

1/2442

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS NK EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA
INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE
LA ENFERMEDAD

TESIS DOCTORAL

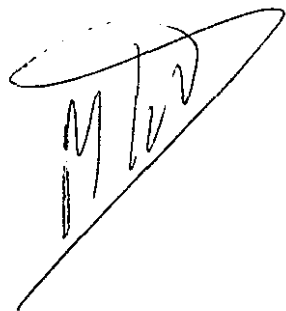
Reg. F. M. 12.610

IGNACIO DE LOS SANTOS GIL
SEPTIEMBRE DE 1993

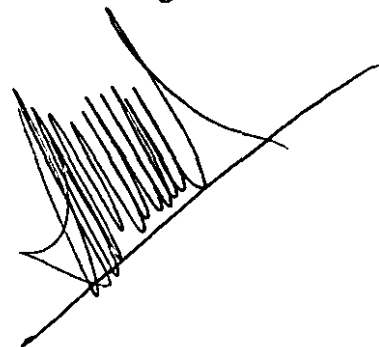
D. MIGUEL LÓPEZ-BOTET ARBONA Y D. ARTURO NOGUERADO ASENSIO,
PROFESORES ASOCIADOS DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID.

CERTIFICAN: Que D. Ignacio de los Santos Gil, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: "ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS NK EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA Y SU RELACIÓN CON LA PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD". Revisado dicho trabajo, reúne a nuestro juicio las condiciones suficientes para que el autor opte al grado de Doctor. Queda conforme para su presentación y defensa ante el tribunal correspondiente y para que conste y surta los efectos oportunos expedimos el presente CERTIFICADO, en Madrid a veintidós de Septiembre de mil novecientos noventa y tres.

Profesor Dr. Miguel López-Botet

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'MLB', written over a horizontal line.

Prof. Dr. Arturo Noguero

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'AN', written over a horizontal line.

A Toñi y a mis hijos Alejandro y Nacho

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Miguel López-Botet y Arturo Noguero, mis co-directores de tesis, y en especial al Dr. López-Botet por su inestimable ayuda y paciencia y por haberme introducido en el difícil campo de la Inmunología.

A los Dres. Julio Romero y José M^a Castrillo que me prestaron su apoyo en momentos decisivos.

Al Dr. Francisco Rodríguez que colaboró en la realización del análisis estadístico.

A los miembros del Laboratorio de Inmunología del Hospital de la Princesa, y en especial a M^a José Sánchez, que me ayudaron a resolver problemas técnicos.

A todos los miembros del Servicio de Medicina Interna del Hospital de la Princesa, al cual pertenezco, por su amistad y su interés para que este trabajo siguiera adelante.

ABREVIATURAS

Ac: anticuerpo

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

ADVP: adicto a drogas por vía parenteral

Ag: antígeno

Bisex: bisexual

CDC: Centers for Diseases Control

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CMV: citomegalovirus

DAG: diacilglicerol

D.E.: desviación estandar

ELISA: enzimoimmunoanálisis

ETS: enfermedades de transmisión sexual

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

HHV6: virus herpes humano tipo 6

Homosex: homosexual

IFN: interferón

IL: interleuquina

IPS: fosfato de inositol

LTR: long terminal repeats

M-CSF: factor estimulante de colonias de monocitos

NK: natural killer

NKCF: factor citotóxico de las células NK

NPC: neumonía por *Pneumocystis carinii*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PHA: fitohemaglutinina

PLC: fosfolipasa C

PVP: polivinil pirrolidona

SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TGF: factor de crecimiento tumoral

TNF: factor de necrosis tumoral

VEB: virus de Epstein-Barr

VHB: virus de la hepatitis B

VHS: virus herpes simple

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VIP: péptido intestinal vasoactivo

ÍNDICE

<u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1. SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA	2
1.1. Definición de caso-SIDA y clasificación	2
1.2. Virus de la inmunodeficiencia humana	10
1.3. Genoma del VIH	10
1.4. Mecanismo de la infección	11
1.5. Heterogeneidad del VIH	15
1.6. Muerte de células infectadas	16
1.7. Mecanismos inmunopatogénicos en la infección	17
1.8. Infección de otras células	20
1.9. Anormalidades funcionales de los linfocitos T CD4+	23
1.10. Inducción de la expresión del VIH	23
1.11. Respuesta inmunológica al VIH	27
1.12. Curso de la infección por VIH	29
1.13. Papel de los órganos linfoides en la infección	30
2. CÉLULAS NATURAL-KILLER	32
2.1. Ensayo de la citotoxicidad mediada por células NK	33
2.2. Características fenotípicas	34
2.3. Activación y mecanismos efectores de células NK	38
2.4. Mecanismos de citotoxicidad	39
2.5. Receptores implicados en la interacción NK-célula diana	40
2.6. Regulación de la actividad citotóxica y proliferación de NK	41
2.7. Producción de citoquinas por las células NK	43
2.8. Papel fisiológico de las células NK	44
2.9. Actividad antimicrobiana de las NK	44

2.10. Células NK y virus de la inmunodeficiencia humana	46
3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL	51
<u>OBJETIVOS</u>	53
<u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	55
1. CONSIDERACIONES GENERALES	56
2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO DE MARCADORES LINFOCITARIOS	57
3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA PRODUCCIÓN DE TNF-ALFA	60
4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE TNF-ALFA	60
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	62
<u>RESULTADOS</u>	63
1. EVOLUCIÓN	64
1.1. Evolución a caso-SIDA según la clasificación de 1992	64
1.2. Evolución a caso-SIDA según la clasificación de 1987	69
1.3. Comparación entre evolución a caso-SIDA por ambas clasificaciones	70
2. SUPERVIVENCIA	71
2.1. Supervivencia según la clasificación de 1992	71
2.2. Supervivencia según la clasificación de 1987	72
2.3. Comparación entre la supervivencia por ambas clasificaciones	72
3. GRÁFICOS	73
4. ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA EN LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	80
4.1. Antígenos de superficie de linfocitos T	82

4.2. Antígenos de superficie de células NK	84
4.3. Relación entre el número de células Kp43+ y las enfermedades que aparecen en el SIDA	87
5. ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T Y DE LAS CÉLULAS NK PARA PRODUCCIÓN DE TNF-ALFA EN LA INFECCIÓN POR VIH	102
<u>DISCUSIÓN</u>	107
1. EVOLUCIÓN Y SUPERVIVENCIA EN LA INFECCIÓN POR VIH	108
2. ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA	112
3. ENSAYO FUNCIONAL	118
<u>CONCLUSIONES</u>	121
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	123

INTRODUCCIÓN

1. SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA.-

Las primeras descripciones de esta entidad clínica se produjeron en el año 1981, cuando se publicaron una serie de artículos que señalaban la aparición de neumonía por *Pneumocystis carinii*, candidiasis de mucosas y Sarcoma de Kaposi en varones homosexuales y/o drogadictos por vía intravenosa previamente sanos (1-4). Se demostró la existencia de alteraciones adquiridas en la inmunidad consistentes en disminución de los linfocitos CD4+, aumento de los CD8+ e inversión del cociente CD4/CD8, que se correlacionaron con los hábitos especiales de estos sujetos y con exposición crónica a citomegalovirus.

En 1982 se le da a esta enfermedad el nombre por el que la conocemos actualmente (5), Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y en 1983 se aísla el virus causante de la infección. Desde entonces se han descrito multitud de casos a lo largo de todo el mundo. En España, uno de los países con mayor número, se han notificado 18.347 casos hasta el 31 de marzo de 1993.

1.1. Definición de caso SIDA y clasificación.-

En 1982 se da la primera definición de caso SIDA con propósitos de vigilancia epidemiológica (5). Posteriormente, en 1985 (6), se revisa esta definición, tras haber sido encontrado el virus causante de la infección, y finalmente en 1987 vuelve a revisarse por los "Centers for Diseases Control" (CDC) de Estados Unidos (7) y es la que actualmente se sigue: "un caso de SIDA se define como una situación caracterizada por una o más enfermedades indicadoras, dependiendo del estado de evidencia de laboratorio de infección por VIH".

1.- Situación de infección por VIH desconocida: si los tests de laboratorio para VIH no se realizaron o dieron resultados no concluyentes y el paciente no tiene otra causa de

inmunodeficiencia, cualquier enfermedad de las listadas indica SIDA si fueron diagnosticadas por un método definitivo:

- Candidiasis de esófago, tráquea, bronquio o pulmones.
- Criptococosis extrapulmonar.
- Criptosporidiosis con diarrea que persista más de un mes.
- Enfermedad por citomegalovirus, no de hígado, bazo o ganglios linfáticos en pacientes de más de un mes de edad.
- Infección por virus herpes simple, con úlcera mucocutánea que persista más de 1 mes, o bronquitis, neumonitis o esofagitis de cualquier duración, que afecte a pacientes de más de 1 mes de edad.
- Sarcoma de Kaposi, en menores de 60 años.
- Linfoma cerebral primario en menores de 60 años.
- Neumonía intersticial linfoide en menores de 13 años.
- Infección diseminada por el complejo *Mycobacterium avium* o *kansasii*.
- Neumonía por *Pneumocystis carinii*.
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
- Toxoplasmosis cerebral en pacientes de más de 1 mes de edad.

2.- Infección por VIH positiva. Independientemente de la existencia de otras causas de inmunosupresión, si hay evidencia de laboratorio a favor de infección por VIH, cualquier enfermedad de las listadas en el punto 1 o cualquiera de las listadas a continuación, indican un diagnóstico de SIDA.

a.- Enfermedades diagnosticadas definitivamente:

- Infecciones bacterianas múltiples o recurrentes (al menos dos en un periodo de dos años) causadas por *Haemophilus*, *Streptococcus* u otras bacterias piógenas, que afecten

a pacientes de menos de 13 años de edad (septicemia, neumonía, meningitis, infección ósea o articular, abscesos de órganos internos o cavidad corporal).

- Coccidioidomicosis diseminada.
- Encefalopatía por VIH (demencia-VIH, demencia-SIDA o encefalitis subaguda por VIH).
- Histoplasmosis diseminada.
- Isosporiasis con diarrea que persista más de 1 mes.
- Sarcoma de Kaposi a cualquier edad.
- Linfoma cerebral primario a cualquier edad.
- Otros linfomas no Hodgkin de estirpe B o de fenotipo inmunológico desconocido, con tipo histológico de células pequeñas no hendidas (Burkitt o no) o de sarcoma inmunoblástico.
- Enfermedad diseminada por micobacterias, distintas de tuberculosis.
- Enfermedad por *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar o diseminada.
- Septicemia recurrente por *Salmonella* no *typhi*.
- Caquexia por VIH con pérdida de peso mayor del 10%, más diarrea crónica y/o astenia y fiebre documentada de más de 1 mes.

b.- Enfermedades indicadoras diagnosticadas de forma presuntiva:

- Candidiasis esofágica.
- Retinitis por citomegalovirus.
- Sarcoma de Kaposi.
- Neumonía intersticial linfoide en niños menores de 13 años.
- Enfermedad por micobacterias diseminada.
- Neumonía por *Pneumocystis carinii*.

- Toxoplasmosis cerebral en pacientes de más de 1 mes de edad.

