molécula CD38 fue descubierta a principios de la década de los 80 por Reinherz y colaboradores, es una glicoproteína de superficie de tipo II. Inicialmente fue considerada un antígeno de activación y usada principalmente en

la fenotipificación o caracterización de las leucemias ⁽⁷⁴⁾. El análisis de la expresión de la molécula CD38 en los linfocitos se ha convertido en una herramienta importante para la supervisión de los pacientes durante la infección por VIH-1 y recientemente ha sido propuesta para uso en el seguimiento de la terapia antirretroviral. El valor pronóstico de estos análisis se atribuye a la capacidad de CD38 para marcar activación inmunológica. Observaciones recientes sugieren que CD38 desempeña un papel activo en la infección por VIH-1. En sangre periférica, CD38 es expresado por células “Natural Killer” (NK), LT y LB y en una menor cantidad por plaquetas (PLT) y glóbulos rojos (GR). En LT es detectable en niveles altos en LT maduros y activados y en niveles bajos en LT quiescentes y naive, mientras que es indetectable en LT de memoria no activados. Se sabe que la molécula CD38 se comporta como una ectoenzima multifuncional, y que produce compuestos envueltos en la regulación de los niveles de calcio citoplasmático. Al parecer la función enzimática de CD38 es activa principalmente en microambientes con altas concentraciones locales de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD), como en presencia de grandes cantidades de células muriendo y liberando NAD. La molécula CD38 es altamente expresada en órganos linfoides primarios y secundarios, y en tejidos inflamados, donde ocurren niveles altos de muerte celular ⁽⁷⁴⁾.

El antígeno leucocitario humano-DR (HLA-DR) es una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase II, cuya función más importante en el sistema inmune es la de reconocimiento antigénico y señalización, Es expresada especialmente por células presentadoras de antígeno, no es expresada

constitutivamente por los LT, pero los LT activados se convierten en HLA-DR+ durante la respuesta inmune.

1.7. Marcadores de activación inmunológica y progresión de la enfermedad

En estudios realizados desde principios de los 90's y en múltiples estudios hasta la actualidad, se ha encontrado que estos marcadores de activación inmunológica están asociados con progresión de la enfermedad por VIH. Se han hecho ensayos dividiendo los pacientes VIH+ en grupos, según los niveles de linfocitos T CD4 y los niveles de estos marcadores de activación inmunológica, para luego comparar la dinámica de la progresión de la enfermedad entre los diferentes grupos. En uno de los primeros estudios se dividieron los pacientes en seis grupos, inicialmente se dividieron en tres grupos según sus niveles de linfocitos T CD4 (>500; 200-500; <200) y estos grupos a su vez se dividieron en dos subgrupos cada uno, según los niveles del marcador CD38 en la superficie de linfocitos T CD8 (>500; ≤500), y se demostró que los pacientes que tenían niveles de CD38 >500 tenían un riesgo significativamente mayor de desarrollar SIDA dentro de los siguientes 7 años, que los pacientes con CD38 ≤500 ⁽⁷⁵⁾. En otros estudios se han comparado individuos VIH- con individuos VIH+ sin enfermedad e individuos VIH+ con SIDA y se han encontrado cantidades significativamente mayores de expresión de marcadores de activación, como CD38 y HLA-DR en los individuos VIH+, y mayores aún en los individuos VIH+ con SIDA ^(11,13,76-78).

En la actualidad sabemos entonces que en la infección por VIH la activación inmunológica tiene un papel central en la inmunopatogénesis de la enfermedad. Durante la infección aguda la depleción de linfocitos T CD4 en el intestino resulta

en translocación microbiana la cual contribuye a la activación inmunológica. El virus por sí mismo también contribuye a la activación inmunológica crónica del sistema inmune innato y adaptativo, la cual lleva a depleción de linfocitos T. Estos linfocitos T activados son a su vez el blanco más importante del virus, perpetuando así la replicación viral ⁽⁷⁹⁾.

1.8. Marcadores de activación inmunológica y respuesta al tratamiento antirretroviral

También se ha encontrado relación entre los niveles de activación inmunológica y el tratamiento antirretroviral, se ha demostrado que cambios tempranos (2-4 semanas) en los niveles de activación inmunológica después del inicio de tratamiento pueden predecir el éxito que tendrá este tratamiento ⁽⁸⁰⁾. Se ha encontrado también, que los niveles de activación inmunológica disminuyen notoriamente en las primeras 4 semanas de tratamiento antirretroviral ^(14,15).

Además se ha encontrado que la supresión viral incompleta está asociada a la persistencia de niveles altos de activación inmunológica, encontrándose diferencias significativas en los niveles de marcadores de activación entre los pacientes que se encuentran con cargas virales completamente suprimidas (<50 copias) comparados con los pacientes que se encuentran con cargas virales detectables (>50 copias) ^(81,82). De igual forma, la reconstitución inmunológica incompleta está asociada con altos niveles de activación inmunológica, encontrándose niveles más altos de marcadores de activación en pacientes bajo tratamiento que tienen niveles de linfocitos T CD4 <250 células en comparación

con los pacientes que estando bajo tratamiento han alcanzado niveles de linfocitos T CD4 >250 células ⁽⁸³⁻⁸⁸⁾.

La activación inmune se establece desde muy temprano en la historia de la infección por VIH y aumenta hasta encontrar un “punto de equilibrio” ⁽¹³⁾, y es posible que el tratamiento antirretroviral altamente efectivo y constante, a la vez que mantiene supresión viral completa y niveles apropiados de CD4/CD8, modifique también de alguna manera la hiperactivación inmunológica.

En resumen, se ha encontrado asociación entre activación inmunológica y el éxito o la falla al tratamiento antirretroviral, tanto virológica o inmunológicamente.

2. HIPÓTESIS

H₁: Durante la enfermedad por VIH, los linfocitos T (LT) se encuentran activados inmunológicamente, y esta activación de LT se relaciona con el estado clínico e inmunoviroológico de la enfermedad (carga viral y recuento de LT CD4+) y la necesidad de tratamiento antirretroviral y/o la respuesta a este tratamiento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar el estado de activación inmunológica de los linfocitos T en pacientes VIH+ en la fase crónica de la infección en pacientes con o sin tratamiento antirretroviral.

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1. Objetivo específico 1:

Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T activados, según la expresión de los marcadores de superficie celulares CD38 y HLA-DR, en la etapa crónica de la infección con VIH-1.

3.2.2. Objetivo específico 2:

Determinar si existen variaciones de los marcadores de activación inmunológica en la fase crónica de la infección VIH-1 que se relacionen con el desenlace clínico, inmunoviroológico o terapéutico.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Tipo de estudio y diseño experimental

Este trabajo se realizó en el contexto de un proyecto de investigación en el que se examinaron diferentes marcadores de activación inmunológica en linfocitos T en individuos adultos con diagnóstico de infección crónica por VIH y su relación con estado clínico e inmunoviológico y la respuesta al tratamiento ARV. Se trató de un estudio descriptivo de corte transversal que analizó dos marcadores de activación inmunológica en la superficie celular, las moléculas CD38 y HLA-DR, en las subpoblaciones de LT (CD4+ y CD8+) en sangre periférica, de cuatro grupos de pacientes con infección por VIH-1 con diferentes estadios clínicos e inmunoviológicos, “naive” a la terapia o con tratamiento antirretroviral.

La muestra se seleccionó de la población de pacientes que se encuentran bajo atención integral especializada ambulatoria de la Corporación de Lucha Contra el Sida, con diagnóstico confirmado de infección por VIH con y sin tratamiento antirretroviral. Los voluntarios se dividieron en cuatro grupos de estudio, dos grupos sin exposición previa (“naive”) a la terapia antirretroviral, uno de los cuales tenía buen control inmunoviológico de la infección (ARV-Naive) y el segundo grupo tenía indicación de inicio inmediato de terapia ARV (Inicia-ARV); los otros dos grupos estaban bajo tratamiento ARV, uno con buen control de la infección (ARV-Exitoso) y el otro en falla terapéutica (ARV-Falla). Como grupo control de los niveles normales de activación inmunológica se incluyeron individuos VIH negativos (VIH-), que compartían características sociodemográficas similares a los

cuatro grupos de estudio. Acorde a los criterios de selección se definieron los potenciales participantes para cada grupo, se hizo la selección aleatoria correspondiente y a los elegidos potenciales que conformarían dichos grupos posteriormente se les invitó a participar de manera voluntaria y con firma del consentimiento informado (anexo 1). Se obtuvo consentimiento informado escrito de todos los voluntarios y el Protocolo fue aprobado por los Comités de Ética Humana Institucionales de la Corporación de Lucha contra el Sida y de la Universidad del Valle.

Mediante análisis de Citometría de flujo se determinó la expresión de moléculas de activación inmunológica CD38 y HLA-DR en las sub-poblaciones de linfocitos T CD4+ y TCD8+ de sangre periférica. Se realizó una medición basal (inclusión al estudio) a todos los participantes y un seguimiento a corto plazo (por seis meses) solamente a los dos grupos de pacientes que no tenían terapia ARV previa al momento de la inclusión. Específicamente una nueva medición a los seis meses al grupo en estadio menos avanzado sin indicación de terapia ARV (ARV-Naive) y dos mediciones, a los tres y seis meses, posterior al inicio de terapia ARV en el otro grupo. Los resultados presentados en este estudio corresponden al análisis de línea de base en todos los grupos del estudio.

Se hizo una correlación entre los valores de las células activadas encontradas, la evolución clínica y la respuesta al tratamiento, considerando los marcadores convencionales tales como la carga viral y los recuentos de Linfocitos T CD4 y linfocitos T CD8. Además se consideraron en el análisis otras variables, incluyendo las sociodemograficas y las clínicas relacionadas con la infección VIH,

como el tiempo desde el diagnóstico de la infección por VIH, el estado de la enfermedad al momento del diagnóstico y otras variables relacionadas con el tratamiento antirretroviral como el tiempo bajo tratamiento ARV y tipo de tratamiento. Todas las variables del estudio fueron registradas en un formato de recolección de datos (CRF).

La toma de muestras se realizó en el punto de atención de la Cruz Roja Colombiana Seccional Valle, localizado dentro de las instalaciones de la Corporación de Lucha Contra el Sida. Las muestras de sangre fueron tomadas por una auxiliar de laboratorio entrenada para tal fin, por punción venosa con aguja múltiple y sistema de tubos al vacío Vacutainer™BD para la toma simultánea tanto de las muestras para el estudio como de las muestras requeridas para los demás exámenes de seguimiento y control de la infección por VIH.

Para los análisis de Citometría de flujo se utilizaron muestras de sangre total anticoagulada con EDTA K₃ y para las cargas virales se utilizaron tubos PPT™BD. Los análisis de FACS para detectar las moléculas biomarcadoras de activación inmunológica en los linfocitos fueron procesados por encargo en el Centro de Análisis Molecular-CAM en Bogotá. Las muestras de sangre fueron transportadas y procesadas dentro de máximo 48 horas después de su colección.

4.2. Consideraciones Éticas

Se cumplió con la normatividad vigente sobre investigación en humanos, el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética para Investigación en Humanos de

la Corporación de Lucha contra el Sida (IRB00005732; acta No. 026 de Septiembre 20 de 2012) y por el Comité Institucional de Revisión de Ética en Humanos (CIREH) de la Universidad del Valle (acta No. 018-012 de Noviembre 14 de 2012), los cuales están regidos según la normatividad colombiana (Resolución 8430 de 1993 y otras que la complementen o modifiquen). Todos los voluntarios participantes firmaron el formato de Consentimiento Informado (anexo 1) y a todos se les diligenció un formato de recolección de datos (CRF) (anexo 2). La estudiante de maestría llevó a cabo la inclusión de los elegibles, asignándolos a cada uno de los grupos correspondientes. Luego a los potenciales elegidos se les invitó a participar de manera voluntaria y con firma del consentimiento informado. El potencial conflicto de interés, en cuanto a que uno de los investigadores, Dr. Jaime Galindo, es el Director Científico de la Corporación, y la estudiante de maestría e investigadora principal es una de los médicos tratantes de los pacientes, se manejó y minimizó dado que tanto la información referente al estudio, la invitación a participar y la aplicación del consentimiento informado fueron realizados por la Enfermera Jefe o uno de los asesores integrales de la Corporación quienes no son parte del equipo de la investigación, ni tienen una relación directa en el tratamiento, ni las conductas a seguir con los pacientes (para evitar la relación de subordinación) pero sí garantizar la confidencialidad de los pacientes.

Los costos de la investigación, toma de exámenes de laboratorio, así como análisis de las muestras por parte del Centro de Análisis Molecular de Bogotá (CAM), fueron asumidos en su totalidad por la Corporación de Lucha Contra el

sida, con el apoyo metodológico del director de tesis de la Universidad del Valle. Para el análisis de las muestras se contó con carta de compromiso del CAM (anexo 3).

4.3. Sujetos del estudio

Los análisis fenotípicos de los linfocitos T se realizaron en 96 pacientes con diagnóstico de infección por VIH y 29 individuos VIH negativos. El tamaño de muestra se calculó con base en criterios estadísticos y según datos de la tabla 2 (71), se estableció un tamaño global de muestra probabilística de 125 pacientes, el tamaño de muestra mínimo calculado según datos porcentuales promedio de expresión CD38, fue mínimo de 20 pacientes por cada grupo, considerando una diferencia mínima de 8.6 entre grupos, un poder del 80%, un nivel de confianza del 95%, y teniendo en cuenta un 20% esperado de deserción, la muestra final correspondió a 25 pacientes por cada grupo.

Tabla 2. Comparación de las frecuencias relativas (%) y densidad media (MFI) de la expresión de CD38 en linfocitos T CD4+ y LT CD8+ de pacientes VIH+ que no han recibido terapia antirretroviral y de controles normales.

Source of cells (n)	Phenotype	CD38 expression	
		%	MFI
Normal (31)	CD4	71.6 ± 7.8	518.9 ± 106.9
HIV-1 (20)	CD4	79.2 ± 11.1 [#]	885.3 ± 291.5*
Normal (31)	CD8	70.3 ± 11.3	312.4 ± 94.9
HIV-1 (20)	CD8	89.8 ± 5.0*	847.4 ± 324.1*

Note. * $P < 0.0001$ when compared with normal, [#] $P < 0.05$ when compared with normal.

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios generales de inclusión para seleccionar los individuos VIH+ del estudio:

Pacientes VIH+, mayores de 18 años, atendidos en la Corporación de Lucha Contra el Sida, en fase crónica de la infección y diferentes estados clínicos e inmunoviológicos de su enfermedad, con o sin tratamiento antirretroviral que aceptaron voluntariamente participar y firmaron el consentimiento informado, en el cual se especificó a cuál de los grupos ingresaría el participante según el cumplimiento de los criterios de inclusión específicos de cada grupo.

Los criterios de inclusión del grupo control de individuos VIH negativos:

Personas mayores de 18 años, con diagnóstico negativo por prueba rápida para VIH, que compartían características socio demográficas similares a los grupos a los grupos de pacientes con infección por VIH.

Criterios de exclusión:

Mujeres en estado de embarazo mayor a doce semanas documentado por concepto médico-ginecológico y exámenes de laboratorio, debido a las modificaciones transitorias que el embarazo mismo puede ocasionar sobre el sistema inmune.

Para los propósitos del estudio, los voluntarios se agruparon en cinco categorías o grupos de acuerdo al estadio clínico e inmunoviológico, según los dos marcadores clásicos de monitoreo de la infección VIH (carga viral y recuento de LT CD4+), y de acuerdo a la exposición previa a los medicamentos antirretrovirales, así:

Grupo ARV-Naive: Pacientes VIH+ en fase crónica sin tratamiento previo con medicamentos antirretrovirales (ARV), y con carga viral menor de 10.000 copias/mL y recuento absoluto de LT CD4 ≥ 500 células/mm³, que no tuvieran indicación para iniciar tratamiento ARV (según las guías Colombianas de manejo del VIH/SIDA).

Grupo Inicia-ARV: Pacientes VIH+ con recuento de LT CD4 < 500 células/mm³, sin exposición previa a terapia ARV y que requerían iniciar su tratamiento ARV inmediatamente.

Grupo ARV-Exitoso: Pacientes VIH+ bajo tratamiento ARV constante exitoso por lo menos durante 1 año, con carga viral < 400 copias y conteo de linfocitos CD4 > 350 células/mm³.

Grupo ARV-Falla: Pacientes VIH+ con tratamiento ARV y falla virológica en los últimos seis meses (con carga viral > 800 copias/mL).