3.- Infección por VIH negativa. En este caso debe descartarse un diagnóstico de SIDA salvo que se hayan excluido otras causas de inmunodeficiencia y el paciente tenga:

- Neumonía por *Pneumocystis carinii* diagnosticada por un método definitivo o
- Cualquiera de las otras enfermedades diagnosticada por un método definitivo y cifras de linfocitos CD4+ de menos de 400/mm³.

En cuanto a la clasificación de la enfermedad también se han realizado varias a lo largo de su historia. La de Walter-Reed (8) se basa en criterios de recuento de células CD4+, exploración física y análisis de la hipersensibilidad retardada y ha sido utilizada en contadas ocasiones; actualmente está abandonada. Simultáneamente, los CDC de Estados Unidos realizaron otra clasificación (9) y es la que se ha seguido hasta fechas recientes y aún hoy sigue utilizándose. Divide la infección por el VIH en cuatro grupos mutuamente excluyentes, y es jerárquica en el sentido de que las personas clasificadas en un grupo particular no deben reclasificarse en un grupo anterior aunque se resuelvan las manifestaciones que dieron origen a su inclusión.

Grupo I: infección aguda por VIH, cuadro semejante al de la mononucleosis infecciosa, con o sin meningitis aséptica, asociado con seroconversión en el título de Ac anti-VIH. Todos los pacientes de este grupo deben ser posteriormente reclasificados cuando remitan las manifestaciones agudas.

Grupo II: pacientes asintomáticos infectados por VIH.

Grupo III: pacientes con linfadenopatía generalizada, es decir, presencia de ganglios palpables (de 1 cm o mayores) en dos o más regiones extrainguinales que persistan durante al menos tres meses en ausencia de otra enfermedad que lo explique.

Grupo IV: pacientes con signos o síntomas de infección por VIH distintos de las

adenopatías. Se divide en subgrupos no mutuamente excluyentes:

- Subgrupo A: enfermedad constitucional (Caquexia por VIH).
- Subgrupo B: enfermedad neurológica, que se define por la presencia de uno o más de los siguientes hechos: Demencia por VIH, mielopatía o neuropatía periférica en ausencia de enfermedad concurrente que los explique distinta de la infección por VIH.
- Subgrupo C: infección secundaria, que se define como las enfermedades infecciosas asociadas con infección por VIH. Se subdividen en categorías:
 - Categoría C1: pacientes con infecciones comprendidas en la definición de SIDA del CDC.
 - Categoría C2: pacientes con determinadas enfermedades infecciosas sintomáticas o invasivas, relacionadas pero no diagnósticas de SIDA: leucoplaquia vellosa oral, herpes zóster multidermatómico, nocardiosis, tuberculosis pulmonar o candidiasis oral.
- Subgrupo D: cánceres secundarios, comprendidos en la definición de SIDA del CDC.
- Subgrupo E: otras condiciones, que incluyen otras manifestaciones clínicas o enfermedades atribuibles a la infección por VIH o indicadoras de un defecto en la inmunidad celular, tales como la neumonitis intersticial linfocítica crónica, la trombocitopenia y otras. También comprende enfermedades en principio no relacionadas con el VIH pero cuya evolución y manejo pueden verse afectados por la coexistencia de la infección por dicho virus, como enfermedades infecciosas y tumores que no han sido mencionados anteriormente.

Recientemente los CDC han propuesto una nueva clasificación (tabla 1) que además amplía la definición de caso de SIDA (10) y que debería haber entrado en vigor a partir de

enero de 1993. Aunque aún no está extendida en todos los países se supone que se irá introduciendo progresivamente. Añade criterios de clasificación en base a la cifra de linfocitos CD4+, considerándose que un paciente es un caso de SIDA cuando tiene menos de 200 linfocitos CD4+/mm³ o menos del 14%, y además incluye otras tres enfermedades como indicadores de SIDA: Tuberculosis pulmonar, neumonía recurrente (dos o más episodios en un periodo de 12 meses) y cáncer cervical invasivo.

TABLA 1

<u>CATEGORIAS SEGUN LA CIFRA DE LINFOCITOS CD4+</u>	<u>CATEGORIAS CLINICAS</u>		
	A	B	C (SIDA)
1. Mayor o igual de 500/mm ³ o mayor o igual de 29%	A1	B1	C1
2. De 200-499/mm ³ o de 14-28%	A2	B2	C2
3. Menos de 200/mm ³ o menor de 14% (SIDA)	A3	B3	C3

El recuento de células CD4+ puede predecir de forma fiable la progresión de la enfermedad y se utiliza para tomar decisiones en el manejo clínico y ya que el control de estas células se ha convertido en rutinario en la asistencia a personas infectadas por el VIH, se tiene la oportunidad de una nueva clasificación clínica de la infección en los países con fácil acceso al estudio fenotípico de los linfocitos (11-12). El uso de las cifras de células CD4+ puede determinar el volumen de asistencia sanitaria de forma más precisa e identificar las deficiencias en el aporte de cuidados.

El motivo por el que se decidió incluir la tuberculosis pulmonar fue en un intento de

controlarla en la población infectada por el VIH más que por indicador de inmunodeficiencia severa. La adición de neumonía recurrente ha partido de la preocupación por la importante morbilidad que presentan sobre todo los drogadictos por vía intravenosa. En cuanto al carcinoma cervical invasivo se ha añadido porque la displasia cervical, lesión que puede progresar a cáncer invasivo, es común en mujeres infectadas y se asocia con la inmunodepresión, porque el cáncer cervical es prevenible y porque su inclusión enfatiza la importancia del cuidado ginecológico en mujeres infectadas (12).

La categoría A se aplica a la infección primaria y los pacientes asintomáticos con o sin linfadenopatía generalizada persistente.

La categoría B se aplica a pacientes que presenten o hayan presentado síntomas debidos a enfermedades no pertenecientes a la categoría C pero relacionadas con la infección por el VIH o cuyo manejo y tratamiento puede verse complicado debido a la presencia de la infección por el VIH. Entre ellas están: 1) Endocarditis bacterianas, meningitis, neumonías o sepsis. 2) Candidiasis vulvovaginal que persiste más de 1 mes o que responde mal al tratamiento. 3) Candidiasis orofaríngea. 4) Alteraciones del estado general con fiebre o diarrea de más de 1 mes de duración. 5) Herpes zóster con 2 o más episodios o multidermatómico. 6) Púrpura trombocitopénica idiopática. 7) Listeriosis. 8) Nocardiosis. 9) Enfermedad inflamatoria pélvica. 10) Neuropatía periférica.

La categoría C se aplica a pacientes que presenten o hayan presentado alguna de las complicaciones ya incluídas en la definición de SIDA de 1987 además de la tuberculosis pulmonar, el carcinoma cervical invasivo y las neumonías recurrentes.

Se considerarán portadores de SIDA los pacientes incluídos en las categorías C1, C2 y C3 y también en las categorías A3 y B3. Si no se dispone del recuento de linfocitos CD4+ en valor absoluto, puede utilizarse el porcentaje respecto a la cifra de linfocitos totales

(menos de 14%).

Esta nueva definición ampliará de forma considerable el número de casos de SIDA. Si las personas que han tenido un único recuento de CD4 inferior a 200 y que no presentan otros procesos indicadores de SIDA, se consideran casos de SIDA, se calcula que su prevalencia puede hasta triplicarse (11,13-15), aunque en otros estudios el aumento se aproxima al 50% (16-17). Si se incluyen en esta categoría los pacientes que presentan dos o más recuentos inferiores a 200, aumentaría la prevalencia en algo menos, aproximadamente entre un 50-100% (13). En cuanto a la supervivencia, algunos estudios han calculado que la probabilidad de vivir al cabo de un año del diagnóstico fue del 68% según los criterios de 1987, del 87% si se consideran dos determinaciones de linfocitos CD4+ consecutivas menores de 200 y del 94% si sólo se considera una determinación (13). La media de supervivencia fue de 20 meses para los criterios de 1987, 40 meses con dos determinaciones consecutivas de linfocitos CD4 menores de 200 y de 50 meses con una sola determinación.

La nueva definición y clasificación ha tenido muchas críticas, motivo por el que aún no se ha generalizado su utilización. En la mayoría de los países aún no se han desarrollado esquemas para asegurar la calidad en los recuentos de células CD4+. También se considera que ampliar la definición de caso SIDA no es la única forma de supervisar con eficacia la prevalencia de una severa morbilidad por VIH. En los países europeos la tendencia parece ser a incluir en la nueva clasificación las tres enfermedades mencionadas y utilizar los recuentos de células CD4+ para la clasificación de la infección por VIH pero no para definir el SIDA (11).

1.2. Virus de la Inmunodeficiencia Humana.-

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus humano de la subfamilia de los lentivirus (18,19). En 1983 (20) y en 1984 (21) se aisla, por dos grupos diferentes de investigadores, el virus de la inmunodeficiencia humana, que en un principio se denominó Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV) y Virus Humano Linfotrópico III (HTLV-III) respectivamente. Posteriormente se le dió el nombre por el que es conocido actualmente. Los lentivirus son pequeños virus con envoltura que contienen un RNA diploide de una sola cadena, tienen un core central con los ácidos nucleicos virales y enzimas que se van a requerir en las fases precoces de la replicación. El core está rodeado de una cápside proteica y ésta de una membrana lipídica. Dentro de la superficie central de la membrana se inserta una matriz proteica. La glicoproteína de envoltura protruye a través de la membrana y forma la superficie externa de la partícula viral.

1.3. Genoma del VIH.-

Su longitud es de 9,2 a 9,7 kb (18-19,22-23). Las secuencias codificadas de las proteínas del core (**gag**), de las enzimas retrovirales (**pol**) y de las proteínas de la envoltura (**env**) están localizadas a lo largo del "flanco de repeticiones terminales largas" -Long Terminal Repeats- (LTRs).

Genes estructurales:

El producto del gen **gag** es una poliproteína precursora p55 que es procesada para formar proteínas del core viral: p17, p24 y p15. El gen **pol** codifica tres enzimas: transcriptasa inversa, integrasa y proteasa. El gen **env** produce una poliproteína, gp 160, que es procesada para formar gp120 y gp41.

Contiene además al menos otros 6 Genes reguladores que pueden tener papel en la

patogénesis del VIH:

El gen **tat** codifica una proteína de 14-15 kD que es esencial para la replicación del VIH. El gen **rev** (antes llamado **trs** o **art**) codifica una proteína de unos 20 kD que actúa post-translacionalmente para asegurar la expresión de las proteínas de **gag** y **env** y se requiere para la replicación del VIH. El gen **nef** codifica una proteína de 27 kD que puede ser importante para mantener la infección latente, al retrasar los acontecimientos precoces de la infección. El gen **vif** produce una proteína de unos 24 kD que no es necesaria para la replicación o para el efecto citopático, pero su falta hace a los virus menos infecciosos. El gen **vpr** acelera la replicación del virus. El gen **vpu** codifica una proteína de 16 kD con efecto en la maduración de nuevos virus y codifican la salida de las partículas virales de las células. Del gen **vpt** no se conoce su función.

1.4. Mecanismo de la infección.-

La infección comienza cuando una partícula viral o una célula productora de virus encuentra a una célula con un receptor de alta afinidad para el virus, que es la molécula CD4 (glicoproteína de 55-58 kD) (18-19,24), produciéndose una reacción de unión entre la gp120 y esa molécula. La afinidad de la gp120 por el CD4 es mayor que la de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, el ligando natural del CD4 (19).