Grupo VIH (-): Personas VIH negativas acompañantes/visitantes de pacientes que asistían a las instalaciones de la Corporación o personas de la comunidad que participan en las campañas de promoción y prevención, organizadas por la Corporación para la búsqueda activa del VIH, con diagnóstico negativo para VIH, que compartían características socio demográficas similares a los otros cuatro grupos.

La selección de los pacientes en los diferentes grupos estuvo a cargo de la estudiante de maestría de acuerdo a los criterios de inclusión para cada grupo. Fueron incluidos 24 pacientes en el grupo ARV-Naïve, 32 pacientes en el grupo de

pacientes que inició ARV, 23 pacientes en el grupo de pacientes VIH+ que se encontraban bajo tratamiento ARV exitoso, 17 pacientes en el grupo de pacientes que se encontraba bajo tratamiento ARV en falla terapéutica y 29 individuos control VIH negativos.

4.4. Metodología de laboratorio

Los recuentos tanto en porcentaje como los valores absolutos de las diferentes sub-poblaciones de linfocitos se realizaron por Citometría de Flujo. Se empleó el sistema MultiTEST™ TruCOUNT™ BD, (catálogo BD 340491) empleado de rutina para la cuantificación de linfocitos T CD3+, linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en el seguimiento de pacientes con infección por VIH. El sistema MultiTEST™ BD incluye los siguientes anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos y específicos a los antígenos de membrana celular en los linfocitos:

Anticuerpo monoclonal Anti-	Fluorocromo marcador
CD45	PerCP
CD3	FITC
CD4	APC
CD8	PE

Para determinar los marcadores de activación CD38 y HLA-DR en los linfocitos se utilizaron los siguientes anticuerpos específicos acoplados con un fluorocromo:

Anticuerpo monoclonal Anti-	Fluorocromo marcador
CD 38	PeCy7
HLA-DR	V450

El sistema incluye la utilización de tubos TruCOUNT™ BD los cuales mediante perlas fluorescentes de concentración conocida permiten obtener valores

absolutos de las poblaciones celulares estudiadas. Los anticuerpos identifican las moléculas blanco en la superficie celular de los linfocitos. El procesamiento de tinción de las muestras se realizó en un equipo FACS TMSPA III (SamplePrepAssistant III) BD el cual automáticamente mezcla y dispensa la sangre completa agrega los anticuerpos y realiza las incubaciones establecidas. Se empleó sangre completa y un protocolo con lisis de eritrocitos y sin lavado “Lyse / No Wash”.

La adquisición y análisis de las muestras procesadas se realizó en un equipo FACSCanto II® BD el cual dispone de 3 laser y permite la valoración simultánea y multiparamétrica de los 6 fluorocromos incluidos en el procedimiento. Para el análisis de las sub-poblaciones de linfocitos CD45, CD3, CD4 y CD8 se empleó el programa de aplicaciones clínicas FACSCANTOTMBD el cual incluye los módulos para esta aplicación clínica con algoritmos de selección de poblaciones pre-establecidos y mecanismos de control de calidad integrados. Para el análisis de las sub-poblaciones de linfocitos T CD4 y T CD8 activados se utilizó el programa FACSDivaTMBD.

De manera resumida, la estrategia de análisis incluyó inicialmente la selección de la población de linfocitos por tamaño (SSC sidescatter), granularidad (FSC forward scatter) y fluorescencia CD45+ (Figura 2, Panel A). A partir de esta población se seleccionó la región con la población de linfocitos T (células CD3+ o LT), para posteriormente estimar en los LT CD4 o LT CD8 el porcentaje de positividad para las moléculas de activación inmunológica CD38 o HLA-DR o su coexpresión. Los valores se expresaron como los porcentajes de células positivas para cada

marcador sobre el total de LT CD4+ o de LT CD8+. Los valores absolutos de las subpoblaciones de LT positivos para los marcadores, se calcularon teniendo en cuenta las perlas de TruCount™ con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{\# Eventos población de interés}}{\text{\# Eventos de perlas adquiridas}} \times \frac{\text{Perlas TruCount Totales}}{\text{Volumen de muestra (50 } \mu \text{L)}}$$

Adicionalmente, se estimó la intensidad media de fluorescencia (MFI) para cada marcador de activación en las subpoblaciones de células positivas, como un indicativo de la cantidad expresada de estas moléculas sobre la superficie celular.

Se determinó la viabilidad celular en todas las muestras mediante tinción con 7AAD, el cual penetra y marca células muertas o en proceso de muerte celular, para verificar que los análisis de citometría de flujo se realizaron consistentemente en células viables en todos los grupos de comparación.

Control de calidad

El procedimiento, desde la toma y transporte de la muestra con instructivos y recomendaciones específicas establecidas (anexo 4) hasta la emisión de los informes y resultados de laboratorio se integró dentro del programa de aseguramiento de la calidad establecido en el Centro de Análisis Molecular. Se utilizaron perlas Calibrite™ BD y perlas APC™ BD para la calibración y verificación del FACSCanto II. Se realizaron los controles internos establecidos. El

control de calidad externo se realizó con paneles de pro-eficiencia del Colegio Americano de Patólogos-CAP en el cual el CAM está inscrito.

La estudiante de maestría e investigadora principal bajo la dirección de la directora de tesis planeó los experimentos de citometría que fueron solicitados por encargo al CAM y verificó las tinciones y revisó e interpreto todos los análisis de FACS remitidos por el laboratorio. También coordinó el proceso de trabajo de campo y la obtención de las muestras, y de todos los datos necesarios para el estudio, los cuales consignó en un cuestionario de recolección de información (Anexo 2); Además, llevó a cabo la selección de los participantes, obtuvo el consentimiento informado para el ingreso al estudio y realizó el seguimiento de los participantes en las correspondientes citas de control. La estudiante realizó acompañamiento permanente al proceso de análisis estadístico de los resultados que llevó a cabo el estadístico-epidemiólogo del proyecto.

4.5. Análisis estadístico

4.5.1. Gerencia y análisis de datos

La naturaleza confidencial de los datos fue mantenida usando números únicos de identificación de pacientes (UIP). Los UIP identificaron todos los formatos de la investigación. La lista de nombres de pacientes y UIP fue mantenida por separado en un gabinete seguro y solamente el equipo de investigación de la Corporación tuvo acceso a esta lista.

4.5.2. Plan de análisis de datos

Se realizó un análisis descriptivo inicial para las variables de estudio según su escala de medición, utilizando medidas de tendencia central, dispersión y frecuencias.

Para determinar si la presencia o la magnitud de los linfocitos T (LT) activados de sangre periférica durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA estaba relacionada con variables clínicas, virológicas e inmunológicas, se compararon los porcentajes de LT expresando los marcadores de activación inmunológica CD38 o HLA-DR entre los diferentes grupos de estudio. Las medias de fenotipos de linfocitos T se compararon entre los grupos de estudio. Con el fin de determinar el uso de test estadísticos paramétricos o no paramétricos en la comparación de los grupos de las variables cuantitativas del estudio, se evaluó si estas seguían una distribución normal, para lo cual se aplicó el test de normalidad de datos de Shapiro-Wilk.

Para los análisis del primer objetivo específico (Cuantificar las subpoblaciones de linfocitos T activados, según la expresión de los marcadores de superficie celulares CD38 y HLA-DR, en la etapa crónica de la infección con VIH-1) se cuantificó la proporción de linfocitos T activados, el nivel de expresión de marcadores superficiales de activación inmune celular en la etapa crónica de la infección con VIH-1. En primer lugar se hizo un análisis descriptivo de los valores de los marcadores basales, porcentajes y nivel de expresión. Se compararon los niveles o cantidad de las moléculas de activación inmune (valor MFI, promedios de intensidad de fluorescencia) expresadas por cada sub población de linfocitos y la proporción de las subpoblaciones de LT positivas para estas moléculas, entre los

grupos de estudio, mediante pruebas de ANOVA paramétrico o prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, según la distribución estadística de cada variable.

Análisis para el cumplimiento del segundo objetivo específico (Determinar si existen variaciones de los marcadores de activación inmunológica en la fase crónica de la infección VIH-1 que se relacionen con el desenlace clínico, inmunoviroológico o terapéutico). Se tuvieron en cuenta los valores de tendencia central de cada grupo según su distribución y se analizaron curvas ROC para determinar la exactitud de cada subpoblación celular inmunológicamente activada para distinguir o identificar cada grupo del estudio (AUC, área bajo la curva). Adicionalmente, se buscó determinar valores de corte de estos marcadores inmunológicos con la mejor sensibilidad, especificidad y razones de probabilidad (LR+, LR-) para caracterizar los desenlaces o estados clínicos e inmunoviroológicos considerados del estudio.

A través del estadístico no paramétrico de correlación de Spearman se correlacionó los valores de marcadores inmunológicos (valores absolutos, porcentajes de células positivas y niveles de expresión de cada molécula [MFI- Intensidad media de fluorescencia]) con el conteo absoluto y porcentaje de LT CD4+ y la carga viral.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa STATA versión 12.0. Todas las pruebas fueron de 2-colas y la significancia se consideró cuando $P \leq 0.05$. Para el caso de pruebas post-anova de variables que no tenían una distribución normal se utilizó el test no paramétrico de U-Mann-Whitney y el nivel de significancia se

ajusto por el método de Bonferroni ($\alpha = 0.05 / \text{número de comparaciones}$) lo cual permite tener un valor de α corregido para guiar la interpretación de los resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Descripción de los individuos de estudio

Se incluyeron un total de 125 individuos, de los cuales 96 fueron pacientes con diagnóstico de infección por VIH y 29 fueron individuos VIH negativos. La tabla 3 muestra las características demográficas y clínicas de los individuos incluidos en el estudio de acuerdo al grupo de análisis.

Con respecto a las características socio demográficas entre los grupos de estudio, la única diferencia estuvo en la edad. Aunque todos los individuos VIH+ estaban entre la tercera y cuarta década de su vida, el promedio estimado de edad de los dos grupos con tratamiento ARV (ARV-Exitoso o ARV-Falla) fue mayor que el de los otros dos grupos sin tratamiento ARV. Además, el grupo control VIH negativo tuvo un promedio de edad significativamente menor comparado con los pacientes VIH+.

En cuanto al estadio de la enfermedad al momento del diagnóstico de la infección por VIH, todos los individuos del grupo ARV-Naive estaban en estadio no avanzado de la enfermedad y permanecieron así hasta la inclusión al estudio, mientras que solo un 25% de pacientes en el grupo que requería iniciar tratamiento antirretroviral (Inicia-ARV) fueron diagnosticados en un estadio avanzado de su enfermedad, pero al momento de la inclusión al estudio todos tuvieron indicación de inicio de tratamiento. Por el contrario, en los grupos que ya

se encontraban bajo tratamiento aproximadamente la mitad de estos pacientes fueron diagnosticados ya en fase SIDA. Los pacientes sin tratamiento ARV fueron en su mayoría los de más reciente diagnóstico, entre menos de uno y tres años. Mientras que los individuos de los dos grupos con tratamiento ARV el diagnóstico de la infección VIH mas reciente había ocurrido al menos un año atrás pero en la mayoría hacía 3 o más años.

Tabla 3: Características demográficas y clínicas de los pacientes del estudio

	Grupo					Sig**
	VIH+ ARV- Naive (n=24)	VIH+ inicia ARV (n=32)	VIH+ ARV exitosa (n=23)	VIH+ ARV- Falla (n=17)	VIH negativos (n=29)	
Edad***	33,3(9,9)	31,7(9,5)	41,7(11,1)	38,8(10,9)	29,8(9,4)	0,0003
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)	
Sexo ***						
Masculino	14(58%)	22(69%)	15(65%)	12(71%)	23(79%)	0,578
Femenino	10(42%)	10(31%)	8(35%)	5(29%)	6(21%)	
Diagnostico inicial (CDC)***						
No avanzado (A1,A2,B1,B2)	24(100%)	24(75%)	11(48%)	6(38%)		<0.001
Avanzado (A3,B3,C1,C2,C3)	0(0%)	8(25%)	12(52%)	10(62%)		
Tiempo de Diagnóstico***						
< 1año	6(25%)	19(59%)	0(0%)	0(0%)		<0.001
1- 3 años	10(42%)	11(35%)	5(22%)	8(47%)		
> 3 años	8(33%)	2(6%)	18(78%)	9(53%)		
Tiempo de Tratamiento ARV***						
1- 3 años	-	-	7(30%)	10(59%)		0.108
> 3 años	-	-	16(70%)	7(41%)		
LT CD4+ (valor absoluto)***	678,4(170,3)	266,6(157,6)	551,1(153,7)	200(211,2)	967,5(344,8)	0,0001
LT CD8+ (valor absoluto)***	912,2(344,8)	884,3(358,2)	822(293,3)	727,9(299,9)	612,5(245,4)	0,0029
Log₁₀ CV (copias/mL)***	2,67(1,10)	4,39(0,7)	-1,3(0,99)	3,72(0,54)	ND	0,0001

ARV= Terapia antirretroviral ; * Conteo absoluto ** Significancia Test chi-2, test Fisher-exact, test Kruskal-Wallis significancia general; ND= No detectable; DE=Desviación estándar.

***variables expresadas en valores Promedio

La mayoría de pacientes en tratamiento ARV exitoso habían empezado el tratamiento al menos 3 años atrás (70%), comparado con la mayoría de los individuos en falla terapéutica, quienes tenían menos tiempo con el tratamiento.

Los marcadores inmunoviroológicos de rutina usados para monitorear la infección (LT CD4+, LT CD8+ y carga viral VIH plasmática) fueron significativamente diferentes entre los grupos. No hubo diferencias significativas entre los valores de LT CD4+ entre los grupos ARV-Naive y ARV-Exitoso, los cuales fueron recuentos normales y fueron los de mayor similitud con los niveles en el grupo control VIH negativo. La replicación viral, estimada por la carga viral plasmática, estuvo también exitosamente controlada en estos dos grupos anteriores. En contraste, los recuentos de LT CD4+ fueron significativamente más bajos y las mayores cargas virales fueron consistentes con la necesidad de inicio de la terapia en el grupo que tuvo indicación de inicio de tratamiento (Inicia-ARV) o la falla terapéutica persistente del grupo en ARV-Falla. No se encontró diferencias en la proporción de pacientes por línea de tratamiento en los dos grupos con medicamentos antirretrovirales que pudiera explicar las diferencias en la respuesta al tratamiento. Tanto en el grupo bajo tratamiento antirretroviral exitoso como en el grupo en falla al tratamiento la mayoría de pacientes se encontraban en primera línea de tratamiento antirretroviral (61% y 65% respectivamente) y el resto se encontraban en tratamiento de segunda o tercera línea, sin encontrarse diferencias significativas entre estos dos grupos ($p=0.744$).

5.2. Frecuencia de LT activados durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA, de acuerdo al control inmunoviroológico de la infección y al estadio clínico.

El porcentaje de viabilidad de linfocitos T en todos los grupos de estudio osciló entre 75% y 100% (promedio 95.2%, IC95%:94.33%-95.97%), valores aceptables para estudios de fenotipificación por FACS. No se encontró ninguna correlación entre los porcentajes de viabilidad celular y los marcadores de activación inmunológica que pudiera sugerir que los resultados en los valores de estas moléculas de superficie celular estuvieran afectados por diferencias en la viabilidad celular entre los grupos.

5.2.1. Expresión de la molécula CD38 en los LT de pacientes VIH+ en la fase crónica de la infección

El porcentaje de LT (LTCD4+ o LTCD8+) expresando la molécula CD38 fue significativamente mayor en los grupos de pacientes VIH positivos sin control inmunoviroológico (Inicia-ARV o ARV-Falla) comparado con los individuos VIH positivos con un buen control de la carga viral y niveles normales de LT CD4+ debido a un tratamiento antirretroviral exitoso o los naïve al tratamiento pero en fase crónica no avanzada (ARV-Naive) (Figura 2 Panel B y Figura 3 Panel A y B). Específicamente, el porcentaje promedio de LT CD4+CD38+ distinguió a los casos que requirieron iniciar terapia ARV (promedio 68.6;IC95%:63.9-73.4) o a los casos con falla terapéutica persistente (promedio 64.7;IC95%:55.9-73.4) de los casos ARV-Naive con buen control inmunoviroológico (promedio 58.1;IC95%:52.6-63.5) o de los pacientes exitosamente tratados con buena respuesta al tratamiento ARV

(promedio 54.8; IC95%:51.0-58.6) (Figura 2 Panel B y Figura 3 Panel A). Aunque el grupo en falla terapéutica tuvo mayores niveles de linfocitos T CD4+ activados (CD38+) que el grupo con tratamiento ARV exitoso, la diferencia entre estos dos grupos no alcanzó significancia estadística.