La unión de la gp120 a la molécula CD4 hace que la célula que la presenta se transforme en diana para la infección por el VIH y además puede alterar la función celular normal pues la molécula CD4 de los linfocitos T es el ligando natural para las moléculas del CMH de clase II de las células presentadoras de antígeno (25,26) y se requiere la interacción entre estas moléculas y la CD4 de las células T para el correcto reconocimiento del antígeno procesado que va a ser presentado en asociación con las moléculas del CMH. Si la gp120

libre se une a la molécula CD4 se puede alterar esta crítica interacción.

La proteína CD4 está presente en baja concentración en monocitos, macrófagos y células dendríticas presentadoras de Ag; en abundancia en la superficie de linfocitos T inmaduros y en la superficie de linfocitos T maduros CD4+, y es por ello por lo que estos linfocitos son los que más se infectan (25,27). Hay evidencia de que el VIH puede entrar en células sin CD4, a través de una reacción de baja eficiencia dependiente de una actividad de fusión (18,27).

La entrada del virus ocurre por la fusión del virus y la membrana celular a través de su glicoproteína de envoltura. La subunidad exterior del virus (gp120) media la unión al CD4, mientras que la porción transmembrana de la envoltura glicoproteica (gp41) media la fusión. Las regiones C3 y C4 son las zonas de gp120 importantes para la unión a CD4 y para la interacción con gp41; están flanqueadas por las regiones variables V3 y V5. Otras regiones, denominadas C1 y C5 son críticas para la asociación no covalente de gp120 y gp41.

La infección de las células por el VIH puede ocurrir por fusión directa de la envoltura del virus con la membrana celular del huésped. Se ha sugerido que el Ag HLA-DR puede estar implicado en el sitio de unión para el VIH en las células que expresan el Ag mayor de histocompatibilidad de clase II (19).

Una vez que entra el virus se convierte en un complejo nucleoproteico enzimáticamente activo. El RNA viral se convierte en DNA por la acción de una polimerasa RNA-dependiente, transcriptasa inversa, y por una ribonucleasa H. El RNA se transforma así en un DNA de doble cadena. Ocurre en las 6 primeras horas de la infección y tiene lugar en el citoplasma de la célula.

Integración: la información genética del DNA viral se integra en el genoma del DNA

del huésped -en esta fase se denomina provirus-. Está mediado por una enzima del virus: la integrasa y tiene lugar en el núcleo de la célula. Una vez integrado, el DNA viral permanece permanentemente asociado con el material genético del huésped, tanto tiempo como la célula esté viva. Como el virus raramente destruye a la célula huésped en esta fase, este hecho del ciclo vital asegura que una vez infectada una persona permanecerá así de por vida y que también se necesitará tratamiento de por vida. Además, el DNA que no se integra y queda libre puede contribuir también al efecto citopático (28).

Síntesis de RNA viral: la expresión del virus comienza con la síntesis de un RNA completo copia del DNA viral (18). El lugar del inicio de la transcripción se localiza en las secuencias virales terminales (LTR), que flanquean las secuencias del virus que codifican sus proteínas. La frecuencia del comienzo de la transcripción está controlada por proteínas celulares del huésped -las proteínas celulares de transcripción-. Ciertas proteínas aceleran la transcripción y otras la disminuyen, uniéndose a secuencias proteicas cercanas al LTR. Algunas de estas proteínas están presentes en todos los tipos celulares, otras sólo en ciertos tipos de células diferenciadas, y otras sólo cuando la célula huésped ha recibido una señal de activación específica.

Como la mayoría de las células T CD4 + no se están replicando, fabrican poco virus, pero sin embargo, su estimulación específica o inespecífica va a producir una transcripción activa de RNA y replicación viral. En otras células, como las dendríticas, el DNA se transcribe activamente en células circulantes que no están en división, por lo que son un reservorio de virus activo replicándose en el individuo infectado.

El promotor LTR del VIH-1 (productor de RNA de VIH-1) va a producir poco RNA en la mayoría de las células y por ello pocas proteínas; contiene secuencias que inhiben el inicio de la transcripción y se llaman *secuencias reguladoras negativas (NRS)*, lo que va a

impedir la eficiente traducción del RNA. Puede hacerse un promotor activo capaz de sintetizar grandes cantidades de RNA viral y de proteínas en células T activadas. El estímulo de las células T activa las proteínas que se unen al LTR y aceleran el inicio de la transcripción; también inactiva a las proteínas que se unen a los reguladores negativos del promotor viral.

Transactivador (proteína tat): pertenece a una nueva clase de proteínas reguladoras eucarióticas (18) que se concentra en el núcleo y nucleolo de la célula infectada y se une a una estructura del RNA naciente. La interacción de la proteína tat con el RNA puede aumentar la estabilidad de la polimerasa que está transcribiendo los genes virales y permite que se transcriban en toda su longitud. También puede aumentar la frecuencia del inicio de la traducción del RNA. El RNA es exportado al citoplasma desde el núcleo. Los productos del RNA incluyen la proteína tat y otras 2 proteínas reguladoras llamadas rev y nef.

Proteína rev: es la proteína reguladora de la expresión de proteínas del virión. En su ausencia, se acumula poco RNA en el citoplasma.

Unión de la cápside del virus: la totalidad del RNA viral se usa como plantilla para producir las proteínas de la cápside y de las enzimas replicativas (18). La proteína precursora de la cápside y las proteínas precursoras de las enzimas replicativas se unen en la superficie interna de la membrana celular y se insertan en ella en virtud de un ácido graso mirístico que está unido al extremo amino-terminal de la proteína precursora de la cápside.

Glicoproteína de la envoltura viral: se deposita en la superficie de la célula y se concentra en la membrana de la partícula viral a medida que brota de la superficie celular.

Proteasa viral: produce segmentación o rotura de las proteínas de la cápside y del precursor de su enzima replicativa, lo que da lugar a la reorientación de las proteínas de la cápside.

Tras la entrada y la integración, la replicación viral puede quedar en una fase latente, dependiendo del estado de activación de la célula infectada. En una célula activada, se inicia la transcripción del DNA viral a RNA genómico y RNAm, formándose proteínas del core y de la envoltura, saliendo el virus de la célula.

1.5. Heterogeneidad del VIH.-

La capacidad del VIH para evadir la respuesta inmune del huésped y persistir en el individuo infectado durante largos periodos puede ser el resultado de la generación de variantes antigénicas. In vivo, se pueden desarrollar numerosas variantes genéticas y biológicas, a lo largo del tiempo, y coexistir en un solo individuo (19,23,29). Ciertas mutaciones van a afectar al tropismo por la célula huésped, otras van a condicionar la patogenia de la enfermedad al influir sobre la capacidad de unión a la molécula CD4, y otras van a condicionar la resistencia a los fármacos que se han usado en el tratamiento.

VIH-2: es un nuevo miembro de la familia de los lentivirus humanos que se aisló de pacientes con SIDA en Africa Occidental en 1986 (30). Infecta las células CD4+ y produce un síndrome de inmunodeficiencia de más lenta evolución que el producido por el VIH-1. Sin embargo, antisueros contra la glicoproteína env del VIH-2 no reconocen al VIH-1. Además, no hay reactividad cruzada en la citotoxicidad celular dependiente de Ac entre ambos virus. Se han identificado cepas citopáticas y no citopáticas, y éstas no inducen sincitios aunque se cultiven con células CD4+, y además no causan la muerte de los linfocitos infectados in vitro (23). Se ha encontrado un gen distinto en este virus, el vpx, que codifica una proteína de 14 kD, que no parece ser esencial ni para la infectividad ni para la replicación. Por otro lado, el VIH-2 no tiene el gen vpu, aunque presenta la misma variabilidad genética que el VIH-1.

1.6. Muerte de células infectadas.-

El defecto central en el SIDA es la deplección de los linfocitos T CD4+ (19,25). Las reacciones mediadas por las glicoproteínas de envoltura son tóxicas para las células que tienen muchas proteínas CD4 de superficie (18). Se requiere una reacción mediada por la unión gp120-CD4 para matar a la célula. Se producen dos tipos de muerte celular.

1.- Si la célula produce mucho virus y tiene una alta concentración de CD4 en la superficie, ocurre una fusión entre el virus brotado y los CD4 de la superficie. Estas reacciones de fusión destruyen la integridad de la membrana celular y matan a la célula (auto-fusión). La inserción de las proteínas de envoltura en la membrana celular producen un cambio en su permeabilidad con aumento del calcio intracelular, que se asocia con pérdida de la viabilidad celular (19). El proceso de brote viral "per se" no es tóxico para la célula. Virus defectuosos en la fusión de la glicoproteína de envoltura pueden brotar desde la superficie de las células CD4+ sin matar a la célula. Además, virus normales pueden brotar de la superficie de células que tienen baja concentración de CD4 en la superficie y no matar a la célula (como ocurre en las células dendríticas circulantes). La capacidad de las células que tienen baja concentración de CD4 en su superficie para soportar la replicación crónica del virus sin ser destruidas explica los reservorios de la infección.

2.- Una célula productora de virus puede unirse a otra CD4+ a través de la glicoproteína que el virus tiene en su superficie, así una célula infectada puede fusionarse hasta con 500 células T CD4+ no infectadas, dando lugar a sincitios con vida media muy corta.

En la sangre periférica sólo una pequeña proporción de células mononucleares expresan activamente el VIH (25,31), pero usando técnicas de PCR muy sensibles se ha detectado que el DNA del VIH está presente en muchas más células T CD4+ de lo que en

principio se supuso (32). En pacientes con SIDA, al menos 1/100 células T CD4+ contienen DNA del VIH por estos análisis, y en asintomáticos 1/100-10.000. En algunos tejidos, como pulmón, sistema nervioso central y ganglios, la frecuencia de células infectadas puede ser 10.000 veces mayor que en sangre periférica, siendo macrófagos la mayoría (33). La frecuencia del DNA del VIH en las células T CD4+ aumenta con el tiempo en los pacientes que desarrollan la enfermedad y permanece estable en los asintomáticos.

1.7. Mecanismos inmunopatogénicos en la infección.-

A medida que progresa la infección en el tiempo y se avanza a estados clínicos más severos, se produce un descenso gradual de la población total de células CD4+, con déficit además funcional. Se han propuesto varios posibles mecanismos de daño celular (34,35):

1.- Muerte celular simple y formación de sincitios. Es un efecto citopático directo. La muerte celular puede resultar del acúmulo del DNA viral no integrado (19,25) o de la inhibición de la síntesis proteica celular tras la infección. Los virus aislados in vivo durante la fase acelerada de la infección tienen mayor capacidad para inducir sincitios in vitro. Estos se producen por la alta afinidad de la gp120 del virus, presente en la célula T CD4+, a unirse a otras moléculas CD4 de linfocitos vecinos no infectados. Sin embargo, los sincitios se han visto raramente in vivo. La unión de las proteínas de envoltura a las moléculas CD4 intracelulares puede producir también muerte celular.

2.- Respuesta inmune específica de VIH. Las respuestas humoral y celular contribuyen a la inmunidad antiviral y los Ac tienen propiedades neutralizantes. Por otro lado, algunos Ac dirigidos contra la envoltura viral pueden tener una función protectora relacionada con su capacidad para mediar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) (26) tras la unión a células NK, produciendo la muerte de células que expresan las

proteínas de envoltura viral en su superficie.

Los linfocitos T citotóxicos pueden tener un papel en la respuesta inmune. Estos mecanismos pueden actuar con un papel dual: protector en la respuesta inicial al VIH que puede controlar la infección, y patogénico durante la fase crónica, cuando los mismos mecanismos pueden estar implicados en la eliminación de las células infectadas y así contribuir al deterioro progresivo de la inmunidad (36). Por otro lado, las células T CD4+ no infectadas pueden unirse a moléculas gp120 libres y convertirse en dianas para la lisis por Ac anti-gp120 (por mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de Ac).

3.- Mecanismos autoinmunes (37). Algunas moléculas del CMH de clase II como HLA-DR y HLA-DQ tienen cierto grado de homología con las proteínas gp120 y gp41 del VIH-1 (25,26), y los Ac contra estas proteínas pueden tener reacción cruzada con las moléculas HLA.

Se ha demostrado la presencia de Ac anti-linfocitos normales en pacientes con SIDA (19) y también contra los infectados (26), en concreto contra una región de la gp41 que tiene reacción cruzada con las moléculas del CMH de clase II. Es probable que estos Ac puedan estar implicados en la citotoxicidad celular mediada por Ac o en la lisis celular mediada por complemento. Se han identificado también Ac contra la IL-2 en pacientes con esta infección, probablemente producidos en función de cierto grado de homología entre la gp120 y esa citoquina. De este modo, la homología entre ciertos componentes del VIH y moléculas naturales que son importantes para la respuesta inmunológica pueden dar Ac con reactividad cruzada que suprimen la función inmune o causan la destrucción de células inmunocompetentes.

4.- Anergia. El complejo gp120 y el anticuerpo se une a las moléculas CD4 y las células CD4+ se harían refractarias a una estimulación posterior in vitro a través de la

activación de sus moléculas CD3. Se han detectado recientemente Ac anti-gp120 en los linfocitos T4 de pacientes con SIDA.

5.- Superantígenos (38,39). Son Ag virales o microbianos capaces de unirse a casi todas las células T que tienen una región variable específica en la cadena beta de su receptor antigénico (los Ag convencionales se unen a las cadenas alfa y beta del receptor de la célula T). Estos superantígenos inducen estimulación y expansión de las células T que tienen esas regiones específicas variables beta, seguido de un fenómeno de anergia. Es probable que los superantígenos, si están presentes en la infección, sirvan como potentes activadores de células T, haciéndolas más susceptibles a la infección por el virus.

6.- Apoptosis. Es la muerte celular programada: mecanismo por el que el organismo elimina clones autorreactivos de células T, y se ha sugerido que los defectos cualitativos y cuantitativos de las células T4 en pacientes con infección por VIH podrían ser resultados de la apoptosis. Se produciría la muerte celular tras la activación por un Ag específico o un superantígeno, aún sin infección directa por el VIH.

7.- Unión de la gp120 y la molécula CD4 en el interior de la célula, lo que interferiría con su normal metabolismo (25).

8.- Falta de regeneración de las células T CD4+ de forma precoz en la infección, cuando la carga viral es relativamente baja como también lo es la pérdida de células T CD4+ (25). Se ha demostrado que los precursores intratímicos de células T y su progenie son susceptibles al VIH, incluyendo timocitos CD3- CD4- CD8- (19).

Se producen también otras alteraciones cualitativas en las células T CD4+, como es la disminución de la respuesta a Ag solubles, aún sin pérdida importante del número total.

1.8. Infección de otras células.-

Algunas expresan el receptor CD4, pero su expresión en otras es discutido, y otras no lo expresan, al menos en condiciones normales (40). En teoría, cualquier célula CD4+ puede infectarse.

1. Monocito/macrófago: por unión a su receptor CD4 aunque también pueden fagocitar partículas de VIH y producirse así su infección (19,23,41). Se han barajado otros mecanismos de infección (33) como la endocitosis mediada por FcR. Esto no conduce rápidamente a un efecto citopático; se alojan los virus en vacuolas intracitoplasmáticas y por eso pueden no detectarse por el sistema inmune y circular libremente. Pueden transmitir el VIH a células T susceptibles, actuando así como reservorio, y ser responsables del transporte del VIH al pulmón o al cerebro (a través de los monocitos/macrófagos de esos órganos). En estas localizaciones, de un 10-50% de los macrófagos están infectados, lo que no se observa en otros órganos. Los macrófagos segregan citoquinas que tienen efecto en la función, daño y reparación nerviosa; la inapropiada secreción de estas citoquinas (IL-1, IL-6, TNF-alfa, factor de crecimiento derivado de plaquetas y apolipoproteína e) pueden producir síntomas neurológicos y daño tisular. El tejido nervioso así dañado puede afectar a los macrófagos infectados y hacer que segreguen más productos tóxicos.

Existen varias diferencias en el resultado de la infección de los monocitos/macrófagos y la de los linfocitos T. La de los primeros puede no producir muerte celular significativa ni formación de sincitios, debido a su permanencia en vacuolas y su fenotipo puede también permanecer sin alteraciones. Ciertos aislados de VIH muestran tropismo específico por monocitos/macrófagos o por células T. No está claro si ciertas cepas del virus tienen tropismo "todo o nada" (o sólo monocitos/macrófagos o sólo células T) o si la preferencia celular es debida a diferencias cuantitativas en los niveles de infectividad.

Las proteínas virales segregadas por monocitos infectados son muy diferentes de las segregadas por células T. En los viriones segregados por las células T infectadas, más del 35% de las proteínas virales totales son productos del gen *env*, mientras que en los de monocitos la mayoría de las proteínas son de la cápside, y las de envoltura son menos del 10%.

El número máximo de monocitos infectados in vitro es por lo menos 3 veces mayor que el de las células T en las mismas condiciones. Por el contrario, el número de viriones segregados es 10-100 veces menor que el de los linfoblastos infectados. Esto puede explicarse por el siguiente mecanismo: las células T infectadas tienen cientos de partículas virales asociadas con la membrana plasmática, desde donde brotarán, sin existir acúmulo intracelular. En los macrófagos hay pocos viriones en la membrana plasmática, y se localizan casi exclusivamente en vacuolas intracelulares, derivadas del aparato de Golgi, que van a ser las encargadas de transportar el virus hacia la membrana plasmática. Sin embargo, la exocitosis en el medio extracelular está suprimida. Así, el macrófago infectado es una factoría de virus, cuya producción permanece oculta para el huésped. La salida del VIH de los macrófagos puede ser iniciada por cualquier agente que altere su función: factores segregados durante la inflamación, remodelamiento tisular normal o respuesta del huésped a una infección intercurrente. Algunas de las funciones de estas células son anormales en la infección por el VIH:

- Disminución de la quimiotaxis.
- Disminución de la proliferación de células T dependiente de monocitos.

Sin embargo, otras funciones permanecen inalteradas:

- Secreción de anión superóxido.
- Actividad antimicrobiana intracelular.

- Actividad tumoricida.
- Actividad anti-candida.
- Respuesta a interferón-gamma.
- Producción de TNF.

2. Células progenitoras del sistema hematopoyético. Debido a las alteraciones mielodisplásicas encontradas en la médula ósea de estos pacientes, se ha sugerido una implicación de las células precursoras hematopoyéticas en la infección. También se ha pensado que las anormalidades hematológicas son el resultado de la entrada del VIH en las células de la médula ósea y además podrían ser resistentes a sus efectos citopáticos. Así, la médula ósea se convertiría en un reservorio de la infección, desde donde se diseminaría al resto del organismo.

3. Células B: se ha demostrado que pueden expresar el Ag CD4 aunque en baja intensidad (42) y que por este motivo pueden ser infectadas por el VIH. Cuando esto ocurre, no suelen formar sincitios, lo que hace pensar que se necesita alta expresión del CD4 para que se formen.

4. Células del sistema nervioso central: astrocitos, oligodendrocitos, macrófagos (microglia) y células endoteliales capilares. La gp120 contiene una secuencia del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y se ha visto que el VIP es importante para la supervivencia neuronal en cultivos celulares. Cuando se enfrenta el VIH a células nerviosas en cultivo se produce muerte celular significativa, que se antagoniza completamente por el VIP (43). Otra hipótesis en relación con el daño neuronal dice que el VIH tendría un efecto indirecto a través de la secreción de antígenos virales que interactúan con células gliales y neuronas, o a través de la producción de citoquinas que alteran la función normal del sistema nervioso, como la IL-1 y el TNF-alfa (44).

5. Células del cuello uterino y colo-rectales. También se ha detectado DNA del VIH en el epitelio tubular y glomerular renal y en células enterocromafines. Otras células: eosinófilos, células dendríticas de sangre periférica, células de Langerhans y fibroblastos epidérmicos.

1.9. Anormalidades funcionales de los linfocitos T CD4+.-

Estas anomalías ocurren en todos los estadios de la enfermedad.

- Defecto en la capacidad de inducir a las células B a segregar inmunoglobulinas y a responder a aloantígenos.
- Defecto para reconocer a Ag solubles y proliferar en respuesta a ellos, habiéndose demostrado que la gp120 del VIH puede alterar la función inmunitaria al unirse a la molécula CD4.
- Defecto en la formación de IL-2 inducida por mitógenos o Ag.
- Parada en los estadios de maduración de las células T (45).
- Defecto en la secreción de IFN-gamma en respuesta a Ag microbianos específicos.

Debido al cierto grado de homología existente entre la gp120 y la IL-2, se ha sugerido que la gp120 podría unirse al receptor de IL-2 e interferir con su actividad directa o indirectamente (19). La gp120 nativa puede activar a los linfocitos CD4+ en reposo e inducir un aumento de la expresión de receptores de IL-2. Así, el VIH puede suprimir la función inmune al activar continuamente a las células T, haciéndolas menos respondedoras a las señales encontradas durante la respuesta inmunológica normal.

1.10. Inducción de la expresión del VIH.-

A lo largo de los 10 años siguientes a la infección, van a desarrollar SIDA un 50%

de las personas infectadas (46). Tras 5 años de infección, la mayor parte de los pacientes presentarán signos o síntomas de la misma, por lo que se piensa que desarrollarán la enfermedad en un plazo más o menos corto; aproximadamente un 20% de los infectados se encuentran asintomáticos diez años después de la seroconversión. Por tanto debe haber una serie de factores que podrían estimular un progreso más rápido hacia la enfermedad, aunque existen todavía muchas dudas al respecto (47,48).

Aunque el VIH puede infectar células T4 en reposo y activadas, su capacidad de replicación en ellas depende del estado de activación de las células. La replicación viral, medida por la detección de antigenemia p24, ocurre precozmente en el curso de la infección y luego disminuye concomitantemente con el comienzo de la producción de Ac. Más tarde, los niveles de Ag p24 aumentan de nuevo y se mantienen a lo largo del desarrollo del SIDA. Sin embargo, pequeños e intermitentes aumentos del p24 pueden ocurrir a lo largo del periodo asintomático. También pueden no detectarse ni Ag ni Ac, pero el estudio por PCR en células mononucleares de sangre periférica demuestra que el virus está de forma latente (19,49). Por cada célula T CD4+ infectada que expresa proteínas virales, hay aproximadamente nueve que tienen el DNA proviral latente (25), y necesitan de algunos factores -cofactores- para expresarse. El genoma proviral integrado puede permanecer en estado inactivo hasta que las señales de activación estimulan la transcripción del RNA viral. Los factores que activan la expresión del VIH tienen en común que inducen o codifican proteínas que se unen al LTR del VIH y estimulan la transcripción de su RNA.