La magnitud de activación inmunológica de los LT CD4+ de acuerdo al marcador CD38 en los pacientes exitosamente tratados fue muy similar a la expresada por los individuos VIH negativos (promedio 49.7; IC95%:45.2-54.0), sugiriendo que la terapia ARV fue capaz de modular el fenotipo de activación inmunológica de estos linfocitos en la fase crónica avanzada de la infección.

Muy similar a los resultados obtenidos con los LT CD4+CD38+, unos mayores porcentajes de LT CD8+CD38+ fueron observados en los pacientes sin terapia ARV con un pobre control de la replicación viral y más bajos recuentos de LT CD4 (Inicia-ARV) o con terapia ARV pero falla terapéutica (Figura 2, Panel B y Figura 3, Panel B). Igualmente la terapia ARV pareciera disminuir los niveles elevados de LT CD8+CD38+ encontrados en sujetos con indicación de terapia ARV hasta los valores esperados en individuos sanos (VIH-), debido a que los pacientes con terapia ARV prolongada y excelente control de la infección tuvieron niveles de estas células tan bajos como los individuos control sin infección por el VIH. La molécula CD38 en los LT CD8+ fue un mejor marcador de activación inmunológica en el grupo con falla al tratamiento antirretroviral que los LT CD4+CD38+, dado que significativamente distinguió a este grupo del grupo con terapia ARV exitosa. Adicionalmente, una observación importante con este subtipo de linfocitos (LT CD8+), al contrario de los LT CD4+, fue que se observó una frecuencia

significativamente mayor de células CD38+ en el grupo de pacientes naive a la terapia y buen control de la infección (ARV-Naive) (promedio 67.1;IC95%:61.9-72.3) comparados con los valores casi normales alcanzados por pacientes en estadios más avanzados pero tratados exitosamente con los medicamentos antirretrovirales (promedio 52.2;IC95%:47.9-56.5). Este hallazgo sugiere que de acuerdo a la expresión de la molécula CD38, cambios en la activación inmunológica de los LT CD8 precederían a los cambios en la activación inmunológica y pérdida de los LT CD4+, en la fase crónica. Por lo tanto, la molécula CD38 en los LT CD8+ podría ser un mejor y más temprano biomarcador de disfunción inmunológica y falla virológica que el recuento de LT CD4+ usado de rutina en la clínica.

Igualmente, el nivel de expresión de la molécula CD38 (valor MFI) en cualquiera de los dos subtipos de LT distinguió a los individuos VIH positivos sin control inmunoviroológico (Inicia-ARV o ARV-Falla) de los pacientes con un buen control de la replicación viral y adecuados recuentos de LT CD4+ con o sin tratamiento antirretroviral (Tabla 4).

Resumiendo los resultados más relevantes de la evaluación de la molécula CD38, la expresión de este marcador de activación inmunológica en los linfocitos T, (Figuras 2, Figura 3 y Anexo 5 Tabla 1), parece predecir el descenso en el recuento de los LT CD4+ y la necesidad de iniciar tratamiento antirretroviral. Lo anterior debido a que se observaron mayores porcentajes de LTCD38+ y más altos niveles de esta molécula en los pacientes VIH+ ARV-Naive en estadios de la infección menos avanzados y sin indicación de tratamiento (según el recuento de

LT CD4+) comparados con individuos sanos o reconstituidos exitosamente con la terapia ARV por varios años. Consecuentemente, los niveles significativamente más altos de LT CD38+ se encontraron en los pacientes con mayor progresión de la enfermedad previo al inicio de la terapia ARV.

Por otra parte, la expresión de CD38 en Linfocitos T CD8+ o CD4+ también pareciera ser un buen marcador de seguimiento de la terapia ARV, debido a que se encontraron diferencias en la expresión de este marcador entre los pacientes del grupo bajo tratamiento antirretroviral exitoso y los pacientes del grupo con falla en su tratamiento antirretroviral. Mientras que durante tratamiento ARV exitoso mínimo por un año los valores de LT CD4+CD38+ o LTCD8+CD38+ alcanzaron valores similares a los de individuos VIH negativos, por el contrario cuando hay falla terapéutica documentada recientemente y hasta máximo 6 meses antes la activación inmunológica medida por el marcador CD38 es de mayor magnitud.

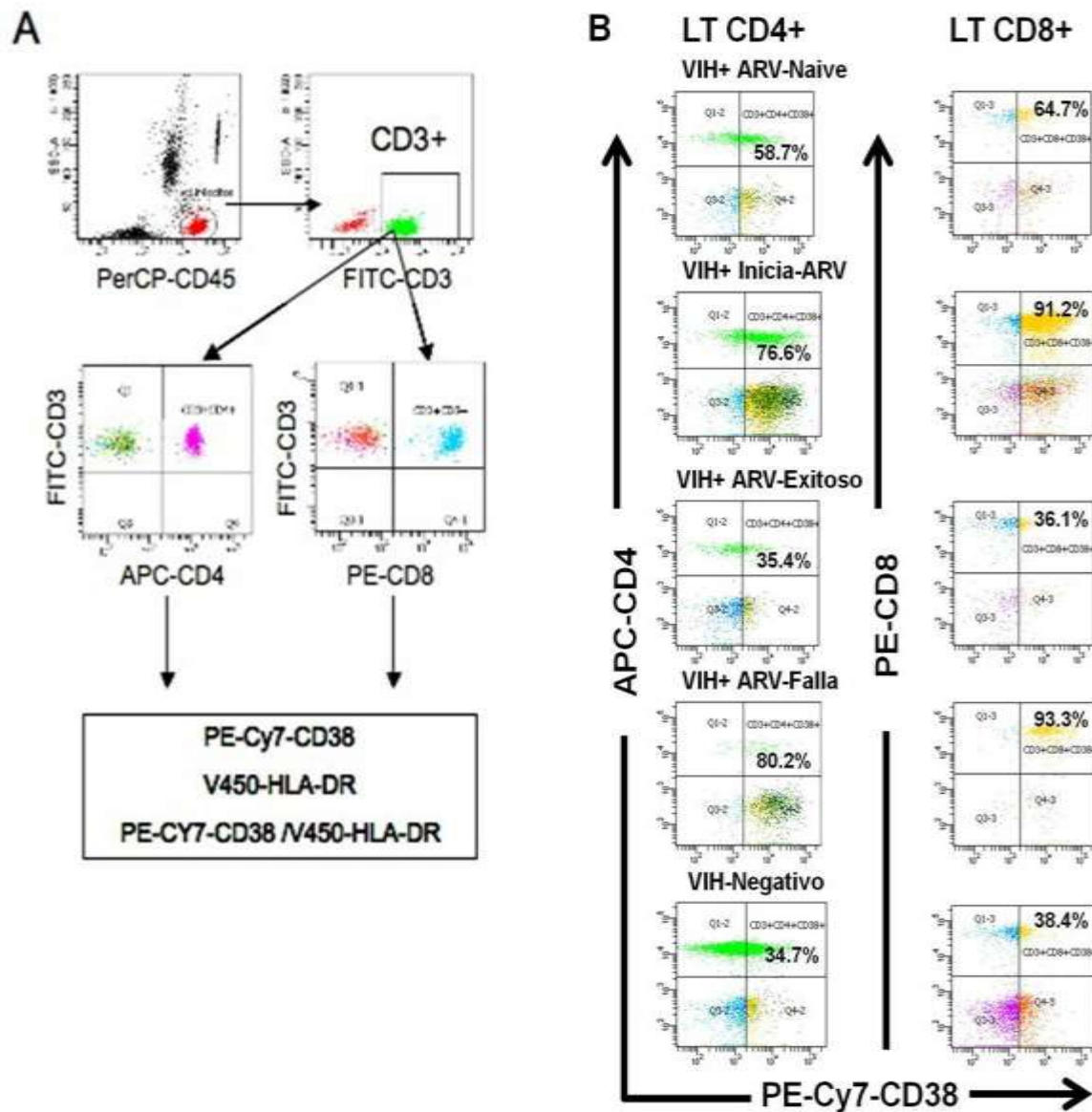


Figura 2. Análisis FACS de la expresión de la molécula CD38 en los linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+. Estrategia de análisis de los marcadores de activación en la superficie celular (Panel A) y Porcentaje de linfocitos CD38+ en un individuo representativo de cada grupo del estudio (Panel B).

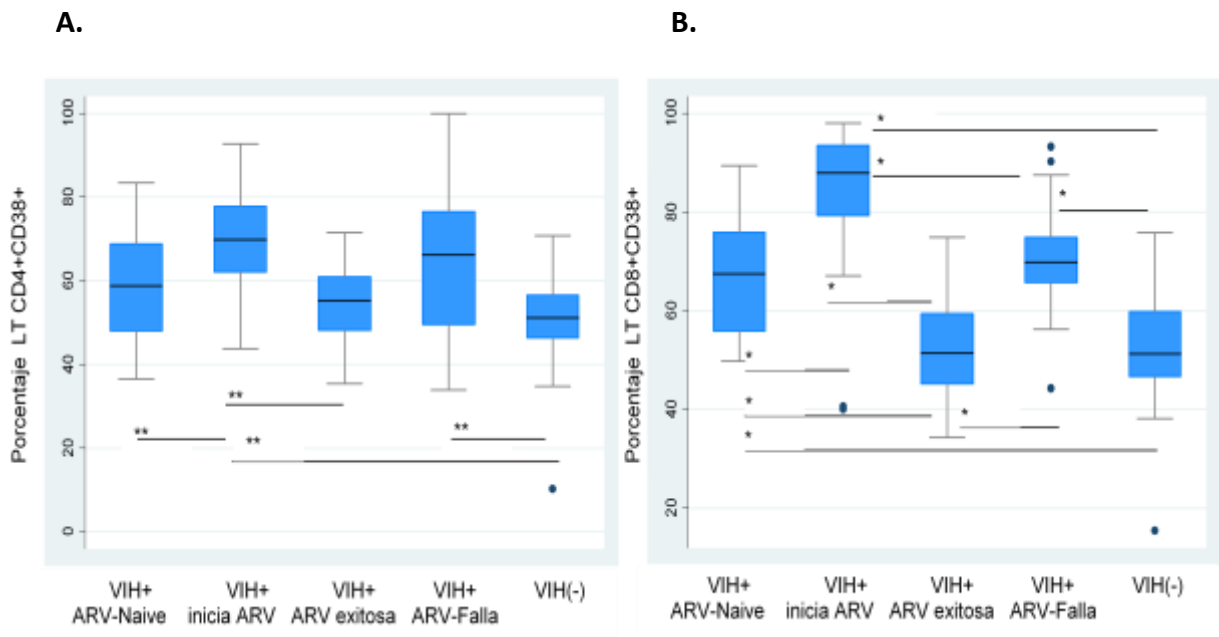


Figura 3. Mayor frecuencia de LT CD38+ en la infección con VIH se relaciona con pobre control de la replicación viral y enfermedad avanzada. Frecuencia de LT CD4+CD38+ (Panel A) y LT CD8+CD38+ (Panel B) de acuerdo al grupo de estudio. Los valores extremos corresponden a outliers. Valores p según prueba estadística Mann-Whitney post-anova con ajuste de Bonferroni: ** $p < 0,024$ en los LT CD4+CD38+; * $p < 0,0005$ en los LT CD8+CD38+.

5.2.2. Expresión de la molécula HLA-DR en los linfocitos T durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA

Similar a los hallazgos encontrados con el marcador CD38, se encontró que los pacientes en falla al tratamiento ARV y los pacientes sin tratamiento antirretroviral previo, pero que requerían iniciarlo, tenían significativamente mayor activación inmunológica medida por el porcentaje de LT HLA-DR+, comparado con los pacientes en fase crónica naiva a la terapia con un buen control inmunoviológico o los pacientes que se encontraban bajo tratamiento antirretroviral exitoso (Figura

4, panel A y Figura 5). Por el contrario, los grupos de pacientes con control inmunoviroológico con o sin medicamentos ARV tenían porcentajes de LT HLA-DR+ más bajos, siendo los LT CD4+HLA-DR+ de los dos grupos anteriores o los LT CD8+HLADR+ del grupo con terapia ARV tan bajos como los individuos VIH negativos, sugiriendo una relación entre el control de la replicación viral y muy bajos niveles de activación inmunológica (Figura 4 Panel A; Figura 5 A y B).

A diferencia del marcador CD38, la expresión de la molécula HLA-DR en los LT CD8+ no discriminó a los pacientes naive a la terapia y estadios menos avanzados (aunque los valores fueron más bajos) de los casos que estaban en estadios más avanzados y necesitaron iniciar tratamiento. Por lo tanto, la molécula HLA-DR no parece ser un mejor marcador predictor de la pérdida de LT CD4+ y deterioro inmunológico que la molécula CD38, pero si un potencial biomarcador para el seguimiento del tratamiento antirretroviral. Por otro lado la expresión de HLA-DR en los LT CD8+, al igual que con la molécula CD38, también fue significativamente mayor en el grupo naive a tratamiento que en el grupo reconstituido inmunológicamente por el tratamiento ARV y con valores normales de los dos marcadores de activación inmunológica. Este último resultado sugiere que tanto la frecuencia de LT CD8+HLA-DR+ como de LT CD8+CD38+ en individuos VIH positivos podrían ser predictores mas tempranos de progresión que el descenso en los LT CD4 usado convencionalmente.

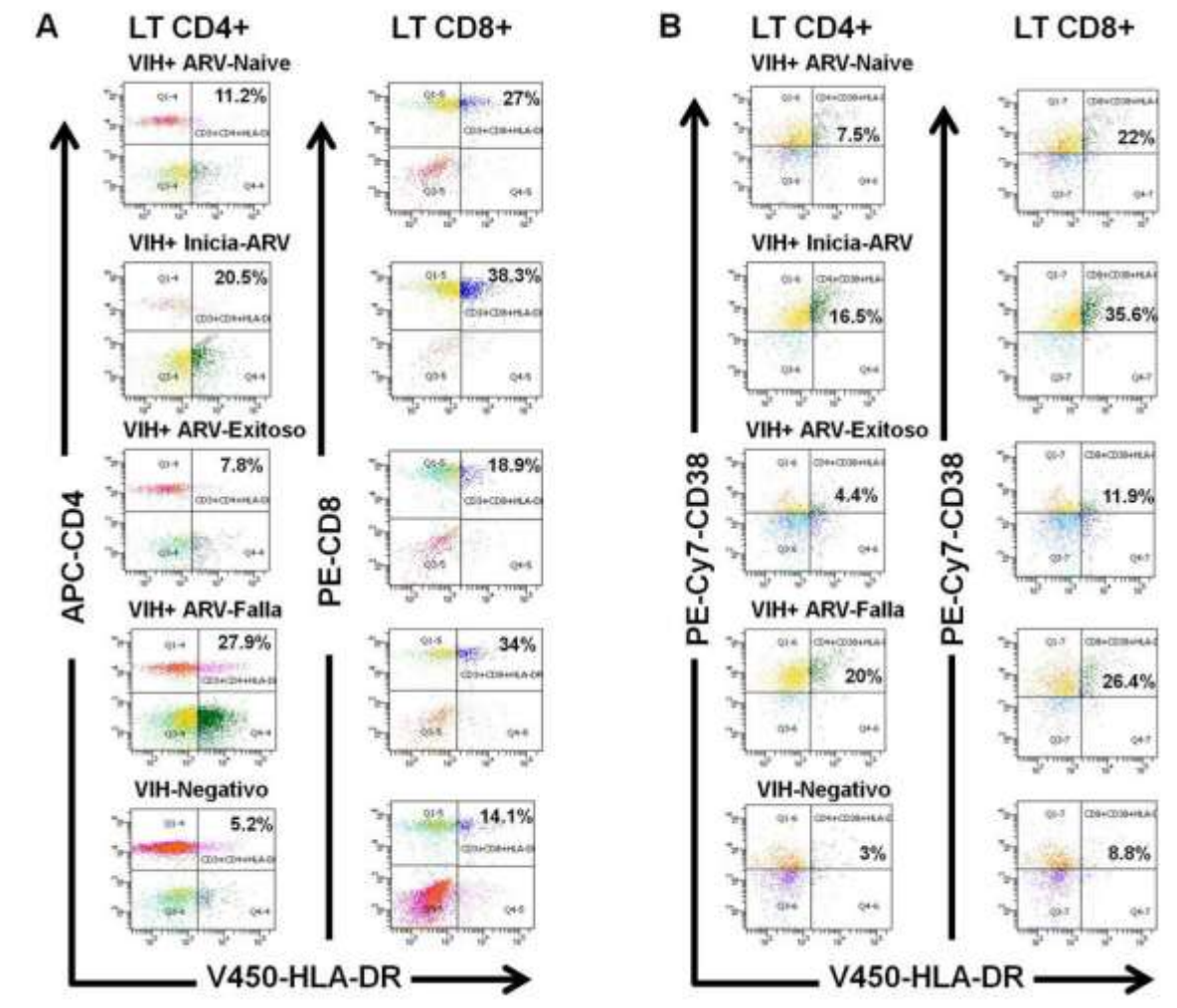
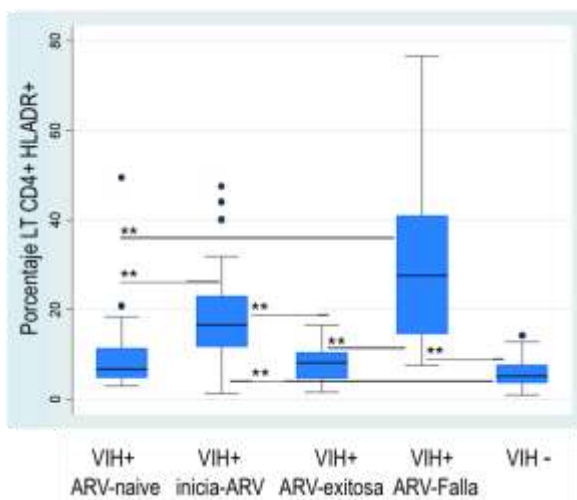


Figura 4. Análisis FACS de la expresión de la molécula HLA-DR (Panel A) y co-expresión de las moléculas HLA-DR y CD38 (Panel B) en los linfocitos T CD4+ o LTCD8+. Diagrama dot plot de los marcadores en un individuo representativo por cada grupo de estudio.

Panel A.



Panel B.

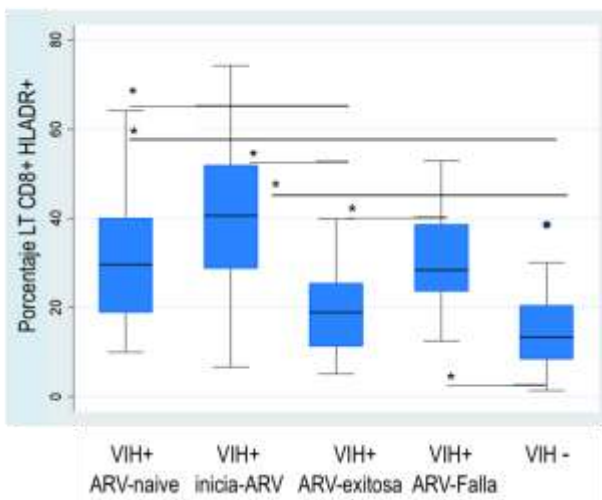


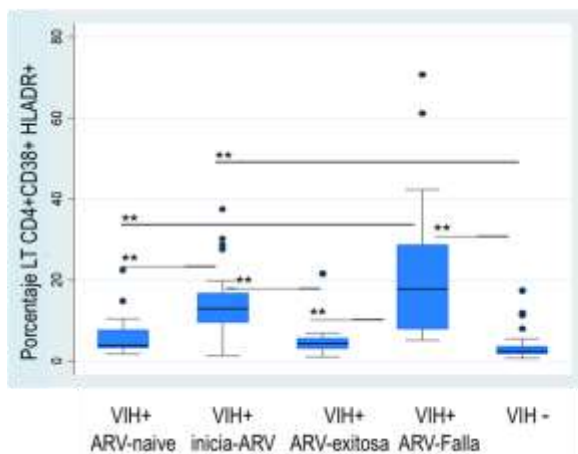
Figura 5. Mayor frecuencia de LT HLA-DR+ en la infección crónica con VIH se relaciona con pobre control de la replicación viral y enfermedad avanzada. Frecuencia de LT CD4+HLA-DR+ (Panel A) y LT CD8+HLA-DR+ (Panel B) en dos grupos naive a la terapia ARV y dos grupos en tratamiento antirretroviral con diferentes desenlaces clínicos e inmunoviológicos y un grupo control VIH negativo. Valores p según prueba estadística Mann-Whitney post-anova con ajuste de Bonferroni: $**p \leq 0,0001$ en los LT CD4+CD38+; $*p \leq 0,004$ en los LT CD8+CD38+.

5.2.3. Co-expresión de las moléculas CD38 y HLA-DR en los linfocitos T (LT CD38/HLA-DR doblemente positivos) durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA.

La frecuencia de linfocitos T que co-expresaron ambos marcadores de activación inmunológica, CD38/HLA-DR, aunque presentes en más bajos porcentajes que los LT expresando una sola de las dos moléculas, también fueron significativamente diferentes entre los grupos de pacientes VIH+ (Figura 4 Panel B y Figura 6 , Panel A y B).

El porcentaje promedio de cualquiera de los dos subtipos (CD4+ o CD8+) de LT CD38+HLA-DR+ doblemente positivos fue menor en el grupo de los pacientes nave para el tratamiento antirretroviral y un buen control inmunoviológico de la infección comparado con el grupo naive con indicación de inicio de tratamiento (Anexo 5 tabla 1). Por otra parte, este doble marcador de activación inmunológica distinguió el grupo de pacientes con tratamiento exitoso del grupo de los tratados con falla (ARV-Exitoso promedio 12.55; IC95%:9.97-15.13, Grupo ARV-Falla, promedio 24.11;IC95%:19.22-28.99). Los pacientes VIH+ inmunológicamente reconstituidos y con control exitoso de la replicación viral por la terapia antirretroviral exhibieron niveles de estos linfocitos T doblemente positivos tan bajos como los presentes en los individuos VIH negativos (Figura 6).

Panel A.



Panel B.

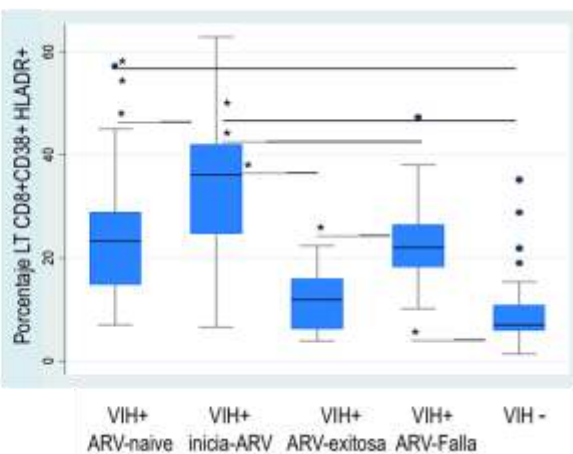


Figura 6. Co-expresión de las moléculas CD38 y HLA-DR en los linfocitos T (LT CD38/HLA-DR doblemente positivos) durante la fase crónica de la infección VIH/SIDA. Valores p según prueba estadística Mann-Whitney post-anova con ajuste de Bonferroni: ** $p \leq 0,0047$ en los LT CD4+CD38+; * $p \leq 0,002$ en los LT CD8+CD38+.

El otro grupo VIH+ con control inmunoviroológico apropiado de la infección pero sin tratamiento ARV previo, tuvo también bajos porcentajes de LTCD4+ CD38+/HLA-DR+ doblemente positivos similares a los controles sin infección VIH. Esto contrasta con unos valores significativamente más elevados de sus LT CD8+ co-expresando estas moléculas. Este hallazgo sugiere que al igual que la expresión individual de la molécula CD38, su co-expresión con la molécula HLA-DR parece ocurrir mas tempranamente sobre los LT CD8+ que en los LT CD4 en el transcurso de la fase crónica, y previo al deterioro de los LT CD4 a nivel de sangre periférica. Esta observación en todos los fenotipos de LTCD8+ activados inmunológicamente (CD38+ o HLA-DR+ o CD38+/HLADR+) confirma que las moléculas CD38 y/o HLA-DR en los LTCD8+ podría ser un potencial biomarcador para predecir la progresión y la necesidad de inicio de terapia antirretroviral.

Consistente con los porcentajes de células positivas, los niveles de expresión de la molécula CD38 (valores MFI) también estuvieron más elevados en los LT CD8+ CD38+/HLA-DR+ doblemente positivos de los casos VIH+ naive a la terapia o con falla terapéutica comparado con los casos exitosamente tratados o control VIH negativos (Tabla 4). Sin embargo esta diferencia solo alcanzó significancia estadística entre los dos grupos sin terapia ARV. No se encontró ninguna diferencia en el nivel de expresión (MFI) de la molécula HLA-DR en las células doblemente positivas para los marcadores inmunológicos entre los grupos de estudio.

Tabla 4. Niveles de expresión (Intensidad media de fluorescencia o MFI) de las moléculas CD38+ y/o HLA-DR en los linfocitos T CD4 o CD8 en la fase crónica de la infección con VIH-1 en individuos con o sin tratamiento antirretroviral.

	VIH+ ARV-Naïve (n=24)		VIH+ inicia ARV (n=32)		VIH+ ARV exitosa (n=23)		VIH+ ARV-Falla (n=17)		VIH negativos (n=29)		Sing*
Variables	Media	IC95%	Media	IC95%	Media	IC95%	Media	IC95%	Media	IC95%	
MFI de CD38 en LT CD4+CD38+	8295.33	7232.65-9358.01	11131.14 ^a	9793.38-12468.91	8617.78	5326.18-11909.38	15779.53 ^a	9130.83-22428.23	11046	6522.24-15569.76	0.0001
MFI de HLA-DR en LT CD4+HLA-DR+	7594.58	6781.89- 8407.28	7686.88	6877.48-8496.27	7543.35	6817.16-8269.54	9361.25	6876.21-11846.29	7160.23	6408.66-7911.89	0.5671
MFI CD38 en LT CD4+CD38+HLA-DR+	19451.67	15856.21-23047.13	23685.5	18604.23-28766.77	24025.22	8893.67-39156.76	25869.06	16180.13-35557.99	40581.79	19154.65-62008.93	0.1061
MFI de HLA-DR en LT CD4+CD38+HLA-DR+	9019.04	7785.62-10252.46	8383.22	7294.36-9472.08	9277.04	8039.22-10514.86	10878.13	8260.93-13495.32	8490	7517.54-9462.46	0.4118
MFI de CD38 en LT CD8+CD38+	8196.42 ^c	7055.59-9337.25	13100 ^b	11196.67-15003.33	6626.478	3214.90-10038.05	8991.71 ^c	7324.88-10658.53	12899.76	5353.16- 20446.35	0.0001
MFI de HLA-DR en LT CD8+HLA-DR+	6128.87	5643.39-6614.35	6255.53	5756.37-6754.69	5630.35	5100.60- 6160.09	6255.06	5581.06-6929.06	6002.45	5309.55-6695.34	0.1829
MFI de CD38 en LT CD8+CD38+HLA-DR+	14208.58	12207.45- 16209.71	20141.22 ^d	17308.98-22973.46	15328.87	5647.33- 25010.41	15947.94	12673.28-19222.6	32548.07	15590.23- 49505.9	0.0007
MFI de HLA-DR en LT CD8+CD38+HLA-DR+	6774.58	6228.41-7320.76	6701.53	6194.96-7208.11	6538.61	5973.54-7103.68	7054.65	6235.02-7874.28	7095.38	6422.71- 7768.05	0.8602

*significancia test Kruskal-Wallis. a) Grupos VIH+ inicia ARV y VIH+ ARV-Falla diferentes de VIH+ ARV-Naïve, VIH+ ARV exitosa y VIH negativos ($p<0.004$). b) Grupo VIH+ inicia ARV diferente de todos los grupos ($p<0.0025$) c) grupos VIH+ ARV-Naïve y VIH+ ARV-Falla diferentes de VIH+ ARV exitosa y VIH negativos ($p<0.003$). d) Grupo VIH+ inicia ARV diferente de VIH+ ARV-Naïve, VIH+ ARV exitosa ($p<0.003$). MFI= Media de Intensidad de fluorescencia

5.3. Correlación de los marcadores de activación inmunológica con el nivel de LT CD4+, y la carga viral plasmática.

Para determinar si la magnitud de la activación inmunológica de los linfocitos T, medida por los marcadores CD38 y HLA-DR, se relaciona con las variables de la rutina clínica usadas para monitorear los paciente y explorar potenciales biomarcadores tempranos de progresión o falla al tratamiento, se determinó la correlación entre los niveles de carga viral y LT CD4+ y LT CD8+ con los niveles de las subpoblaciones de LT activados inmunológicamente que tuvieron diferencias significativas entre grupos.

La mayoría de los marcadores de activación inmunológica evaluados presentaron correlación moderada o alta con las variables de la rutina clínica para supervisión inmunológica y virológica de la enfermedad (Tabla 5 y Figura 7), y con la frecuencia de LTCD8+ (dato no mostrado). Sin embargo ni el porcentaje LT CD8+HLA-DR+ o el porcentaje de los LT CD8+CD38+HLA-DR+ o LT CD4+CD38+, ni la Intensidad media de fluorescencia (MFI) de la molécula CD38 en los LT CD8+CD38+HLA-DR+ se asoció con los niveles de LT CD4+, aunque el aumento de todos estos marcadores se asocio con altos niveles de replicación viral VIH en estos pacientes.

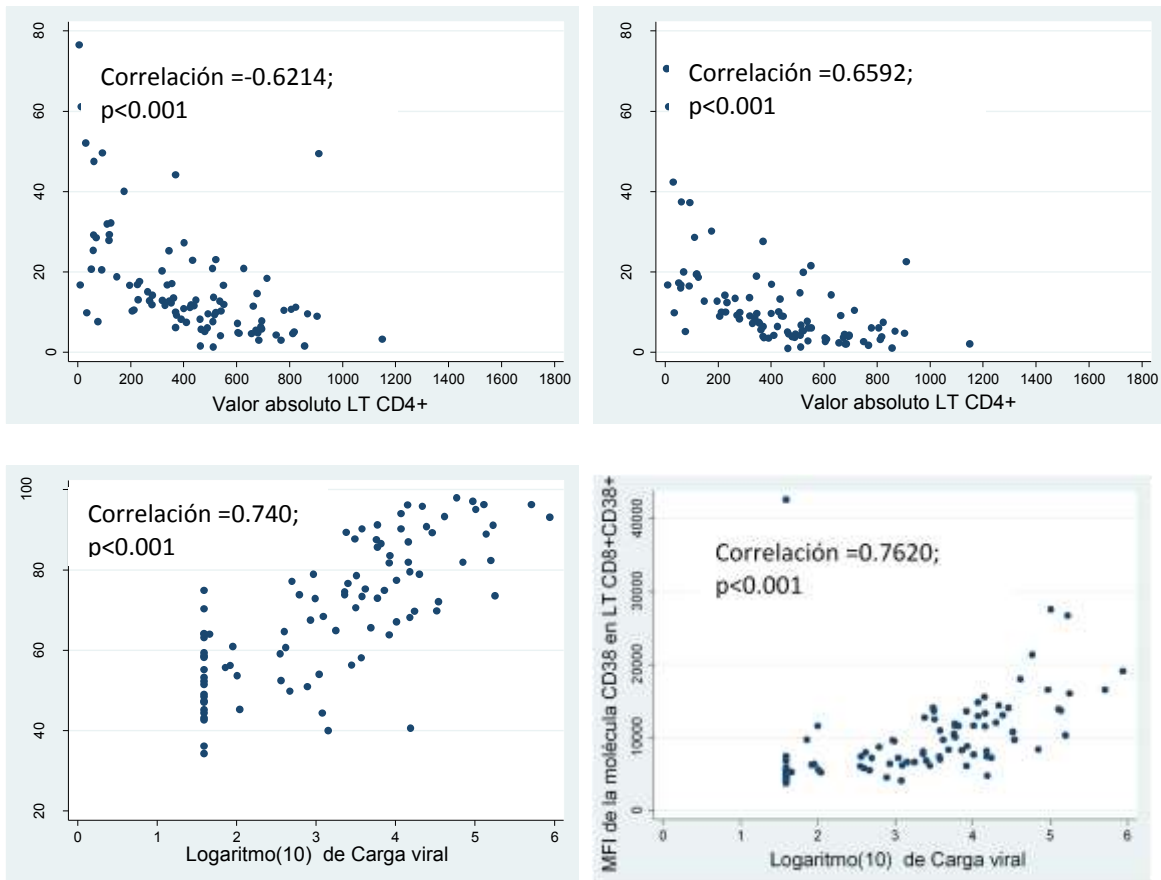


Figura 7. Niveles aumentados de las subpoblaciones de LT activados inmunológicamente se correlacionan con altos niveles de replicación del VIH y bajos recuentos de LT CD4+ en la fase crónica de la infección con VIH-1. Correlación: Coeficiente de correlación de Spearman.

Tabla 5. Correlación de marcadores de activación inmunológica con variables conteo de LT CD4 y carga viral.