En células no infectadas, la exposición a PHA hace que produzcan proteínas o factores celulares llamados NF-kB (24), que se unen a segmentos específicos de ciertos genes celulares e inician la transcripción del DNA (26). Esos sitios de unión están localizados en la región de los genes que codifican para la IL-2 y para las proteínas receptoras de IL-2. Por

ello, en circunstancias normales el estímulo mitogénico de las células T produce IL-2 y sus proteínas receptoras. En el caso de células infectadas por el VIH, sin embargo, las proteínas NF-kB que son inducidas por la PHA interactúan con sus sitios de unión que están localizados en las zonas LTR del VIH. Esto va a producir estímulo de la transcripción del RNA del VIH y la eventual producción de viriones.

Como posibles cofactores se han descrito:

1. El estímulo antigénico de las células T con ciertas sustancias, como el toxoide tetánico, puede producir aumento de la replicación del VIH. También ocurre con el lipopolisacárido, constituyente de la pared celular de las bacterias Gram-.

2. Ciertos virus, como el CMV, VHS-1, VEB, VHB, HHV6, adenovirus y HTLV-I pueden regular la expresión del VIH, estimulándola. Lo mismo ocurriría con el *mycoplasma*. El LTR del VIH contiene otras secuencias, como el sitio de unión Sp1 y el "TATA box", adonde se van a unir otros factores celulares de transcripción (además del NF-kB), como pueden ser los genes virales heterólogos.

Se ha descrito que la infección simultánea con dos cepas de VIH y HHV-6 producía aumento de la muerte de las células aunque se suprimiera la replicación del VIH (50). Además, pueden coinfectar el mismo tipo de linfocito (51). Las células T infectadas con el HHV-6 pueden producir enormes cantidades de CD4, aunque sean células que no lo producen normalmente, como los linfocitos CD8+ (52). Esto sugiere que la infección in vivo con virus heterólogos puede actuar como cofactor en la infección por VIH, por influir sobre sus niveles de replicación y/o en su efecto citopático. Algunos de estos virus pueden afectar indirectamente la expresión del VIH por suprimir independientemente la función inmune.

La infección concurrente por CMV y VIH puede producir un síndrome más severo y una disminución más rápida de los linfocitos T CD4+ (53). El virus de Epstein-Barr puede

estimular la expresión del LTR del VIH, como se ha visto en modelos experimentales (54). La coinfección con HTLV-I puede acelerar la progresión hacia la inmunosupresión, ya que se ha demostrado que activa la expresión del VIH y acelera la progresión de la enfermedad (55-57). El virus de la hepatitis B puede estimular la expresión del genoma del VIH, contribuyendo al desarrollo y a la progresión de la enfermedad, por transactivación del LTR (58). El papilomavirus no está demostrado que sea un cofactor en la infección, pero su presencia en estos pacientes produce una serie de lesiones que pueden ser cancerosas (59).

Mycoplasmas: ciertas proteínas de estos microorganismos pueden aumentar la producción de VIH (60) y la coinfección puede dar lugar al aumento del efecto citopático del VIH en las células CD4+ (61).

3. Algunas citoquinas serían capaces de regular la infección y pasar del estado de latencia o infección crónica a expresión viral activa. La IL-1, IL-3, IL-6, TNF alfa y beta, IFN gamma, GM-CSF y M-CSF estimulan la replicación del VIH en líneas celulares de monocitos y macrófagos con infección crónica. El TNF alfa y beta pueden inducir la expresión del VIH en células T con infección crónica. Por el contrario, el IFN alfa y beta ejercen un efecto supresor en la infección por el VIH, al inhibir el brote de viriones en células infectadas aguda o crónicamente. También la IL-4 y el TGF-beta, que bloquea los mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. Las concentraciones plasmáticas de las citoquinas necesitan estar elevadas para que tengan un papel importante en la modulación de la expresión del VIH a nivel tisular.

4.- El estrés puede aumentar la expresión del VIH. La exposición a rayos ultravioleta, luz solar o mitomicina C indujo la expresión de un gen indicador que estaba bajo el control del LTR del virus. Temperaturas de 40,7-41°C aumentaron la expresión del VIH en células infectadas crónicamente que eran simultáneamente tratadas con IL-6.

1.11. Respuesta inmunológica al VIH.-

1.- Respuesta humoral: la proliferación de células B policlonal es generalmente la primera anormalidad inmunológica que se encuentra en los pacientes infectados, lo que da lugar a la hipergammaglobulinemia (23). Este aumento en la producción de inmunoglobulinas da lugar a síndromes autoinmunes con Ac contra una gran variedad de proteínas celulares normales.

Aproximadamente el 50% de los infectados producen Ac no neutralizantes contra la región de 15 aminoácidos de la zona carboxi-terminal de la gp120. También se han detectado Ac contra la p24 y la gp41 (19). Los Ac contra la p24 son mayores en los estadios tempranos de la infección y menores en los estadios finales. Se han encontrado Ac contra la transcriptasa inversa que inhiben su actividad y se correlaciona negativamente con la progresión de la enfermedad. La disminución de los Ac anti-gag y anti-pol precede al desarrollo del SIDA en 1-4 años, comparado con los que no desarrollan SIDA.

Ac neutralizantes: se han detectado a títulos bajos en los infectados. El aumento en los niveles de estos Ac se asocia a un curso clínico estable y su disminución se asocia con progresión de la enfermedad. La rápida mutación que ocurre en el genoma del VIH durante la replicación puede producir nuevas cepas virales que escapan a la neutralización. Además, la sola presencia de Ac neutralizantes selecciona variantes de VIH in vitro.

Citotoxicidad celular dependiente de Ac (los Ac se unen a las células que producen virus y las marcan para que sean destruídas por células efectoras específicas del huésped): el complejo gp120-CD4 sirve como Ag diana para esta actividad citotóxica (62-64) y comparado con los pacientes asintomáticos, los pacientes con SIDA tienen título menor de estos Ac (65-66), siendo su principal diana la gp120 y también la gp41 (23). Otra forma de citotoxicidad celular dependiente de Ac es cuando los Ac, llamados citofílicos, se unen

primero al FcR de la célula efectora, armando a éstas para ser citotóxicas contra estructuras diana apropiadas. Esta actividad también disminuye a medida que progresa la enfermedad (67). El desarrollo de Ac con potente actividad ADCC podría contribuir al control de la diseminación del virus célula a célula in vivo a través de la eliminación de células infectadas precozmente en el ciclo replicativo del virus y además, podría servir para vigilar la carga residual de células infectadas que aún no han expresado proteínas virales en su superficie pero podrían emerger a lo largo del tiempo (66).

2.- Respuesta celular: existe respuesta proliferativa de células T en respuesta a varios Ag. Citotoxicidad mediada por células, por linfocitos T citotóxicos específicos para el VIH, con función dependiente o restringida al CMH de clase I (23,31,63,68-72). Estos pueden lisar células infectadas que expresen en su superficie la transcriptasa inversa y las proteínas derivadas de *env*, *gag* y *pol*. Se ha demostrado también la presencia de linfocitos CD8+ que suprimen la replicación del virus sin matar a la célula infectada (73). La actividad de los linfocitos T citotóxicos parece que aumenta con la progresión clínica de la infección hasta el estadio IV, volviendo a los niveles de los controles una vez se llega al estadio IV con historia de infecciones oportunistas, lo que hipotéticamente podría tener cierto valor pronóstico (63,69,74).

Parece clara la ineficacia de la inmunidad celular para prevenir la evolución hacia SIDA, a pesar del alto número de linfocitos T citotóxicos existentes. Una probable explicación para este hecho es la progresiva degradación del sistema inmunitario como consecuencia de la destrucción de células CD4+ o alteración de su función, conduciendo a una producción disminuída de citoquinas que se requieren para el crecimiento y función de las células CD8+ antivirales.

Otras células que pueden mediar esta citotoxicidad son las NK CD16+ (70,75),

dirigidas por un mecanismo de ADCC contra dianas unidas a gp120, y cuya acción aumenta en presencia de IL-2. Las NK pueden matar selectivamente células infectadas por virus sin atacar a las no infectadas, pero sin embargo no está claro que reconozcan y lisen células diana infectadas por retrovirus (76,77).

1.12. Curso de la infección por VIH.-

La primoinfección se sigue del desarrollo de una respuesta inmune celular y humoral contra el virus y un periodo prolongado de latencia clínica, que dura una media de 10 años, durante el cual el paciente está asintomático. Esto se sigue de la aparición de signos y síntomas, desarrollándose la enfermedad ya aparente, y aún con tratamiento en este momento, la muerte suele ocurrir a lo largo de dos años (78).

- Infección aguda por VIH: en el 50-70% de los pacientes con infección primaria, se va a desarrollar un síndrome parecido a la mononucleosis, que aparece 3 a 6 semanas después de la infección (79). Este periodo se asocia con altos niveles de viremia (80-81), apareciendo la respuesta inmune de 1 semana a 3 meses después. En este periodo, la infección se va a diseminar, produciéndose la siembra del virus, sobre todo en los órganos linfoides, pero una vez que se ha desarrollado la inmunidad específica, se produce una importante disminución de la viremia. Esta inmunidad no va a ser suficiente para suprimir completamente la replicación viral, pues el VIH va a persistir en los ganglios linfáticos y puede detectarse en estados aparentemente quiescentes de la infección (82), aun en ausencia de síntomas.

- Latencia clínica: tras la infección viral, se produce un periodo de latencia que puede durar años. Este periodo en realidad no debería llamarse así, ya que en este tiempo se va produciendo una progresiva disminución de los linfocitos CD4+, es decir, la enfermedad por

VIH es claramente progresiva durante este periodo, y es poco probable que haya una latencia microbiológica completa durante el curso de la infección (83-84).

- Enfermedad clínicamente aparente: debido al progresivo deterioro del sistema inmune en estos pacientes, la mayoría de ellos desarrollarán una enfermedad clínicamente aparente o SIDA. Hay algunas excepciones en las que esto no se va a producir de forma tan llamativa, como es el caso de: 1) la linfadenopatía generalizada persistente, que algunos pacientes presentan rápidamente en el curso de la infección y que puede estar causada por la importante respuesta inmune contra el VIH en los órganos linfoides, 2) el Sarcoma de Kaposi, que puede ocurrir antes del comienzo de la inmunosupresión severa (85), y 3) la enfermedad neurológica, que puede reflejar un efecto directo o indirecto del virus o de sus productos en las neuronas y otras células del sistema nervioso central (86).

1.13. Papel de los órganos linfoides en la infección por VIH.-

La presencia del VIH se ha demostrado en los órganos linfoides por hibridación in situ y por PCR (87-89), lo que no significa que los órganos linfoides sean el sitio preferente de la infección. La carga viral en ellos es mayor en el periodo de latencia clínica, por lo que probablemente la carga viral total en este periodo no sea muy baja. La infección primaria da lugar a una intensa viremia que conduce a la siembra de múltiples ganglios causando linfadenopatía y el inicio de una respuesta inmune específica. Se produce un acúmulo ganglionar de células CD4+, por proliferación in situ o migración a los ganglios, que se van a activar y pueden ayudar a la respuesta específica de células B en los centros germinales (90). Este acúmulo de células CD4+ puede contribuir al brusco descenso de su nivel en la circulación. Por otro lado, su estado activado facilitaría la infección por el virus en el ganglio, así como su replicación (en este periodo, del 25-50% de células CD4+ están

activadas en los ganglios, comparado con sólo el 5-10% en la sangre periférica).