Variables*	Valor absoluto		Carga viral	
	LT CD4+		(logaritmo)	
	Coefficiente correlación	Sign.	Coefficiente correlación	Sign.
Porcentaje LT CD4+CD38+	-0.3963	<.001	0.4940	<0.001
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD4+CD38+	-0.5623	<0.001	0.5919	<0.001
Porcentaje LT CD4+HLA-DR+	-0.6214	<0.001	0.5416	<0.001
Porcentaje LT CD4+CD38+HLA-DR+	-0.6592	<0.001	0.6237	<0.001
Porcentaje LT CD8+CD38+	-0.4957	<0.001	0.7400	<0.001
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD8+CD38+	-0.4780	<0.001	0.7620	<0.001
Porcentaje LT CD8+HLA-DR+	-0.2299	0.0242	0.4990	<0.001
Porcentaje LT CD8+CD38+HLA-DR+	-0.2953	0.0035	0.6280	<0.001

**se consideran correlaciones significativas con valor de correlación superior a 0.5 y significancia<0.005. sign=Significancia correlación. Test estadístico Coeficiente de correlación de Spearman*

5.4. Desempeño diagnóstico o exactitud (Area under ROC curve [AUC]) de los marcadores de activación inmunológica en LT para identificar correctamente cada grupo de pacientes VIH+

Se evaluaron curvas ROC para medir el desempeño diagnóstico o exactitud (Áreas bajo la curva [AUC]) de los valores de LT activados para discriminar los pacientes del estudio con una mejor condición clínica e inmunoviológica de los pacientes con alteraciones inmunoviológicas. Además se determinó la sensibilidad y especificidad, razones de probabilidad (LR+, LR-) de los porcentajes de LT activados o niveles de expresión de las moléculas CD38 o HLA-DR a valores de punto de corte seleccionados. El propósito fue seleccionar de manera preliminar los valores de referencia o puntos de corte indicativos de activación inmunológica potencialmente relevantes en la práctica clínica, que puedan ser usados a futuro como biomarcadores predictores de progreso o falla al tratamiento en nuestros pacientes. Se compararon los grupos con niveles mayores de activación inmunológica VIH+ ARV-Naive, VIH+ que inician ARV y VIH+ ARV que estaban en falla con el grupo de pacientes VIH+ con ARV exitosa, usado como referencia debido a que fue el grupo de mejor control inmunoviolológico y de mayor similitud en su bajo nivel de activación inmunológica a los individuos VIH(-). En la tabla 6 se resume la exactitud o Área bajo la curva ROC (AUC) de los marcadores de activación inmunológica más relevantes y en la figura 8 las gráficas de Curvas ROC de los marcadores inmunológicos con la mayor exactitud para distinguir cada uno de los grupos del estudio. La evaluación de la habilidad diagnóstica (Curvas ROC y Área bajo la curva AUC) de las subpoblaciones de linfocitos T inmunológicamente activados para identificar cada uno de los grupos del estudio,

mostró que los niveles de LT CD8 activados tuvieron una alta exactitud (ROC-AUC > 0.85) para diferenciar correctamente cerca del 90% de los pacientes VIH+ naïve a la terapia con o sin control inmunoviológico o los pacientes con falla terapéutica de los pacientes VIH+ reconstituidos por la terapia ARV exitosa. (Tabla 6 y figura 8). Otro resultado muy importante fue que los niveles de expresión de la molécula CD38,, al contrario de los biomarcadores actuales de monitoreo de la enfermedad, tienen una excelente habilidad para distinguir a los pacientes naïve a la terapia de los pacientes bajo terapia ARV exitosa o individuos VIH negativos. La MFI de la molécula CD38 en LTCD8, el porcentaje de LT CD8+CD38+, el porcentaje de LT CD8+CD38+HLA-DR+, el porcentaje de LT CD8+HLA-DR+, el porcentaje de LT CD4+CD38+HLA-DR+ y el porcentaje LT CD4+HLA-DR+ clasificaron correctamente los grupos con mayor deterioro clínico e inmunológico (Inicia-ARV y ARV-Falla). En la figura 8 se muestran las curvas ROC y el desempeño diagnóstico (AUC; sensibilidad, especificidad y razones de probabilidad) a valores de corte con la mejor combinación de sensibilidad y especificidad de los principales marcadores de activación inmunológica asociados con progresión en la fase crónica de la infección VIH en ausencia o presencia de terapia ARV.

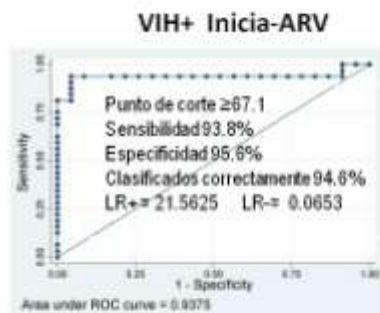
Tabla 6. Desempeño diagnóstico o exactitud (Area under ROC curve [AUC]) de los marcadores de activación inmunológica en LT para identificar correctamente cada grupo de pacientes VIH+ con o sin terapia ARV en diferentes estadios clínicos e inmunoviológicos.

Variables de activación	VIH+ ARV-Naive	VIH+ que inician ARV	VIH+ ARV en falla
MFI de la molécula CD38 enLTCD8+CD38+	AUC=0.8841 Std. Err.=0.0569 [95% CI 0.7725 - 0.9956]	AUC=0.9348 Std. Err.=0.0460 [95% CI 0.8447 - 1.000]	AUC=0.8798 Std. Err.=0.0670 [95% CI 0.7485 - 1.000]
Porcentaje LT CD8+CD38+	AUC=0.8225 Std. Err.=0.0597 [95% CI 0.7054 - 0.9395]	AUC= 0.9375 Std. Err.=0.0401 [95% CI 0.8589 - 1.000]	AUC=0.8977 Std. Err.=0.0575 [95% CI 0.7851 - 1.000]
Porcentaje LT CD8+CD38+HLA-DR+	AUC=0.8179 Std. Err.=0.0614 [95% CI 0.6976 - 0.9382]	AUC=0.9572 Std. Err.=0.0280 [95% CI 0.9022 - 1.000]	AUC=0.8772 Std. Err.=0.0580 [95% CI 0.7635 - 0.9910]
Porcentaje LT CD8+HLA-DR+	AUC=0.7455 Std. Err.=0.0720 [95% CI 0.6044 - 0.8865]	AUC=0.9035 Std. Err.=0.0411 [95% CI 0.8229 - 0.9842]	AUC=0.7852 Std. Err.=0.0734 [95% CI 0.6413 - 0.9290]
Porcentaje LT CD4+CD38+HLA-DR+	AUC=0.5344 Std. Err.=0.0873 [95% CI 0.3632 - 0.7056]	AUC= 0.9348 Std. Err.=0.0460 [95% CI 0.8447 - 1.000]	AUC=0.9361 Std. Err.=0.0398 [95% CI 0.8582 - 1.000]
Porcentaje LT CD4+CD38+	AUC=0.5897 Std. Err.=0.086 [95% CI 0.4212 - 0.7582]	AUC=0.8560 Std. Err.=0.0523 [95% CI 0.7535 - 0.9585]	AUC=0.6829 Std. Err =0.0936 [95% CI 0.4993 - 0.8664]
MFI la molécula CD38 en LT CD4+CD38+	AUC=0.6304 Std. Err.=0.0834 [95% CI 0.4670 - 0.7939]	AUC=0.8451 Std. Err.=0.0610 [95% CI 0.7256 - 0.9646]	AUC=0.8389 Std. Err.=0.0707 [95% CI 0.7002 - 0.9775]
Porcentaje LT CD4+HLA-DR+	AUC=0.4855 Std. Err.=0.0871 [95% CI 0.3148 - 0.6562]	AUC=0.8825 Std. Err.=0.0475 [95% CI 0.7894 - 0.9756]	AUC=0.9253 Std. Err.=0.0442 [95% CI 0.8386 - 1.000]
Área bajo la curva ROC (AUC) Exactitud diagnóstica	Excelente Exactitud AUC >0.87	Buena Exactitud AUC >0.81 – 0.86	Moderada o Baja Exactitud AUC >0.75- 0.8

A. IMF CD38 en LT CD8+CD38+



B. Porcentaje LT CD8+ CD38+



C. Porcentaje LT CD8+CD38+HLA-DR+



D. Porcentaje LT CD4+CD38+HLA-DR+

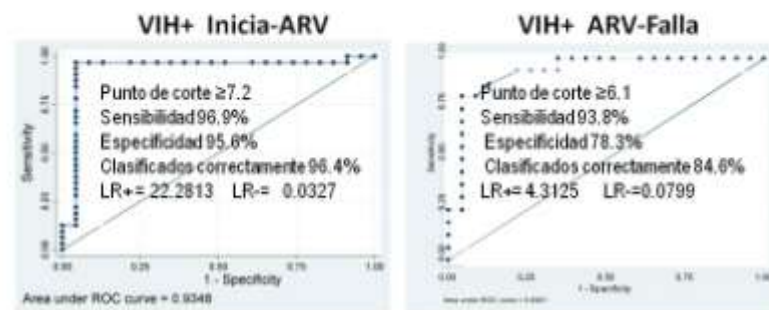


Figura 8. Curvas ROC y habilidad diagnostica de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ y LT CD4+ activados, a seleccionados valores de puntos de corte, para identificar pacientes VIH+ en diferentes fases de progresión crónica de la infección. $LR+$ = Razón de probabilidad positiva $LR-$ = Razón de probabilidad negativa.

6. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo confirman que durante la etapa crónica de la infección VIH se presenta un incremento en la activación inmunológica de los LT, especialmente en los pacientes sin buen control inmunoviroológico de la infección, independientemente del tratamiento ARV. Así mismo los resultados sugieren de manera importante el control o disminución de la activación de LT con el tratamiento antirretroviral exitoso, llegando a niveles muy similares a los de individuos sin infección por VIH. Se comprobó adicionalmente que existe correlación significativa entre los marcadores usados habitualmente para seguimiento de estos pacientes (carga viral plasmática y conteo de LT CD4+) y la activación inmunológica de LT. Aunque la correlación fue mucho más consistente con la carga viral. Un resultado muy interesante de este estudio fue encontrar que en individuos VIH-1+ en fase crónica, un aumento de la frecuencia de los LT CD8+ activados inmunológicamente parece preceder a los cambios en el número absoluto o activación inmunológica de los LT CD4+.

La activación de los LT durante la etapa crónica de la infección por VIH-1 logró demostrarse por un mayor porcentaje de LT que expresan las moléculas de superficie CD38 y/o HLA-DR en comparación con individuos VIH negativos, confirmando observaciones previas ^(89,90).

Adicionalmente se logró demostrar que los niveles de activación inmunológica medida por estas dos moléculas son mayores en pacientes VIH positivos en estadios más avanzados con indicación de tratamiento antirretroviral, estos resultados también concuerdan con estudios realizados previamente, en los cuales generalmente se comparan pacientes progresores que requieren inicio de tratamiento antirretroviral con pacientes no progresores que no requieren tratamiento antirretroviral, y encuentran diferencias significativas en los niveles de activación inmunológica ^(11,16,89). Aunque la mayoría de estos estudios han sido realizados comparando individuos no progresores (LTNP) o controladores élite ^(16,91,92) con valores similares a los individuos VIH negativos ^(89,91,92), con los pacientes que si progresan. En contraste, como un valor agregado de nuestro estudio, el grupo de comparación fueron pacientes con control inmunoviológico (LT CD4+ >500 células/ml) pero en progreso de su enfermedad pues a pesar de no requerir tratamiento antirretroviral según las guías Colombianas, no tenían CV tan bajas o indetectables como los no progresores (carga viral < 2000 copias/ml) o los controladores elites (cargas virales por debajo de los niveles de detección) de otros estudios. Consistente con algún nivel de evolución de su enfermedad crónica estos pacientes se diferenciaron en algunos marcadores de activación de los individuos VIH negativos.

Encontramos similitud entre individuos naive para tratamiento ARV pero que tenían buen control inmunoviológico y los individuos que se encontraban controlados gracias al tratamiento ARV exitoso solo para los marcadores de activación inmunológica medidos en LT CD4+. En cambio para la expresión de

estos marcadores, CD38, HLA-DR o ambos en los LT CD8+ si se encontraron diferencias entre estos dos grupos, teniendo mayor activación inmunológica los pacientes VIH+ en estadios menos avanzados sin tratamiento, indicando que estos marcadores en la superficie de los LT CD8+ podrían preceder a la caída de LT CD4+ y a la necesidad de inicio de tratamiento antirretroviral según los marcadores convencionales. Lo anterior podría ser explicado debido a que los LT CD8+ son las células más importantes en la respuesta inmune antiviral, y en este caso al VIH ⁽¹²⁾, y por este motivo ser los primeros en activarse. De hecho en la infección por VIH hay un incremento marcado en el conteo de LT CD8+ en sangre, y así mismo gran alteración de la relación CD4+/CD8+, lo cual explicaría en parte la activación inmunológica más temprana de los LT CD8+ comparada con los LTCD4+. Adicionalmente la activación más tardía de los LT CD4+ también podría ser explicada por infección directa de los LT CD4+ en estadios más tardíos de la enfermedad, cuando se ha perdido el control de la replicación viral, teniendo además que el virus del VIH-1 hacía etapas más avanzadas de la enfermedad cambia su tropismo y se torna más linfotrópico (infecta mayormente LT CD4+) ⁽³³⁻³⁶⁾.

Teniendo en cuenta estos hallazgos se realiza seguimiento a corto y a mediano plazo de los pacientes en estados menos avanzados de este estudio (según carga viral y conteo de LT CD4+) para confirmar si las variaciones de los LT CD8+ activados predicen el descenso en el recuento de los LT CD4+ y de esta manera proponer el inicio del tratamiento antirretroviral independientemente del recuento de LT CD4+.

Por otra parte, se demostró que existen diferencias significativas en los niveles de activación de LT medida por las moléculas CD38 y HLA-DR entre los pacientes en estadios avanzados con diferente respuesta clínica y virológica al tratamiento antirretroviral. Estos resultados son consistentes con estudios previos ⁽⁹³⁻⁹⁵⁾, en los que, al igual que en el presente estudio, se ha encontrado significativamente menor activación de LT en pacientes bajo tratamiento antirretroviral exitoso, la cual se aproxima o es similar a la de individuos VIH negativos ^(89,93), comparados con los pacientes que se encuentran en falla virológica ^(80,92,95). Aunque los estudios previos han sido realizados en pacientes con falla virológica solamente, mientras que en el presente estudio la mayoría de los pacientes que se encontraban en falla al tratamiento tenían falla tanto virológica como inmunológica.

Estos hallazgos podrían indicar que la activación inmunológica de LT se controla con el tratamiento antirretroviral y podría ser reversible hasta valores similares en individuos VIH negativos. Así mismo, se realiza seguimiento de la activación inmunológica después del inicio del tratamiento ARV para evaluar la rapidez en el descenso de estos marcadores y si la cinética de normalización de sus niveles a corto (6 meses) y posiblemente más largo plazo, depende de los niveles iniciales de los marcadores CD38+ y/o HLA-DR de cada paciente o de otros factores. Previamente se ha demostrado que el efecto del tratamiento antirretroviral sobre la activación inmunológica ocurre tempranamente después del inicio de tratamiento ⁽⁸⁵⁻⁸⁸⁾.

Como era de esperarse ^(56,96-98) los niveles de activación inmunológica se correlacionaron en este estudio principalmente con los niveles de carga viral. Se ha propuesto que el virus directa o indirectamente es el responsable de la activación inmunológica crónica en pacientes con infección por VIH ⁽⁷⁹⁾, y además la efectividad de la terapia ARV para disminuir la replicación viral se correlaciona con la disminución en los marcadores de activación inmunológica.

Un aporte muy importante de este estudio es que se realizaron mediciones de curvas ROC ^(99,100) para evaluar la exactitud diagnóstica de la activación de LT para diferenciar los pacientes que se encuentran bien controlados bajo tratamiento antirretroviral exitoso de los pacientes sin tratamiento antirretroviral o de los pacientes con tratamiento pero en falla terapéutica. Pudimos demostrar que la activación de LT CD8+ discrimina muy bien estos pacientes. Un hallazgo que consideramos muy importante es que consistente con los análisis descriptivos discutidos arriba, específicamente la expresión de la molécula CD38 en los LT CD8+ tiene una excelente habilidad para diferenciar los pacientes en estados crónico menos avanzado, según niveles de carga viral y LT CD4+, de los pacientes exitosamente tratados con niveles de activación inmunológica muy similares a la de los sujetos sanos, pero esta diferenciación no es posible si se tienen en cuenta sólo los marcadores convencionales usados para monitorizar la enfermedad. Por esto es posible que este marcador sea mejor para predecir progresión de la enfermedad y necesidad de tratamiento más tempranamente.

7. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este trabajo son consistentes con la hipótesis de que durante la enfermedad por VIH, los linfocitos T (LT) se encuentran activados y que esta activación de LT se relaciona con el estado clínico e inmunoviroológico de la enfermedad (carga viral y recuento de LT CD4+) y con la necesidad de tratamiento antirretroviral y/o la respuesta a este tratamiento.
2. La activación de LT, medida con las moléculas CD38 y HLA-DR, es un buen marcador de progresión de la enfermedad y de respuesta al tratamiento antirretroviral.
3. La activación inmunológica de LT CD8+, de acuerdo a los marcadores CD38 y/o HLA-DR precede a las alteraciones fenotípicas de estos mismos biomarcadores inmunológicos en los LT CD4+ y se anticipa a los cambios cuantitativos en los LT CD4+, que es el biomarcador de elección actual para decisiones clínicas y terapéuticas en estos pacientes.
4. Los niveles de la molécula CD38 sobre los LT CD8+ (valores MFI) tienen la mejor sensibilidad, especificidad y razones de probabilidad para evidenciar cambios inmunológicos tempranos en la fase crónica de la infección VIH-1.

REFERENCIAS

1. WHO, UNAIDS, and UNICEF, Global HIV/AIDS response: epidemic update and health sector progress towards universal access: progress report 2011. 2011: Geneva.
2. UNGASS, Seguimiento de la Declaración de compromiso sobre el VIH/sida. 2010, Ministerio de la Protección Social Republica de Colombia.
3. UNGASS, Seguimiento de la Declaración de compromiso sobre el VIH/Sida in Informe mundial de avances en la lucha contra el Sida. Colombia 2012 2012, Ministerio de Salud y Protección Social Republica de Colombia.
4. Plaeger SF, Collins BS, Musib R, Deeks SG, Read S, Embry A. Immune Activation in the Pathogenesis of Treated Chronic HIV Disease: A Workshop Summary. AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES 2011; 27(00).
5. Sodoraa D L, Silvestri G. Immune activation and AIDS pathogenesis. AIDS 2008, 22:439-446.
6. Brenchley JM, Douek DC. HIV infection and the gastrointestinal immune system. Nature Mucosal Immunology 2008; 1(1):23-30.
7. D'Ettorre G, Piardini M, Vullo V. HIV Persistence in the Gut Mucosa of HIV-Infected Subjects Undergoing Antiretroviral Therapy Correlates with Immune Activation and Increased Levels of LPS. Current HIV Research, 2011; 9(3):148-153(6).
8. Jiang W, Brenchley JM. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. J Infect Dis. 2009; 199(8):1177-85.
9. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 1997; 16:83–92.
10. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. J Infect Dis 1999; 179:859–870.
11. Cao W, Detels R. Regulatory T Cell Expansion and Immune Activation during Untreated HIV Type 1 Infection Are Associated with Disease Progression. AIDS Res Hum Retroviruses, 2009; 25(2): 183–191.
12. Owen RE, Deeks SG, Norris PJ. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T cell activation yet maintain strong, polyfunctional T cell responses. AIDS 2010; 24(8): 1095–1105.

13. Deeks SG, Kitchen CM, Liu L, Guo H, Gascon R, Narvaez AB, et al. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load.
14. Onlamoon Tabprasit S, Pattanapanyas K. Studies on the potential use of CD38 expression as a marker for the efficacy of anti-retroviral therapy in HIV-1-infected patients in Thailand. *Virology*, 2006; 341(2):238–247.
15. Koblavi-Dème S, Nkengasong JN. Changes in levels of immune activation and reconstitution markers among HIV-1-infected Africans receiving antiretroviral therapy. *AIDS* 2003; 17(3):S17–S22.
16. Taborda N, Cataño JC, Delgado JC, Rugeles MT, Montoya CJ. Higher SLPI Expression, Lower Immune Activation, and Increased Frequency of Immune Cells in a Cohort of Colombian HIV-1 Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 60:12–19.
17. Alexaki, A., Y. Liu, and B. Wigdahl, Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence. *Curr HIV Res*, 2008. 6(5): p. 388-400.
18. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 2006; 12:289–295.
19. Guide for HIV/AIDS Clinical Care, HRSA HIV/AIDS Bureau June 2012.
20. Brenchley JM, Douek DC. CD4⁺ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract. *J Exp Med*. 2004; 200(6):749-759.
21. Brenchley JM, Douek DC. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature Medicine* 2006; 12:1365-1371.
22. Ganesan A, Roederer M. Immunologic and Virologic Events in Early HIV Infection Predict Subsequent Rate of Progression. *JID*, 2010; 201:272–84.
23. Mellors JW, Rinaldo CR Jr, Gupta P, White RM, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167–1170.
24. Rodriguez B, Sethi AK, Cheruvu VK, Mackay W, Bosch RJ, Kitahata M, et al. Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA* 2006; 296:1498-1506.
25. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M, Fox CH, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355–358.
26. Piatak M Jr, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993; 259:1749–1754.
27. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123–126.

28. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373:117-122.
29. Mohri H, Bonhoeffer S, Monard S, Perelson AS, (Ho DD. Rapid turnover of T lymphocytes in SIV-infected rhesus macaques. *Science* 1998; 279:1223–1227.
30. Mohri H, Perelson AS, Tung K, Ribeiro RM, Ramratnam B, Markowitz M, et al. Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J Exp Med* 2001; 194:1277–1287.
31. Hazenberg MD, Hamann D, Schuitemaker H, Miedema F. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4⁺ T cells go out of stock. *Nat Immunol* 2000; 1:285–289.
32. Lempicki RA, Kovacs JA, Baseler MW, Adelsberger JW, Dewar RL, Natarajan V, et al. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4⁺ and CD8⁺ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:13778–13783.
33. McCune JM. The dynamics of CD4⁺ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; 410:974–979.
34. Feinberg MB, McCune JM, Miedema F, Moore JP, Schuitemaker H. HIV tropism and CD4⁺ T-cell depletion. *Nat Med* 2002; 8:537.
35. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Sousa AE, Victorino RM, Paul WE. CD4⁺ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat Med* 2002; 8:319–323.
36. Hellerstein M. HIV tropism and CD4⁺ T-cell depletion. *Nat Med* 2002; 8:537–538.
37. Hellerstein MK, Hoh RA, Hanley MB, Cesar D, Lee D, Neese RA, McCune JM. Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J Clin Invest* 2003; 112:956–966.
38. Silvestri G, Feinberg MB. Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin Invest* 2003; 112: 821–824.
39. Ascher MS, Sheppard HW. AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 1988; 73:165–167.
40. Grossman Z, Bentwich Z, Herverman RB. From HIV infection to AIDS: are the manifestations of effective immune resistance misinterpreted? *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69:123–135.
41. Grossman Z, Herberman RB. T-cell homeostasis in HIV infection is neither failing nor blind: modified cell counts reflect an adaptive response of the host. *Nat Med* 1997; 3:486–490.
42. Giorgi JV, Lyles RH, Matud JL, Yamashita TE, Mellors JW, Hultin LE, et al. Multicenter AIDS Cohort Study. Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002; 29:346–355).
43. Chakrabarti LA, Lewin SR, Zhang L, Gettie A, Luckay A, Martin LN, et al. Normal T-cell turnover in sooty mangabeys harboring active simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2000; 74:1209–1223.
44. Broussard SR, Staprans SI, White R, Whitehead EM, Feinberg MB, Allan JS. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally

- infected african green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol* 2001; 75:2262–2275.
45. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 2003; 18:441–452.
 46. Pandrea I, Onanga R, Kornfeld C, Rouquet P, Bourry O, Clifford S, et al. High levels of SIVmnd-1 replication in chronically infected *Mandrillus sphinx*. *Virology* 2003; 317:119–127.
 47. Silvestri G, Fedanov A, Germon S, Kozyr N, Kaiser WJ, Garber DA, et al. Divergent host responses during primary simian immunodeficiency virus SIVsm infection of natural sooty mangabey and nonnatural rhesus macaque hosts. *J Virol* 2005; 79:4043–4054.
 48. Mattapallil JJ, Douek DC, Roederer M. Massive infection and loss of memory CD4⁺ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 2005; 434:1093-1097.
 49. Sumpter B, Dunham R, Gordon S, Engram J, Hennessy M, Kinter A, et al. Correlates of preserved CD4(R) T cell homeostasis during natural, nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys: implications for AIDS pathogenesis. *J Immunol* 2007; 178:1680–1691.
 50. Ford ES, Puroh CE, Sereti I. Immunopathogenesis of Asymptomatic Chronic HIV Infection: The Calm before the Storm. *Curr Opin HIV AIDS* 2009; 4(3): 206–214.
 51. Silvestri G, Sodora DL. Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *The Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(11):3148-3154.
 52. Cadogan M, Dalgleish AG. HIV immunopathogenesis and strategies for intervention *Lancet Infect Dis* 2008; 8:675–84.
 53. Vijay Sivaraman, Liguozhang, Lishan Su. Type I Interferon Contributes to CD4⁺ T Cell Depletion Induced by Infection with HIV-1 in the Human Thymus. *J Virol*. 2011; 85(17):9243–9246.
 54. Herbeuval JP, Shearer GM. Differential expression of IFN- α and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *PNAS* 2006; 103(18):7000-7005.
 55. Herbeuval JP, Shearer GM. HIV-1 Immunopathogenesis: How Good Interferon Turns Bad. *Clin Immunol*, 2008. 123(2):121-128.
 56. Sachdeva M, Pahwa S. Immune Exhaustion Occurs Concomitantly With Immune Activation and Decrease in Regulatory T Cells in Viremic Chronically HIV-1–Infected Patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 54:447–454.
 57. Srinivasula S, Kovacs JA. Differential effects of HIV viral load and CD4 count on proliferation of naive and memory CD4 and CD8 T lymphocytes. *Blood* 2011; 118(2):262-270.

58. Zeng M, Haase AT. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011; 121(3):998-1008.
59. Franco L. Treating HIV/AIDS by reducing immune system activation: the paradox of immune deficiency and immune hyperactivation. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 2008; 3(2):99-103.
60. Orendi JM, Bloem AC, Borleffs JC, Wijnholds FJ, de Vos NM, Nottet HS, et al. Activation and cell cycle antigens in CD4R and CD8R T cells correlate with plasma human immunodeficiency virus (HIV-1) RNA level in HIV-1 infection. *J Infect Dis* 1998; 178:1279–1287.
61. Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, Schockmel GA, Leduc D, Hirschel B, Perrin L. Turnover of CD4R and CD8R T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med* 1998; 187:1295–1303.
62. Hazenberg MD, Stuart JW, Otto SA, Borleffs JC, Boucher CA, de Boer RJ, et al. T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 2000; 95: 249–255.
63. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, Aubertin AM, et al. Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:9431–9435.
64. Finkel TH, Tudor-Williams G, Banda NK, Cotton MF, Curiel T, Monks C, et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat Med* 1995; 1:129–134.
65. Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* 1995; 181:2029–2036.
66. Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol* 1995; 154:5555–5566.
67. Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *Journal of Immunol* 1996; 156:3509–3520.
68. Rosenzweig M, DeMaria MA, Harper DM, Friedrich S, Jain RK, Johnson RP. Increased rates of CD4+ and CD8+ T lymphocyte turnover in simian

- immunodeficiency virus infected macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 6388–6393.
69. Kovacs JA, Lempicki RA, Sidorov IA, Adelsberger JW, Herpin B, Metcalf JA, et al. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J Exp Med* 2001; 194:1731–1741.
 70. Chomont N, Sékaly RP. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nature Medicine*, 2009; 15:893–900.
 71. Stevenson M. HIV-1 Pathogenesis. *Nature Medicine*, 2003; 9(7):853-860.
 72. Sailaja G, Kang SM. Human Immunodeficiency Virus-Like Particles Activate Multiple Types of Immune Cells. *Virology*, 2007; 362(2):331–341.
 73. Tiba F, Bohler T. Activation and maturation of peripheral blood T cells in HIV-1-infected and HIV-1-uninfected adults in Burkina Faso: a cross-sectional study. *J Int AIDS Soc.* 2011; 14: 57.
 74. Savarino A, Bottarel F, Malavasi F, Dianzani U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS*. 2000;14:1079-1089.
 75. Giorgi JV, Detels R, Liu Z. Elevated Levels of CD38+ CD8+ T Cells in HIV Infection Add to the Prognostic Value of Low CD4+ T Cell Levels: Results of 6 Years of Follow-Up. *JAIDS* 1993; 6(8).
 76. Liu Z, Giorgi JV, Detels R. Elevated CD38 Antigen Expression on CD8+ T Cells Is a Stronger Marker for the Risk of Chronic HIV Disease Progression to AIDS and Death in the Multicenter AIDS Cohort Study Than CD4+ Cell Count, Soluble Immune Activation Markers, or Combinations of HLA-DR and CD38 Expression. *JAIDS*, 1997; 16(2): 83-92.
 77. Marchetti G, Monforte A. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naïve patients with high CD4R cell count. *AIDS* 2011; 25(11):1385-1394.
 78. Nixon DE, Landay AL. Biomarkers of immune dysfunction in HIV. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; 5(6):498–503.
 79. Douek DC, Koup RA. Emerging Concepts in the Immunopathogenesis of AIDS. *Annual Review of Medicine* 2009; 60: 471-484
 80. Shepard BD, Badley AD. Early Changes in T-Cell Activation Predict Antiretroviral Success in Salvage Therapy of HIV Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2009; 48(2):149-155.
 81. Steel A, Kelleher P. CD38 expression on CD8 T cells has a weak association with CD4 T-cell recovery and is a poor marker of viral replication in HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. *HIV Medicine* 2008; 9:118–125.

82. Hunt P, Gandhi R, Babafemtaiwo. Immune Activation in HIV Patients Experiencing Transiently detectable viremia during ART. CROID 2012; Abstract 275.
83. Benito JM, Soriano V. Differential Upregulation of CD38 on Different T-Cell Subsets May Influence the Ability to Reconstitute CD4+ T Cells Under Successful Highly Active Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 38(4):373-381.
84. Kolber MA. CD38⁺CD8⁺ T-cells negatively correlate with CD4 central memory cells in virally suppressed HIV-1-infected individuals. *AIDS* 2008; 22:1937–1941.
85. Almeida M, Orfao A. Relationship Between CD38 Expression on Peripheral Blood T-Cells and Monocytes, and Response to Antiretroviral Therapy: A One-Year Longitudinal Study of a Cohort of Chronically Infected ART-Naive HIV-1 Patients. *Clinical Cytometry* 2008; 72B:22–33.
86. Piconi S, Clerici M. Immune activation, apoptosis, and Treg activity are associated with persistently reduced CD4+ T-cell counts during antiretroviral therapy. *AIDS* 2010; 24:1991–2000.
87. Hunt P, Cao HL, Deeks SG, Martin JN. Impact of CD8⁺ T-cell activation on CD4+ T-cell recovery and mortality in HIV-infected Ugandans initiating antiretroviral therapy. *AIDS* 2011; 25:2123–2131.
88. Zhang X, Hunt P, Hammer S, Cespedes M, Patterson K, Bosch R. Immune activation while on potent ART can predict subsequent CD4+ T cell increases through 15 years of treatment. CROID 2012; Abstract 274.
89. Hunt P, Deeks S. A Low T Regulatory Cell Response May Contribute to Both Viral Control and Generalized Immune Activation in HIV Controllers. *Plos ONE* 2011; 6 (1).
90. Groves K, Bibby D, McKnight Á. Disease Progression in HIV-1–Infected Viremic Controllers. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 61:407–416.
91. Ronquillo R, Landay A. Elevated Caspase-3 Expression and T Cell Activation in Elite Suppressors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010; 54(1): 110–111.
92. Jiao Y, Wang F. The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors. *Immunology* 2008; 128: e366–e375.
93. Sinclair E, Ronquillo R, Price RW. Antiretroviral Treatment Effect on Immune Activation Reduces Cerebrospinal Fluid HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; 47(5): 544–552.
94. Cynthia L. Gay, Joseph J. Eron, Efficacy of NNRTI-Based Antiretroviral Therapy Initiated During Acute HIV Infection. *AIDS* 2011; 25(7): 941–949.