En la fase latente de la infección, el VIH está concentrado en los ganglios linfáticos y se replica activamente. La presencia en estos órganos se correlaciona con las alteraciones histopatológicas como la hiperplasia folicular y la expansión de las células dendríticas foliculares. Además, las células infectadas por el VIH pueden ser incapaces de entrar en la circulación. El atrapamiento del virus en los ganglios (bien extracelulares o en las células T que no pueden recircular), la aparición de la inmunidad específica y la muerte del pool inicial de células infectadas, podría explicar la desaparición del VIH y de las células infectadas durante el periodo prolongado de latencia clínica. A medida que se desarrollan los últimos estadios de la enfermedad, se altera la arquitectura de los ganglios y se disuelve la red de células dendríticas foliculares, desaparecen los mecanismos de atrapamiento del VIH y así es libre para recircular produciéndose un aumento de la carga viral total circulante que no sería tal sino el reflejo de la recirculación del VIH.

2. CÉLULAS NATURAL-KILLER (NK).-

Para la revisión de este tema se han seguido los trabajos de G. Trinchieri (91) y de C.E. Lewis y J. McGee (92).

Son células efectoras que median la citotoxicidad natural no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad. Esta citotoxicidad natural puede estar mediada por diferentes tipos de linfocitos y otros leucocitos, bien espontáneamente o tras activación. Así, algunos investigadores han sugerido que se las defina operativamente, como cualquier célula linfoide de un huésped no inmunizado que medie la citotoxicidad no restringida al complejo mayor de histocompatibilidad. Sin embargo, sí es posible sugerir que dependen de la médula ósea para su diferenciación y no del timo (93). Representan entre un 5-20% de las células mononucleares de sangre periférica humana.

Posiblemente constituyan una tercera estirpe de diferenciación linfoide. En la V Reunión Internacional sobre células NK de 1988 (94), se definieron como "Linfocitos Granulares Grandes (LGL) que no presentan en su superficie el antígeno CD3 ni cualquiera otra de las cadenas receptoras de células T (alfa, beta, gamma o delta), pero que sí expresan el CD16 y el NKH-1 (Leu-19 ó CD56) en humanos y el NK-1.1/NK-1.2 en ratones, y median reacciones citolíticas en ausencia de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II en las células diana".

Ciertos linfocitos T que son alfa-beta+ o gamma-delta+ pueden expresar una actividad citolítica similar a la de las NK. Estos linfocitos se describen como con actividad "NK-like" o con función citolítica no restringida al CMH (94). Las células llamadas LAK ("Lymphokine-activated Killer") son linfocitos activados por IL-2 y pueden ser células NK o células T (95).

El Ag CD16 es un receptor de superficie de células NK (receptor de baja afinidad

para el fragmento Fc de la IgG). A través de este receptor las células NK pueden lisar células diana unidas a Ac IgG. Aunque la citotoxicidad mediada por células dependiente de Ac (ADCC) puede ser mediada por varios tipos celulares, incluyendo monocitos/macrófagos y polimorfonucleares, la población linfocitaria que media la ADCC se ha demostrado idéntica a la población celular NK (96) y a una población minoritaria de células T. Por lo tanto, las células NK tienen actividad NK, actividad LAK y actividad de citotoxicidad celular específica dependiente de Ac.

La citotoxicidad mediada por células NK puede ser inmediata y dependiente del contacto intercelular (lisis entre 30 minutos y 4 h post-contacto) o bien actuar sobre ciertas dianas a través de factores solubles secretados, como el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor citotóxico de las NK (NKCF), cuyos efectos citotóxicos se detectan más tardíamente (18-24 h).

2.1. Ensayo de la citotoxicidad mediada por células NK.-

Suelen usarse células derivadas de tumores como células diana para las NK, pero también puede demostrarse citotoxicidad contra células diana normales. La célula diana más sensible y más ampliamente usada para las células NK humanas es la K562 (97), derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica. Estas células no tienen Ag del CMH de clase I ni II y se les puede inducir diferenciación *in vitro* hacia células con características mieloides, eritroides o megacariocíticas. La citotoxicidad NK suele cuantificarse en el ensayo con ^{51}Cr , en el que se evalúa la lisis celular después de 3-4 horas de incubación a 37° , midiendo la cantidad de material radiactivo presente en el fluido sobrenadante (98). Se ha observado que un 15-40% de los linfocitos de sangre periférica forman conjugados con las células K562. Aunque una gran proporción de células NK (hasta

el 100% después de un estímulo con interferón) se unen a las células diana, no todas las células de sangre periférica que forman conjugados son NK (99-100).

2.2. Características fenotípicas.-

La principal estructura implicada en el proceso de reconocimiento celular permanece sin descubrir (101). El uso de Ac monoclonales ha demostrado que no hay un único Ag de superficie que sirva como marcador específico para las células NK, sino que se definen con una combinación de antígenos de diferenciación compartidos con otros tipos celulares, principalmente las células T y las mielomonocíticas. Algunos de estos marcadores de superficie no están presentes en todas las NK, sugiriendo que presentan cierta heterogeneidad. En general, las células NK humanas no comparten marcadores de superficie característicos de las células B, a excepción del Ag CB02, presente en las células B y en una población NK (102). La mayoría de los investigadores están de acuerdo en que las células NK humanas en reposo no expresan significativamente antígenos del CMH de clase II, aunque se ha descrito (103) la expresión de antígenos HLA-DR, DP y DQ en una población de NK.

Antígeno CD16 o FcR-gamma-III: se expresa en la gran mayoría de células NK y en los macrófagos tisulares y los derivados de monocitos y en granulocitos y algunas subpoblaciones de células T. Es un receptor de baja afinidad para la porción Fc de IgG. Se une a IgG en complejos inmunes con Ag soluble o insoluble, pero no se une a IgG monomérica. La unión de CD16 a las IgG tiene lugar a través de los dominios CH2 y CH3, siendo la interacción con el dominio CH2 la responsable de la actividad ADCC. La estimulación de células NK a través de CD16 determina su activación.

En la mayoría de los donantes sanos el Ag CD16 se expresa en una proporción

insignificante de células T CD3+. Sin embargo, en algunos estudios esta proporción es más elevada y demuestran la presencia de un 5-10% de células T CD3+ CD16+. Estas células T expresan el CD16 en mucha menor densidad de lo que lo hacen las células NK CD3-CD16+. El CD16 FcR es el receptor usado por las células NK para el reconocimiento y muerte de las células diana unidas a Ac, y en general sólo los clones de CD16+ tienen actividad de citotoxicidad celular dependiente de Ac (ADCC). Induce la producción de Interferon-gamma y TNF-alfa estimulando además la síntesis de GM-CSF y M-CSF en presencia de IL-2. La producción de IL-3 no es activada por este antígeno. La estimulación a través de este receptor activa la expresión de antígenos de activación como el receptor de transferrina, el 4F2 y el CD25.

La interacción de CD16 con sus ligandos estimula la fosfolipasa C (PLC), generándose así fosfato de inositol (IPs) y diacilglicerol (DAG). Algunos IPs (IP3) provocan un aumento de la concentración de calcio intracelular, y el DAG es activador de la proteína-quinasa C (104). La entrada de calcio a la célula parece ser crucial para la síntesis y secreción de IFN-gamma y TNF-alfa. El mecanismo por el que el CD16 activa la PLC no está totalmente aclarado. Se ha sugerido la implicación de proteína G o la activación de tirosin-quinasa.

Antígeno CD56 (N-CAM): proteína de 180 kD presente también en una subpoblación de linfocitos T CD3+ y en células del sistema nervioso. Contribuye, junto a LFA-1 y CD2, en la interacción de células NK con dianas que también expresan CD56.

Antígeno LFA-1: constituido por dos moléculas denominadas CD11a (180kD) y CD18 (95 kD), unidas no covalentemente. Se expresa en leucocitos y pertenece a la subfamilia beta-2 de las integrinas, que incluye además el CD11b/CD18 y el CD11c/CD18. Participa en interacciones celulares a través de la unión con al menos tres ligandos conocidos: ICAM-1,

2 y 3. Este sistema de interacción representa una vía fundamental de comunicación entre leucocitos y otras células y es necesario para la respuesta inmunitaria. La interacción mediada por LFA-1 participa en la lisis de varias dianas, como K-562 y Daudi y además es necesaria para la formación de conjugados y citotoxicidad debida a la estimulación de células NK con Ac monoclonales anti-CD2 y anti-CD16. El CD11b se expresa en una fracción de NK; interacciona con ICAM-1, el componente C3bi del complemento y el fibrinógeno. Se ha implicado en la interacción y lisis por células NK de dianas que unen C3bi.

Junto a las integrinas leucocitarias, las NK expresan distintas integrinas de la subfamilia VLA (beta-1), como VLA-1, 2, 3, 4, 5 y 6. La expresión de estos receptores en células NK permite su interacción con componentes de la matriz extracelular, como fibronectina y laminina, así como con ligandos celulares como VCAM-1.

Antígeno CD2: molécula de 50 kD expresada por linfocitos T, timocitos y células NK. Constituye el receptor para un ligando celular de amplia distribución, denominado LFA-3. Se han reconocido tres epítomos principales en CD2: T11-1, T11-2 y T11-3. Los 1 y 2 se expresan en todas las células CD2+, mientras que el 3 se induce como consecuencia de la activación celular o estimulación con Ac monoclonales anti- T11-2.

El CD2 presenta ciertas analogías funcionales con el CD16 en las células NK. Por una parte, la estimulación vía CD2 provoca aumento de la concentración de calcio intracelular, y ciertos Ac monoclonales anti-CD2 estimulan la citotoxicidad de células NK contra dianas tumorales, células normales e incluso contra sí mismas.

NKG2: recientemente se ha descrito un grupo de productos génicos homólogos, denominados NKG2-A, B y C, expresados específicamente por células NK humanas y algunos clones de linfocitos T. Aún no se han descrito Ac monoclonales contra estas moléculas y su papel funcional ha de ser analizado.

GL183/EB6: son dos Ac monoclonales que reconocen dos estructuras monoméricas de 55-58 kD, expresadas de forma exclusiva en una proporción variable de células NK y una fracción minoritaria de linfocitos T. La proporción de células NK periféricas que expresan uno o ambos Ag oscila entre un 25-80% en distintos individuos. Las estructuras reconocidas por ellos son capaces de transducir señales intracelulares con aumento de la concentración de calcio intracelular, activan la citotoxicidad contra dianas tumorales humanas y coestimulan la producción de TNF-alfa por células NK en presencia de dosis subóptimas de ésteres de forbol.

Antígeno Kp43: antígeno de diferenciación leucocitaria constituido por un dímero de 70 kD. Su expresión está esencialmente restringida a células NK, una subpoblación de linfocitos T gamma/delta y una fracción minoritaria de células T alfa/beta CD8+, CD56+ (105-106). La IL-2 induce el aumento de expresión de este Ag en la membrana celular. La estimulación de células NK con el Ac monoclonal anti-Kp43 provoca una rápida agregación homotípica dependiente de la interacción LFA-1/ICAM-1; la inducción de actividad citolítica contra células no tumorales, normalmente resistentes a la lisis, mediante un mecanismo dependiente de cationes divalentes, en el que participa la integrina leucocitaria LFA-1; la activación de la biosíntesis y secreción de TNF-alfa, asociada a un incremento de los niveles de RNA-m específico, sin prolongar la vida media de éste, lo que sugiere un efecto regulador sobre la transcripción; la inhibición parcial de la proliferación dependiente de IL-2, que se acompaña de una pérdida progresiva de viabilidad celular.