95. Kasang C, Scheller C. HIV patients treated with low-dose prednisolone exhibit lower immune activation than untreated patients. *BMC Infectious Diseases* 2012; 12:14.
96. Eller MA, Sandberg JK. Innate and Adaptive Immune Responses Both Contribute to Pathological CD4 T Cell Activation in HIV-1 Infected Ugandans. *PLoS ONE* 2011; 6(4).
97. Taiwo B, Hunt PW, Bosch RJ. CD8+ T-Cell Activation in HIV-1–Infected Patients Experiencing Transient Low-level Viremia During Antiretroviral Therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 63:101–104.
98. Massanella M, Blanco J, Dynamics of CD8 T-Cell Activation After Discontinuation of HIV Treatment Intensification. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2013; 63:152–160.
99. Mathews Malnar & Bailey, Inc. Diagnostic Tests And ROC Curves. 2013.
100. Ondo P, Kestens L. Assessment of CD8+ T cell immune activation markers to monitor response to antiretroviral therapy among HIV- 1 infected patients in Côte d'Ivoire. *Clinical and Experimental Immunology* 2005; 140: 138–148.

ANEXOS



Formulario Número: _____

**“CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN INMUNOLÓGICA EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH-1
BAJO ATENCIÓN INTEGRAL ESPECIALIZADA AMBULATORIA, CALI-COLOMBIA, 2012”.**

Anexo No. 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROPÓSITO DEL ESTUDIO:

Usted ha sido invitado/a a participar en un estudio de investigación que se está llevando a cabo por la Dra. XIMENA GALINDO ORREGO, MD., perteneciente al “Grupo de Investigación Educación y Salud en VIH/Sida” de la Corporación de Lucha Contra el Sida (LA CORPORACIÓN) y a la Escuela de Ciencias Básicas de la UNIVERSIDAD DEL VALLE (LA UNIVERSIDAD), y ha sido aprobada por los Comités de Ética para Investigación en Humanos de ambas instituciones. El propósito de este estudio es caracterizar el estado de activación inmunológica (o inflamación) en pacientes con infección por VIH, lo cual aportaría evidencia en la toma de decisiones para el inicio oportuno del tratamiento antirretroviral (ARV) – (contra el VIH), que permita preservar la calidad y mejor funcionalidad de la respuesta inmune para contribuir al éxito de la terapia, prevenir complicaciones asociadas y mejorar la calidad de vida de los individuos VIH positivos. En muestras de sangre de las personas participantes, se medirán unos marcadores especiales que se pueden encontrar en las células de defensa (linfocitos CD4 y CD8) y que permiten identificar cuán activado (o en estado de alerta) se encuentra el sistema de defensas, lo cual podría relacionarse con la aparición de complicaciones de salud o con un buen control de la enfermedad. Los resultados de esta investigación permitirán que usted conozca con más detalle si requiere iniciar pronto el tratamiento (en caso de participar en el grupo “a” o en el grupo “b”), o cómo le va con el tratamiento que esté recibiendo (para el caso de los grupos “c” o “d”), lo cual se establece más adelante en este documento. Adicionalmente la información obtenida permitirá que la CORPORACION se proyecte a futuro según las necesidades encontradas como parte de la atención integral.

El presente documento le informará sobre los procedimientos a seguir para el desarrollo de la investigación, los riesgos que conllevaría para usted, e información adicional que usted debe conocer. Si tiene preguntas frente a este documento o encuentra palabras que no son claras para usted, por favor informe a los/las investigadores/as y ellos/ellas estarán gustosos/as de responder a todas sus preguntas.

PROCEDIMIENTOS:

Para participar en esta investigación, usted solo requiere tener disposición de hacerlo, ser mayor de edad y cumplir con ciertas características definidas acorde al grupo de trabajo en el que usted se encuentra previamente seleccionado por sus condiciones clínicas y estado de positividad para VIH, como bien se describe en el cuadro I. En total se incluirán aproximadamente 125 personas durante un periodo máximo de seis (6) meses (ver cuadro I) y su participación será de Una (1) ____ Dos (2) ____ ó Tres (3)____ veces durante el periodo del estudio, según el grupo al que sea asignado(a).

Cuadro I. Evaluaciones según grupo:

Grupo	Medición de línea base	Medición tercer mes	Medición sexto mes
Grupo a: Pacientes sin tratamiento ARV que aún no inician tratamiento ARV (25 participantes).	X		X
Grupo b: Pacientes VIH/Sida, sin exposición previa a terapia ARV y que inician su tratamiento ARV (25 participantes).	X	X	X
Grupo c: Pacientes VIH/Sida, con tratamiento ARV exitoso (muestra 25 participantes).	X		



Grupo d: Pacientes VIH/Sida, con tratamiento ARV y con falla virológica (muestra 25 participantes).	X		
Grupo e: Personas VIH (-) (25 participantes).	X		

Según sus condiciones actuales, usted podría participar en el grupo: **(a) (b) (c) (d) (e).**

Si usted está de acuerdo, su participación en este estudio consiste en responder a un cuestionario que será aplicado por personal entrenado del equipo asistencial de LA CORPORACION en el cual deberá contestar a unas preguntas con respecto a usted (edad, sexo, raza, hábitos, antecedentes personales de salud) y otros datos relacionados con su infección y/o enfermedad por el VIH, que también requerirán la revisión de su historia clínica en caso de ser usted una persona VIH positiva. Así mismo y según cronograma del cuadro I, requeriremos de usted entre una y tres tomas de muestra de sangre (acorde al grupo que usted haya sido previamente preseleccionado), se tomará una muestra de sangre de la vena de aproximadamente 5 centímetros de sangre (una cucharadita). Esto se realizará con una aguja desechable y la sangre se recolectará en un tubo estéril; se aprovechará cada muestra de sangre para obtener tanto los marcadores de la inflamación que son motivo de este estudio, como de otros que se requieran como parte de su seguimiento bajo el programa de Atención Integral de LA CORPORACIÓN (en caso de ser usted paciente VIH+). Todo lo anterior requiere que usted esté disponible durante 30 minutos aproximadamente (por cada ocasión que le corresponda venir a LA CORPORACIÓN, según el grupo al que sea asignado(a)); en caso que se requiera tiempo adicional, se lo consultaremos previamente. En esta investigación participarán aproximadamente 125 personas. Usted tendrá derecho a conocer la información nueva que resulte de este estudio o de otros similares.

RIESGOS E INCOMODIDADES:

Este estudio representa un riesgo MÍNIMO para usted, este riesgo consiste en que es posible que al tomar la muestra de sangre, la persona sienta un breve dolor y/o molestia o le aparezca un enrojecimiento en la piel, lo cual será pasajero pues la persona que toma la muestra es experta en su labor.

Igualmente el proceso de la entrevista puede causarle malestar e incomodidad porque usted estará hablando de su historia personal. Sin embargo, todas estas posibles incomodidades serán mínimas pues todas las preguntas serán realizadas por el médico o personal autorizado del equipo asistencial de la CORPORACION bajo las mejores condiciones de privacidad.

Aunque los riesgos de los procedimientos anteriormente mencionados son mínimos, usted tiene la posibilidad de interrumpir su participación en esta investigación en cualquier momento.

COMPENSACION POR CUALQUIER LESION PRODUCTO DE SU PARTICIPACION EN EL ESTUDIO:

Si bien, como participante del estudio, los riesgos para su salud son mínimos, LA CORPORACION se hará cargo de cualquier lesión que se derive directamente de su participación en esta investigación.

BENEFICIOS PARA USTED Y PARA OTRAS PERSONAS:

Los beneficios para usted serán los siguientes:

- Conocer información adicional para decidir si requiere o no iniciar pronto su tratamiento ARV (contra el VIH), si usted es paciente VIH+ que aún no lo ha recibido, lo mismo que conocer cómo va su tratamiento si usted ya lo viene recibiendo y si debe mantenerse igual o requiere de alguna modificación.
- Para las personas sin infección por el VIH (grupo "e"), conocer cómo está funcionando su sistema de defensas y recibir recomendaciones para mantener y mejorar su estado general de salud.

Adicionalmente la información obtenida de los participantes permitirá que la CORPORACION proyecte según las necesidades encontradas un mejor servicio como parte de la atención integral y/o actualización académica que redunde en beneficio de la comunidad científica y general.



COSTOS PARA USTED:

No se generará ningún costo para usted, en caso de que decida participar en el estudio; los costos que se produzcan por ello serán asumidos por LA CORPORACION, incluyendo los exámenes de laboratorio.

PAGO POR PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACION:

Usted no recibirá ningún tipo de remuneración por participar en este estudio. Es importante que sepa que por participar en esta investigación no recibirá pago; sin embargo se le hará el diagnóstico y en caso que resulte con alguna alteración se le ofrecerá tratamiento; este tratamiento puede consistir en indicaciones para iniciar o mantener más constante su tratamiento antirretroviral (contra el VIH). Usted no tendrá que pagar nada por participar en esta investigación y se compromete con nosotros a asistir cumplidamente a los controles y a las citas con los profesionales que se le indiquen; siempre le estaremos informando sobre su estado de salud.

ALTERNATIVAS:

Usted tiene como alternativa no participar en el estudio; en el caso de ser usted una persona VIH positiva que está siendo atendida en la CORPORACIÓN, usted continuará con su atención integral en LA CORPORACIÓN sin afectación alguna.

CONFIDENCIALIDAD:

Con la firma de este consentimiento informado usted autoriza a los investigadores y personal de LA CORPORACIÓN a tener acceso a su historia clínica y obtener la información estrictamente requerida en el estudio. Los investigadores y el personal de LA CORPORACIÓN respetarán la confidencialidad de su información acorde a las regulaciones legales establecidas para ello, ya previamente conocidas y aceptadas por usted desde su ingreso al Programa de Atención Integral (si es paciente de LA CORPORACIÓN). Usted puede tener la seguridad de que la información que usted suministre se mantendrá bajo absoluta confidencialidad entre usted y LA CORPORACIÓN y no será relacionada en ningún momento con su nombre ante terceros, manteniendo así en secreto la información que usted nos proporcione. Para cumplir con esto le garantizamos que dentro de la investigación y para fines únicamente estadísticos, del cuestionario que usted conteste sólo se tomará su código asignado, pero no sus datos personales; adicionalmente, a esta información no podrán acceder personas diferentes a los investigadores del estudio. Igualmente, en ningún caso su nombre aparecerá en publicación alguna que resulte. Además, dicha información podrá ser utilizada para otros estudios relacionados y desarrollados por los mismos investigadores de éste, previa aprobación del Comité de Ética que autorizó esta investigación; en dicho caso, los investigadores no podrán tener acceso a su nombre, únicamente a sus respuestas.

SU PARTICIPACION ES VOLUNTARIA:

Su participación en este estudio es voluntaria, usted tiene el derecho a decidir no participar o a retirarse del estudio en cualquier momento. De ser así y adicionalmente es una persona VIH positiva y a su vez recibe atención en LA CORPORACIÓN, su decisión de no participar en esta investigación no afectará su derecho a recibir tratamiento y atención integral en LA CORPORACION, es decir que como paciente de esta entidad, su deseo de no participar en el estudio o de retirarse de este no afectará para nada el curso de su atención y tratamiento. Su participación en la investigación podría también ser interrumpida por los/as investigadores/as en cualquier momento sin que ello requiera de su consentimiento, y tampoco afectará su Atención Integral (para el caso de personas VIH positivas atendidas en LA CORPORACIÓN).

Si usted decide participar en esta investigación en forma libre y voluntaria, bajo las condiciones antes mencionadas, por favor firme ó coloque la huella (solamente en caso de no saber o no poder firmar) de su dedo índice derecho en el espacio correspondiente. No firme este documento a menos de que usted haya tenido la oportunidad de preguntar y recibir respuestas satisfactorias a sus dudas. Usted recibirá una copia del presente documento el cual consta de cuatro (4) páginas. Si usted decide no participar, respetaremos su decisión y, como alternativa, se le brindarán indicaciones para un adecuado estilo de vida saludable y en caso de ser paciente de LA CORPORACIÓN le ofrecemos que continúe recibiendo todos los servicios a los cuales usted tiene derecho en LA CORPORACIÓN.



A QUIÉN CONTACTAR PARA RESPONDER A SUS PREGUNTAS:

Si usted tiene preguntas o preocupaciones relacionadas con el estudio, siéntase libre de solicitar información adicional a los/as investigadores del estudio, o si en algún momento usted siente que ha sufrido una lesión producto de su participación en esta investigación no dude en contactar a la investigadora principal del proyecto Dra. Ximena Galindo Orrego, al teléfono 5136152 de lunes a viernes de 8:00 am – 12 m y de 2:00 pm – 6:00 pm en Cali o a la Directora del Proyecto Dra. Beatriz Parra, al teléfono 6670326 de lunes a viernes de 8:00 am – 12 m y de 2:00 pm – 6:00 pm en Cali; igualmente puede contactar al personal del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Universidad del Valle (Dra. Laura Elvira Piedrahita) al teléfono 5185677 de la Universidad en Cali o al Comité de Ética para investigación en humanos de LA CORPORACIÓN, (Presidenta Dra. Blanca Lucía Acosta de Velázquez) podrá estar disponible para cualquier inquietud, sugerencia, queja o reclamo que a usted se le pueda presentar sobre este trabajo, en el teléfono 5136152 de la institución en Cali.

DECISIÓN DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO:

Doy constancia de que he entendido este documento, el cual está escrito en español. El estudio me ha sido explicado de manera satisfactoria y todas mis preguntas en relación a los procedimientos del estudio, posibles riesgos y malestares me fueron respondidas. En caso de tener preguntas en un futuro con relación al estudio, o en el caso de sufrir alguna lesión como resultado directo de mi participación en esta investigación, deberé contactar a la persona adecuada para cada caso como me fue indicado anteriormente en este documento. Basado/a en la información recibida y entendida, de manera totalmente VOLUNTARIA, YO _____, con documento de identificación (CC), (CE) No. _____ expedido en _____, DOY MI CONSENTIMIENTO para participar en este estudio de investigación, bajo las recomendaciones que me sean dadas; igualmente, suministraré la información personal que me sea solicitada de manera directa y a través de mi historia clínica que me cuidan en la Corporación, estaré dispuesto(a) a que se me practiquen las evaluaciones y muestras de sangre que sean requeridas y también autorizo para que dichas muestras sean guardadas para ser utilizadas con fines de esta investigación en el futuro. Todos mis derechos legales han sido respetados.

Nombre del participante: _____

Firma del participante: _____

C.C.: _____ de _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Huella
participante

Nombre y Firma de quien toma el consentimiento:

Por los(as) Investigadores(as):

Ximena Galindo Orrego

Firma: _____

C.C.: _____

y/o Jaime Galindo Quintero.

Firma: _____

C.C.: _____

Nombre del testigo 1: _____

Firma del testigo 1: _____

C.C.: _____ de _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Huella
testigo 1:

Nombre del testigo 2: _____

Firma del testigo 2: _____

C.C.: _____ de _____

Dirección: _____ Teléfono: _____

Huella
testigo 2:

Grupo de Investigación "Educación y Salud en VIH/Sida – CORPORACIÓN DE LUCHA CONTRA EL SIDA. – Carrera 56 No. 2-120, teléfono (572)5136152 – Cali, Colombia

Cali, (día) _____ (mes) _____ (año) _____

“CARACTERIZACIÓN DEL ESTADO DE ACTIVACIÓN INMUNOLÓGICA EN PACIENTES CON INFECCIÓN POR VIH-1 BAJO ATENCIÓN INTEGRAL ESPECIALIZADA AMBULATORIA, CALI-COLOMBIA, 2012”

ANEXO 2

FORMATO DE SEGUIMIENTO Y EVOLUCIÓN DEL PACIENTE - CRF

CÓDIGO CRF: _____ **Fecha diligenciamiento inicial:** Día____ Mes____ Año_____

Grupo: a____ b____ c____ d____ e____

Dirección: _____ **Municipio** _____ **Teléfono:** _____ **Estrato:** _____

Sexo: 1.Masculino____ 2.Femenino____ **Fecha de nacimiento:** Día____ Mes____ Año_____ **Edad:** _____

Raza 1.Afrocolombiano____ 2.Mestizo____ 3.Indio____ 4.Blanca____ 5. Otro _____

Estado civil actual: 1.Soltero(a)____ 2.Casado(a)____ 3.Unión libre____ 4.Viudo(a)____ 5.Separado(a)____

Afiliación en salud: 1. Contributivo____ 2. Subsidiado____

Hábitos: D: Diáριο. S: Semanal. O: Ocasional

Hábitos	Valor inicial				Fecha			Valor 3 meses				Fecha			Valor 6 meses				Fecha		
	Cantidad	Frecuencia			D	M	A	Cantidad	Frecuencia			D	M	A	Cantidad	Frecuencia			D	M	A
		D	S	O					D	S	O					D	S	O			
Cigarrillo																					
Alcohol																					
Sustancias psicoactivas/ otros																					
Actividad física																					

Infecciones de transmisión sexual: 1. Antecedente (pasada) _____ 2. Actual _____ 3.No _____

Describe ITS:

Preferencias sexuales: 1. Homosexual____ 2. Bisexual____ 3. Heterosexual____ 4. Otro _____

Otros hábitos (uso de condón, planificación familiar, alimentación), describa:

CLÍNICAS RELACIONADAS CON VIH / SIDA:

Fecha de diagnóstico de VIH: Día____ Mes____ Año_____

Estadio inicio:

Fecha inicio tratamiento ARV: Día____ Mes____ Año_____

	A	B	C
1			
2			
3			

Presencia de otras patologías infecciosas (virales, bacterianas, micóticas, parasitarias, tanto comunes como oportunistas:

Presencia actual o reciente (menor de un mes) de patologías de carácter inflamatorio no infeccioso.