La activación vía Kp43 complementa la estimulación mediada a través de CD16 en células NK y de CD3 en linfocitos T gamma/delta. La molécula Kp43 puede corresponder a un receptor de superficie que, al interactuar con su hipotético ligando, desempeñaría un papel accesorio en la regulación funcional de células NK y linfocitos T gamma/delta.

2.3. Activación y mecanismos efectores de células NK.-

Cuando las NK dejan la médula ósea, salen a sangre periférica donde se diferencian y donde tienen una vida media corta. La característica más llamativa de las NK es que las células circulantes, en reposo, son células activas funcionalmente naturales, es decir, pueden ser estimuladas para lisar una célula diana en minutos, cuando se enfrenta a una diana apropiada o a una célula diana unida a Ac. Otras funciones de las NK, como la producción de linfoquinas y la regulación de las células hematopoyéticas y de la respuesta inmunitaria adaptativa, también son mediadas por NK en reposo. Esta capacidad de las células NK para responder a un estímulo sin necesidad de preactivación las capacita para participar en la primera línea de defensa contra varios patógenos. Por ello, son parecidas a otras células de la inmunidad no adaptativa, como los granulocitos y los monocitos/macrófagos. También como en éstas últimas, la actividad funcional NK aumenta por citoquinas como el IFN y la IL-2.

El proceso por el que las NK se activan para lisar sus dianas y segregar citoquinas consta de varias etapas:

- 1.- Se produce interacción con las células diana y las NK las reconocen por medio de moléculas receptoras en su superficie.
- 2.- Estas moléculas deben transmitir una señal a través de la membrana celular indicando que han sido ligadas.
- 3.- Esta señal debe activar la maquinaria citolítica y secretora, pudiendo producir una inducción de la expresión de los genes de las citoquinas.
- 4.- Separación de la célula efectora de la diana y muerte de ésta.

2.4. Mecanismos de citotoxicidad.-

El mecanismo lítico mejor conocido en las células NK es la secreción de gránulos líticos (granulosomas). La desgranulación se produce tras el contacto con la diana, una vez que los gránulos se han polarizado hacia la zona de contacto de las dos células, y conlleva el vertido de perforinas (PFP), serina esterases y proteoglicanos al espacio intercelular. La secreción de los gránulos se asocia a estímulos que activan el catabolismo de los fosfolípidos y provocan aumento de la concentración de calcio intracelular en la célula efectora. Este proceso ocurre durante la actividad ADCC y se ha detectado en la citotoxicidad de células NK contra dianas como K-562.

Las células NK segregan el NKCF tras interactuar con las células diana, que es citotóxico para las dianas sensibles (107-109). Este factor seguramente engloba a más de una molécula, pues se ha demostrado que en algunas ocasiones la actividad medida es dependiente de TNF, lo que indica que éste sería un componente del NKCF (110).

Las moléculas responsables de la actividad lítica de los gránulos son las PFP (111), que son proteínas de 70 kD que tienen cierta homología con el componente C9 del complemento (112) y que polimerizan a temperatura fisiológica de forma dependiente de calcio, formando canales tubulares al insertarse en la membrana de la célula diana, cuya destrucción tiene lugar por un mecanismo de lisis osmótica. En cuanto a las proteasas y proteoglicanos, su función no está claramente establecida. Algunos datos sugieren un papel regulador del proceso lítico así como de protección de la célula efectora durante la lisis de la diana. Otro de los fenómenos asociados a la actividad citotóxica es la inducción de apoptosis en la célula diana. Dicho proceso se caracteriza por una serie de alteraciones morfológicas de la célula y por la rotura del DNA (113) en fragmentos de 200 pares de bases, siendo estos fenómenos detectables en una fase anterior a la lisis de la membrana

plasmática. Dicho efecto parece ser independiente de PFP, habiéndose sugerido la participación de otros fenómenos citotóxicos alternativos o complementarios. Citoquinas como TNF-alfa o IFN-gamma son capaces de inducir apoptosis en algunas dianas y cooperar con las PFP. Se ha descrito una proteasa contenida en los gránulos, denominada fragmentina, capaz de provocar la fragmentación del DNA de células diana dependiendo de la secreción previa de PFP.

En base a todo esto, es probable que el proceso citotóxico dependa de la actuación combinada de varios mecanismos y de la sensibilidad variable de cada tipo de célula diana a los mismos. Se ha propuesto un modelo que integra la participación de distintos elementos, sugiriendo que la acción de las PFP permitiría la entrada de otros productos secretados por la célula NK y que contribuirían al proceso tóxico.

Se desconoce el mecanismo de protección por el que las NK no son autodestruídas por sus propios mecanismos citotóxicos. Se ha detectado la presencia de moléculas de interacción celular (CD3, CD8, receptor de células T y CMH de clase I) en granulosomas de linfocitos T citotóxicos, habiéndose propuesto un modelo según el cual la direccionalidad de la lisis vendría condicionada por las moléculas de interacción celular presentes en los gránulos líticos. También se ha postulado, por analogía con el papel del factor de restricción homóloga del complemento (HRF) (114), la presencia de moléculas protectoras frente a factores líticos en la membrana de las células efectoras.

2.5. Receptores implicados en la interacción NK-célula diana.-

Las células NK presentan un elevado potencial citolítico contra diversas dianas, aunque no todas las interacciones celulares mediadas por las NK son citotóxicas. Estas células pueden activar a otras a través de su interacción con ellas, como en el caso de la

estimulación de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos a partir de precursores de médula ósea. La cuestión de cuáles son los elementos implicados en la interacción de las NK con otras poblaciones, y de qué manera se determina el tipo de respuesta efectora (citotoxicidad y patrón de secreción de citoquinas) está aún por resolver. Es indudable que las proteínas de adhesión celular juegan un papel fundamental en la citotoxicidad, si bien su participación es variable dependiendo de la diana. A este respecto cabe citar que el bloqueo de interacciones mediadas por LFA-1 y CD2 puede inhibir completamente la lisis de Daudi, pero no la de K562 y otras dianas. Además de éstas, otras proteínas de membrana, como CD56 y la recientemente descrita p110, están implicadas en la citotoxicidad contra diversas dianas. Otros resultados sugieren fenómenos de reconocimiento adicionales a este tipo de interacciones. Los antígenos del CMH de clase I de la diana pueden intervenir en la fase de reconocimiento por parte de la célula NK.

En definitiva, las células NK disponen de diferentes mecanismos de reconocimiento de células diana, a través de la detección de moléculas del CMH de clase I o a través de otras estructuras de reconocimiento/interacción. Hay que destacar también la importancia de otras moléculas como integrinas y CD2, susceptibles de regular la actividad citotóxica de las células NK y tal vez determinantes del reconocimiento de dianas concretas (114-115). La selectividad de las NK podría estar determinada por la expresión relativa de varias moléculas de superficie celulares y de receptores, y todas las moléculas discutidas podrían tener algún papel en el reconocimiento o en las fases post-uni6n, y ninguna molécula jugaría un papel único o esencial (91).

2.6. Regulaci6n de la actividad citot6xica y de la proliferaci6n de NK.-

1.- Interferones: aumentan la actividad citot6xica de las NK (116) tanto los

interferones alfa y beta, que no son producidos por las NK, como el IFN-gamma. Los mecanismos por los que actúan son: 1) aumenta el número de células que se unen a la diana y aumenta la proporción de células citotóxicas (117); 2) acelera la cinética de la lisis (118); 3) aumenta la capacidad de reciclaje de las NK activas; 4) aumenta la síntesis y/o secreción de NKCF.

2.- IL-2: producida exclusivamente por subpoblaciones de linfocitos T activados, es un potente estimulante de la activación NK in vitro e in vivo (119-120). Actúa provocando la entrada en el ciclo celular de la mayoría de las células NK circulantes. Este efecto es mediado a través del receptor de IL-2 de afinidad intermedia (p75), que se expresa con mayor densidad que en linfocitos T. La IL-2 también induce la expresión de su receptor de baja afinidad (p55, TAC o CD25). El efecto mitogénico de la IL-2 es potenciado por diversos estímulos, tales como la activación a través de CD2 y CD16, la interacción con dianas como Daudi y RPMI 8866 y la estimulación por otras citoquinas como la IL-1, IL-5, IL-7 y TNF-alfa. La estimulación de las NK por la IL-2 se traduce en un estado de activación que conlleva: la expresión de nuevos antígenos de superficie como el CD69, el HLA-DR, el 4F2, el receptor de transferrina (TfR) o el T10; el aumento de los niveles de proteínas ya expresadas basalmente como CD2, CD11a, CD54 y CD58, así como la inducción de la biosíntesis de citoquinas. Induce la producción de TNF-alfa, IFN-gamma y GM-CSF.

3. Factor estimulante de las células NK (NKSF o IL-12): citoquina constituida por dos subunidades de 40 y 35 kD unidas por puentes disulfuro, y producida por ciertas líneas B linfoblastoides. Induce la producción de IFN-gamma, potenciando la acción de la IL-2. Es capaz de inducir también la producción de TNF-alfa. Estimula la proliferación de células NK, aunque su actividad mitogénica es inferior a la de la IL-2. También estimula la actividad

citotóxica, al incrementar la expresión de proteínas de adhesión intercelular como CD2, CD11a y CD54.

Se han descrito efectos de otras citoquinas sobre las células NK: la IL-1 coestimula la citotoxicidad en combinación con IL-2 e IFN-gamma. La IL-7 induce la proliferación de NK, la producción de TNF-alfa y la expresión de receptores para TNF-alfa e IL-2. El TNF-alfa aumenta la expresión de CD25 y la actividad citotóxica de las NK. La IL-4 inhibe la proliferación y la actividad citolítica si las células no han sido estimuladas con IL-2, desapareciendo esta acción si las células ya estaban estimuladas con la IL-2.

2.7. Producción de citoquinas por las células NK.-

Son capaces de producir citoquinas cuando se estimulan de forma apropiada: IFN-gamma, TNF-alfa y beta, GM-CSF, M-CSF e IL-3. La producción de citoquinas está regulada por diferentes estímulos: otras citoquinas (IL-2 y NKSF), la activación vía CD16 mediante inmunocomplejos y Ac monoclonales específicos, la estimulación a través de otros Ag de membrana (CD2, p110) y la interacción de las NK con distintos tipos celulares.

2.8. Papel fisiológico de las células NK.-

Se han propuesto varias funciones para estas células , de las que las más importantes se describen en la tabla 2.

TABLA 2

<ul style="list-style-type: none">1.- Control del crecimiento de células tumorales2.- Control de infecciones<ul style="list-style-type: none">a. Viralesb. Parasitarias (intracelulares y extracelulares)c. Hongosd. Bacterias3.- Propiedades inmunorreguladoras<ul style="list-style-type: none">a. Producción de citoquinas con acción sobre otros leucocitosb. Control del crecimiento y diferenciación de células progenitoras hematopoyéticas4.- Estados de enfermedad<ul style="list-style-type: none">a. Desarrollo de enfermedad injerto contra huéspedb. Rechazo de injertosc. Contribuyen a algunas formas de anemia aplásica/neutropeniad. Potencian enfermedades autoinmunes
--

2.9. Actividad antimicrobiana de las NK.-

1.- Actividad antiviral. Los pacientes con déficit selectivo de células NK tienen frecuentes infecciones por virus varicela-zóster (VVZ), citomegalovirus (CMV), virus de Epstein-Barr (VEB) y otros.