Esquema de tratamiento antirretroviral actual: _____

Esquemas previos de tratamiento antirretroviral, marque con X, todos los medicamentos anteriores que ha utilizado:

NRTIs:	AZT ()	3TC ()	D4T ()	DDI ()	ABC ()	TDF ()	DDC ()
NNRTs:	NVP ()	EFV ()	ETR ()				
I.P.s.:	ATZ ()	IDV ()	LPV /r ()	SQV ()	NFV ()	DRV /r ()	FAPV /r ()
	ATZ /r ()	IDV /r ()	TPR /r ()	SQV /r ()			

Adherencia según test-SMAQ:

Línea de base: 1. Adherente ____ 2. No adherente ____ (Grupo C y D)

Tercer mes: 1. Adherente ____ 2. No adherente ____ (Grupo B)

Sexto mes: 1. Adherente ____ 2. No adherente ____ (Grupo B)

VARIABLES INMUNOLÓGICAS/VIROLÓGICAS

Secuencia	FECHA			Recuento de Linfocitos CD4 células/mm3	% CD4	Recuento de Linfocitos CD8 células/mm3	% CD8	Relación CD4/CD8	NIVEL DE CARGA VIRAL número de copias/mm3	Log ₁₀ de Carga Viral
	D	M	A							
Inicial o al diagnóstico VIH										
Línea base o Inicio del estudio										
3 meses										
6 meses										

LIPIDOS, GLICEMIA.

Parámetro	Valor de línea base	Fecha			Valor 3 meses	Fecha			Valor 6 meses	Fecha		
		D	M	A		D	M	A		D	M	A
Colesterol total mg/dL												
Triglicéridos mg/dL												
Colesterol HDL mg/dL												
Colesterol LDL mg/dL												
Índice Arterial												
Glicemia mg/dL												
Proteína C Reactiva ULS												

VARIABLES VALORACIÓN FÍSICA

FECHA			PESO Kg	TALLA en Mts	CINTURA en Cms	CADERA en Cms	PRESIÓN ARTERIAL mmHg		FRECUENCIA CARDIACA lpm
D	M	A					Sistólica	Diastólica	

Diagnóstico de Síndrome metabólico:

Línea base: 1. Con síndrome metabólico____ 2. Sin síndrome metabólico____
Tercer mes: 1. Con síndrome metabólico____ 2. Sin síndrome metabólico____
Sexto mes: 1. Con síndrome metabólico____ 2. Sin síndrome metabólico____

ACTIVACIÓN INMUNOLÓGICA.

Prueba	Valor de línea base	Fecha			Valor 3 meses	Fecha			Valor 6 meses	Fecha		
		D	M	A		D	M	A		D	M	A
Valor absoluto LT CD4+												
Porcentaje LT CD4+												
Valor absoluto LT CD4+CD38+												
Porcentaje LT CD4+CD38+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD4+CD38+												
Valor absoluto LT CD4+HLA-DR+												
Porcentaje LT CD4+HLA-DR+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula HLA-DR en LT CD4+HLA-DR+												
Valor absoluto LT CD4+CD38+HLA-DR+												
Porcentaje LT CD4+CD38+HLA-DR+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD4+CD38+HLA-DR+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula HLA-DR en LT CD4+CD38+HLA-DR+												

Prueba	Valor de línea base	Fecha			Valor 3 meses	Fecha			Valor 6 meses	Fecha		
		D	M	A		D	M	A		D	M	A
Valor absoluto LT CD8+												
Porcentaje LT CD8+												
Valor absoluto LT CD8+CD38+												
Porcentaje LT CD8+CD38+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD8+CD38+												
Valor absoluto LT CD8+HLA-DR+												
Porcentaje LT CD8+HLA-DR+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula HLA-DR en LT CD8+HLA-DR+												
Valor absoluto LT CD8+CD38+HLA-DR+												
Porcentaje LT CD8+CD38+HLA-DR+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD8+CD38+HLA-DR+												
Intensidad media de fluorescencia de la molécula HLA-DR en LT CD8+CD38+HLA-DR+												
Porcentaje de viabilidad de LT												

OBSERVACIONES

FECHA			OBSERVACIÓN
D	M	A	

Bogotá, Noviembre 8 de 2012

DCN° 526 /12

Doctora
XIMENA GALINDO ORREGO, MD.
Investigadora Principal
Corporación de Lucha Contra el Sida (CLCS)
Cali-Colombia.

Ref.: CLCS- Proyecto “Caracterización del estado de activación inmunológica en pacientes con infección por VIH-1 bajo Atención Integral Especializada Ambulatoria, Cali-Colombia, 2012”.

Estimada Dra. Ximena

Por medio de la presente y en mi calidad de Directora Científica del Centro de Análisis Molecular (CAM) yo, **Patricia Olaya García**, *Bacterióloga, M.Sc en Microbiología y M.Sc en Química*, confirmo el compromiso del CAM y el mio propio de participar y colaborar en el proyecto que usted lidera y titulado “**Caracterización del estado de activación inmunológica en pacientes con infección por VIH-1 bajo Atención Integral Especializada Ambulatoria, Cali-Colombia, 2012**”.

La participación del Centro de Análisis Molecular incluye las siguientes actividades:

- Suministro de instructivos para la toma de muestras de sangre para análisis por citometría de flujo
- Realización de análisis por citometría de flujo en las muestras recibidas:
 - Perfil de linfocitos CD3 CD4 y CD8 (recuentos absolutos y porcentajes)
 - Recuentos de subpoblaciones (CD4 y CD8) de Linfocitos T (CD3) activados mediante la determinación de los marcadores de activación CD38 y HLA- DR .

Laboratorio Clínico Especializado

- Determinación por citometría de flujo de la viabilidad de las células en estudio.
- Generación de plantillas y protocolos de análisis para las determinaciones por citometría de flujo.
- Envío de resultados y archivos de citometría
- Asesoría científica cuando sea requerida

Atentamente,



PATRICIA OLAYA G, M.Sc.
Directora Científica

Corporación de Lucha Contra el SIDA

CARGA VIRAL VIH Y LINFOCITOS (Citometría de Flujo) TOMA Y MANEJO DE MUESTRAS PARA ENVÍO A TEMPERATURA AMBIENTE AL CENTRO DE ANÁLISIS MOLECULAR

Tomar las muestras para carga viral y recuento de Infocitos por punción venosa con aguja múltiple; primero el tubo tapa perla y en seguida el tubo tapa lila

MUESTRAS PARA CARGA VIRAL

1 2 3

1- Tubo PPT® Tapa perla .

2- Muestra de sangre tomada en tubo PPT antes de centrifugar.

3- Muestra de sangre tomada en tubo PPT centrifugada a **2.500 R.P.M** durante **20** minutos. Se observan las tres fases:

- **Glóbulos Rojos al fondo del tubo**
- **Gel expandido en el medio**
- **Plasma libre de células en la fase superior.**

Así se debe enviar

♦ Las muestras bien centrifugadas son estables 24 h a **temperatura ambiente**



MUESTRAS DE SANGRE PARA RECuento DE LINFOCITOS CD3/CD4/CD8

Tubo al vacío EDTA K₃ Tapa lila.

Tubo plástico, estéril, ideal para el transporte y conservación de las células sanguíneas. La sangre es estable a **temperatura ambiente** durante 48 horas para Citometría de flujo.



Las muestras deben estar marcadas, bien tapadas y empacadas así: Los tubos con las muestras se introducen en el estuche de icopor el cual se debe sellar por la unión entre caja y tapa con cinta de enmascarar. Este a su vez se empaca en la bolsa plástica resellable y todos los estuches a remitir se empacan en la caja o sobre exterior de envío. Remitir a:

Centro de Análisis Molecular

Avenida 13 (paralela oriental autopista norte) N° 150 – 10
Bogotá D.C. Colombia

Laboratorio Clínico Especializado

Corporación de Lucha Contra el SIDA

EMPAQUE Y ENVÍO DE LAS MUESTRAS PARA CARGA VIRAL Y RECuento DE LINFOCITOS AL CENTRO DE ANÁLISIS MOLECULAR

El envío se debe hacer rápidamente pues las muestras deben ser procesadas antes de 30 - 48 horas y no deben sufrir cambios de temperatura. Recomendamos, tomar y enviar muestras de **Lunes a Jueves y no los Viernes**, con el fin de evitar posibles demoras de transporte durante el fin de semana.

Es muy importante seguir las normas de bioseguridad para el transporte de muestras. Las muestras deben estar marcadas, bien tapadas y empacadas de la siguiente manera: Los tubos plásticos que contienen las muestras se introducen en el estuche especial de icopor el cual se debe sellar por la unión entre caja y tapa con cinta de enmascarar. Este a su vez se empaqueta en la bolsa plástica resellable y todos los estuches a remitir se empaquetan en la caja o sobre exterior de envío.

Notas importantes

- No destapar los tubos, enviarlos inmediatamente después de tomadas las muestras.
- Mantener y transportar las muestras a temperatura ambiente.
- Enviar las muestras en los tubos y condiciones adecuados de acuerdo con instructivo especial para cada tipo de examen. (verificar la centrifugación y la separación correcta de las muestras tomadas en tubos PPT).
- Anexar una relación de las muestras enviadas o el formato correspondiente.
- Al empaque exterior del despacho se debe adosar la “ficha técnica de transporte”, incluyendo en ella la persona responsable del despacho y la dirección y teléfonos correspondientes, así como los datos de envío al Centro de Análisis Molecular.

Las muestras de sangre total para Citometría de flujo o tubos PPT para carga viral se deben enviar **a temperatura ambiente** el día en que se toman y garantizar que lleguen al Centro de Análisis Molecular antes de 30 – 48 horas.

Laboratorio Clínico Especializado

Corporación de Lucha Contra el SIDA

FICHA TÉCNICA DE TRANSPORTE DE MUESTRAS



Laboratorio Clínico Especializado
Avenida 13 (paralela autopista norte) N° 150 – 10
Bogotá DC Tel 6153629 /6154116 / Celular 312 3505350

Riesgo Biológico



FICHA TÉCNICA DE TRANSPORTE

Contenido: Muestras para análisis de laboratorio clínico

Características: Muestras de sangre, o plasma humano

Embalaje: Triple empaque de seguridad interno y empaque externo

- 1- Recipiente primario: tubo plástico con tapón de bioseguridad
- 2- Estuche de icopor el cual contiene los recipientes primarios
- 3 -Bolsa plástica con sistema de cerrado "zip lock"

Condiciones de transporte: Temperatura ambiente
Material apto para viajar en avión en cabina presurizada

Responsable del despacho:

Laboratorio Clínico Especializado

ANEXO 5

Tabla 1. Frecuencia de LT activados (CD38+ y/o HLA-DR+) en la fase crónica de la infección con VIH-1 en individuos con o sin tratamiento antirretroviral.

	VIH+ ARV- Naïve (n=24)		VIH+ inicia ARV (n=32)		VIH+ ARV exitosa (n=23)		VIH+ ARV- Falla (n=17)		VIH negativos (n=29)		Sig*.
	Media	IC95%	Media	IC95%	Media	IC95%	Media	IC95%	Media	IC95%	
Variables											
Porcentaje LT CD4+CD38+	58.06	52.62- 63.51	68.64 ^a	63.90-73.37	54.76	50.97- 58.55	62.69 ^b	55.99-73.39	49.59	45.21-53.97	<0.0001
Porcentaje LT CD4+HLA-DR+	9.95	5.90-14.01	19.03 ^c	15.30-22.76	8.34	6.62-10.06	29.96 ^c	19.28-40.63	6.17	4.79-7.55	0.0001
Porcentaje LT CD4+CD38+HLA- DR+	5.93 ^d	3.94-7.92	14.37 ^e	11.63 -17.10	4.92	3.21-6.64	22.56 ^e	11.89-33.23	3.89	2.46-5.32	0.0001
Porcentaje LT CD8+CD38+	67.10 ^f	61.92-72.27	83.68 ^g	78.61- 88.76	52.23	47.92-56.53	71.18 ^f	65.04-77.31	52.29	47.85- 56.74	0.0001
Porcentaje LT CD8+HLA-DR+	30.15	24.35-35.96	40.36	35.10-45.62	18.92 ^h	14.89-22.97	30.97	24.77-37.17	14.54 ^h	11.19-17.90	0.0001
Porcentaje LT CD8+CD38+HLA- DR+	24.28 ⁱ	19.28-29.29	35.42 ^j	30.64-40.21	12.55	9.97-15.13	24.11 ^j	19.22-28.99	9.85	6.91-12.79	0.0001

*significancia test Kruskal-Wallis. a) VIH+ inicia ARV diferente de todos los grupos excepto VIH+ ARV-Falla ($p<0.001$). b) grupo VIH+ ARV-Falla diferente de VIH negativos.

c) Grupos VIH+ inicia ARV y VIH+ ARV-Falla diferentes de VIH+ ARV-Naïve, VIH+ ARV exitosa y VIH negativos ($p<0.001$). d) grupo VIH+ ARV-Naïve diferente de VIH negativos ($p=0.0046$). e) Grupos VIH+ inicia ARV y VIH+ ARV-Falla diferentes de VIH+ ARV-Naïve, VIH+ ARV exitosa y VIH negativos ($p<0.001$). f) Grupos VIH+ ARV-Naïve y VIH+ ARV-Falla diferentes VIH+ ARV exitosa y VIH negativos ($p<0.001$). g) VIH+ inicia ARV diferente de todos los grupos ($p<0.001$). h) Grupos VIH+ ARV exitosa y VIH negativos diferentes de VIH+ ARV-Naïve, VIH+ inicia ARV y VIH+ ARV-Falla ($p<0.004$). i) Grupo VIH+ inicia ARV diferente de todos los grupos ($p<0.0019$). j) grupos VIH+ ARV-Naïve y VIH+ ARV-Falla diferentes VIH+ ARV exitosa y VIH negativos ($p<0.0002$).

Tabla 2. Correlación de marcadores de activación inmunológica con variables conteo de LT CD4, porcentaje LT CD4 , conteo LT CD8, porcentaje LT CD8 y carga viral.

	valor absoluto		porcentaje		valor absoluto		porcentaje		carga viral	
	LT CD4+		LT CD4+		LT CD8+		LT CD8+		(logaritmo)	
Variables*	Coeficiente correlación	Sign	Coeficiente correlación	Sign	Coeficiente correlación	Sign	Coeficiente correlación	Sign	Coeficiente correlación	Sign
Porcentaje LT CD4+CD38+	-0.3963	<.001	-0.3926	<0.001	-0.1729	0.0920	0.3486	0.0005	0.4940	<0.001
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD4+CD38+	-0.5623	<0.001	-0.5345	<0.001	-0.1647	0.1087	0.4880	<0.001	0.5919	<0.001
Porcentaje LT CD4+HLA-DR+	-0.6214	<0.001	-0.7247	<0.001	0.1359	0.1891	0.7159	<0.001	0.5416	<0.001
Porcentaje LT CD4+CD38+HLA-DR+	-0.6592	<0.001	-0.7508	<0.001	0.0803	0.4390	0.7389	<0.001	0.6237	<0.001
Porcentaje LT CD8+CD38+	-0.4957	<0.001	-0.4885	<0.001	-0.0868	0.4002	0.4470	<0.001	0.7400	<0.001
Intensidad media de fluorescencia de la molécula CD38 en LT CD8+CD38+	-0.4780	<0.001	-0.4686	<0.001	-0.0814	0.4303	0.4368	<0.001	0.7620	<0.001
Porcentaje LT CD8+HLA-DR+	-0.2299	0.0242	-0.3386	0.0007	0.2531	0.0128	0.3545	0.0004	0.4990	<0.001
Porcentaje LT CD8+CD38+HLA-DR+	-0.2953	0.0035	-0.3747	0.0002	0.1746	0.0889	0.3796	0.0001	0.6280	<0.001

**se consideran correlaciones significativas con valor de correlación superior a 0.5 y significancia<0.005. sign=Significancia correlación.*