Las NK, junto con los interferones y otros mecanismos de resistencia natural, son la primera línea de defensa del organismo contra ciertos virus, antes de que se activen la inmunidad humoral o celular adaptativa específica de antígeno. Durante una infección vírica, la respuesta de las NK alcanza su pico a los tres días y se sigue de una respuesta de linfocitos T citotóxicos que tiene el pico a los 7-9 días. El aumento de la actividad NK se debe a un

aumento absoluto de su número, que se originan "de novo" en la médula ósea, por inducción por IFN, y que se van a localizar de forma preferente en los órganos infectados. El IFN-alfa es el mayor responsable del aumento de la citotoxicidad de las NK contra células diana infectadas por virus, y sus niveles sistémicos se corresponden con los niveles de actividad NK.

2. Actividad en infecciones bacterianas. Las NK tienen un papel activo en la respuesta antibacteriana: son capaces de migrar y concentrarse en el foco de inflamación; in vitro, pueden unirse y matar a ciertas bacterias, y pueden producir citoquinas que median la respuesta inflamatoria. En la mayoría de los casos, las infecciones bacterianas producen un aumento precoz y significativo de la actividad NK en el bazo y en el compartimento linfoide cercano al área de infección, pero no se sabe si esto es beneficioso para la supervivencia del huésped o tiene un efecto perjudicial. El principal mecanismo de las NK contra las infecciones bacterianas puede ser el dependiente de la producción de citoquinas como IFN-alfa, gamma, GM-CSF, TNF y factor quimiotáctico de los macrófagos, que activarían a otras células efectoras de la inmunidad no adaptativa. La acción sobre bacterias incluye: Gram + (*Listeria*, *Corynebacterium parvum*, *Estafilococos*), Gram - (*Salmonella*, *Shigella*, *Serratia* y *Legionella*), *Micobacterias* y *Mycoplasma* (121-122).

3. Actividad en infecciones fúngicas. Pueden también inhibir el crecimiento de algunos hongos, como el *criptococo* y *coccidioides*. La *candida albicans* aumenta la actividad NK al inducir la producción de TNF desde NK y monocitos, pero sin embargo no la eliminan. Su actividad fungicida podría ser a través de la activación de neutrófilos y macrófagos.

4. Actividad en infecciones por parásitos y protozoos. La infección por protozoos como *Plasmodium berghei* o *Toxoplasma gondii* activa a las células NK con aumento de

actividad citolítica frente a dianas tumorales. Además, *Toxoplasma gondii* estimula la producción de IFN-gamma, para lo que se requiere la cooperación de macrófagos y producción por parte de éstos de TNF-alfa y de IL-12. *Leishmania major* también estimula a las células NK para producir IFN-gamma, y lo mismo para *Cryptosporidium parvum* (122).

2.10. Células NK y virus de la inmunodeficiencia humana.-

La alteración en la citotoxicidad de las NK es uno de los hallazgos inmunológicos descritos en la infección por el VIH y tanto en éste como en otros aspectos que se analizan a continuación se encuentran muchas contradicciones. Así, se ha visto disminuída en los pacientes con SIDA (123-125) y con el llamado complejo relacionado (126,127), mientras que en los asintomáticos hay autores que la encuentran normal (74,124,128-129), elevada (130) y otros disminuída (126,131-132). Por último, otros estudios han demostrado que la actividad NK es similar en los sujetos sanos y en los infectados (69,130,133), independientemente del grado de evolución de la enfermedad. Esta alteración forma parte de la disfunción general inmune de los pacientes infectados y se supone que puede conducir a la progresión de la enfermedad, por su implicación en la protección contra infecciones y tumores. La falta de control por las NK en el crecimiento de patógenos que activan el gen de infectividad tat del VIH-1 puede también favorecer la progresión a SIDA.

La patogénesis del déficit no es conocida y podría ser consecuencia de:

- 1.- Disminución del número de las NK.

Portilla et al (134) encuentran disminución de los linfocitos con fenotipo NK a medida que progresa la enfermedad. Otros autores apoyan estos hallazgos (130,135) y Margolick et al (135) sugieren que la disminución de forma precoz tras la seroconversión puede predisponer a la progresión de la infección. Estos datos contrastan con los de otros autores

que encuentran que el fenotipo y el número de las NK son normales (125-127,133,136), o incluso que las células NK con fenotipo CD8+ estarían aumentadas (129). Formenti et al (137) han descrito que el número de células CD2- NKH-1+ es normal en pacientes diagnosticados de SIDA con infecciones oportunistas, mientras que está disminuído en los diagnosticados de sarcoma de Kaposi, en los que presentaban linfadenopatía generalizada persistente y en los asintomáticos, ocurriendo lo mismo con la población CD2+ NKH-1+.

2.- Alteración en el reconocimiento de la célula diana. La unión a la diana se produce en todos los pacientes, lo que parece que descarta la existencia de factores que puedan bloquear la unión. Sin embargo, Scott-Algara et al (138) han demostrado que esta unión está alterada en pacientes con SIDA diagnosticado y sarcoma de Kaposi.

3.- Alteración de los mecanismos que se producen tras la unión a la célula diana, por inhibición de las vías de transducción de la señal, que daría lugar a defecto en la lisis celular (125,136,138). Según algunos estudios, el defecto se localizaría en la fase de la lisis post-unión o post-reconocimiento: tras la unión a la célula diana muestran polarización normal de la actina (importante para la unión) pero no polarizan la tubulina alfa y beta (que intervienen en la reorganización de los microtúbulos (139) y no segregan NKCF (127,138). Así, el fallo de las NK en el SIDA estaría a nivel del estímulo para la producción de NKCF. El defecto en la producción de este factor se recupera sólo parcialmente cuando se exponen a IL-2 (127,138), sin que se alcance la respuesta normal, lo que sugiere que una disminución de la producción de esta citoquina puede ser la causa de la disfunción, aunque tal vez otros factores desconocidos hasta ahora puedan estar implicados. La IL-2 aumenta la función de las NK en forma dosis-dependiente (140,141) y esta respuesta no depende de la manifestación primaria de la enfermedad (infección oportunista y/o tumor). El aumento de actividad de las NK en la infección por VIH, tras estímulo in vitro con IL-2, no es atribuible a la producción

secundaria de IFN-gamma por los linfocitos de sangre periférica (142), lo que indicaría que éste no es necesario para que la IL-2 actúe.

La producción de NKCF también se recupera cuando se estimulan por otros medios, como con ésteres de forbol o con IFN-gamma (138). Por otro lado, se ha observado que la producción de TNF-alfa y de IFN-gamma también está disminuída tras la unión a la célula diana, lo que podría ser de interés al estar implicados en el complejo proceso de la lisis (138).

Las células infectadas por virus son reconocidas por las NK (se produce conjugación) pero fallan en el momento de la lisis. La retirada del ácido siálico de la superficie de las células infectadas antes de la incubación con NK dió como resultado que las NK produćían la muerte de las células diana (76). Según estos autores sería de interés examinar si la infección retroviral aumenta la concentración de ácido siálico en la superficie de las células del huésped.

Se han sugerido otros mecanismos que podrían tener también cierto interés. El VIH puede tener tropismo por las células NK e infectarlas directamente, como ha podido ser demostrado en experimentos en cultivos celulares (143). No obstante, no hay evidencia directa de que las células NK CD4- se infecten in vivo por el VIH, y es más probable que un mecanismo patogénico indirecto sea el responsable de la disfunción de estas células en la infección.

Las proteínas del VIH, o fragmentos de ellas, podrían ser responsables del defecto de las NK, así como de otros defectos inmunológicos en pacientes con SIDA. Se ha sintetizado el CKS-17, un heptadecapéptido homólogo a una región de la molécula p15E del VIH-1. Este péptido inhibe la actividad lítica de las células NK humanas frescas aisladas y de las activadas con IFN-alfa (144). También puede inhibir el aumento de la actividad

citólítica NK mediado por linfoquinas, como el IFN-alfa o gamma, pero no del mediado por IL-2, lo que hace pensar que el mecanismo de acción de estas linfoquinas sobre las NK es diferente. La acción del CKS-17 es rápida y de larga duración, pero no irreversible.

Otros péptidos sintéticos, homólogos con alguna secuencia de la gp41, son potentes supresores de la citotoxicidad mediada por células NK contra células K562. Esto sugiere que las proteínas de envoltura pueden modular la función NK en ausencia de infección de estas células por el VIH. El Péptido Inhibidor Vasoactivo (VIP) tiene homología con algunos aminoácidos del receptor CD4 en el sitio de unión para la gp120. Inhibe la infección de células neuronales en cultivo al competir con el sitio de unión de la gp120 con el CD4, e inhibe la quimiotaxis inducida por la gp120 en las células T CD4+. Se ha demostrado que las células NK tienen receptores para VIP y que éste inhibe la actividad NK en linfocitos normales y causa aumento de los niveles intracelulares de AMP-c, que se correlacionan con la disminución de la actividad NK en individuos normales. Por tanto, es posible que interacciones entre receptores de VIP en las NK y la gp120 puedan ser responsables del defecto de las NK en el SIDA.

También se ha demostrado que la gp120 recombinante inhibe la capacidad lítica y la polarización de los microtúbulos de las NK, aunque no afecta a la unión con la célula diana.

En recientes trabajos (145-146) se ha podido demostrar que las células NK pueden ser diana y ser infectadas por un virus, en concreto por el herpes virus tipo 6. Según esto, este virus podría alterar la función de las NK produciendo directamente su muerte o induciendo receptores para el VIH.

En cuanto a la actividad de citotoxicidad celular dependiente de AC (ADCC) se ha observado que está dirigida contra glicoproteínas de envoltura, pero no contra las proteínas dependientes de gag; estos Ac son predominantemente del tipo IgG1 y están dirigidos a

epítomos de gp120 y gp41. In vitro parece ser normal, pues las NK de pacientes con SIDA, tras estímulo con dianas unidas a Ac, fueron capaces de lisarlas y segregar NKCF (147), aunque fueran defectuosas para la citotoxicidad natural. En otros trabajos, se ha visto que la actividad ADCC, determinada en función del título de Ac que median este tipo de citotoxicidad, disminuye con la progresión de la enfermedad (65,66,122,138,148,149): 60% de los pacientes con SIDA y 20% de los asintomáticos tienen títulos menores de 1/3.000.

La causa última de la deficiencia de NK en el SIDA no está clara. Es posible que no haya una sola causa patogénica y que estos mecanismos operen sinérgicamente (76,150). Tampoco se conoce por qué en algunos pacientes la actividad es normal y en otros está alterada. Los pacientes con SIDA tienen muchos defectos inmunológicos y es difícil definir el papel que pueda tener la disminución de la actividad NK en la patogénesis de esta enfermedad. Ya que las NK tienen actividad antimicrobiana y antitumoral, y pueden afectar a la hematopoyesis, resultaría de interés conocer si las NK tienen algún papel en la prevención de infecciones oportunistas o en el desarrollo de sarcomas y si pueden contribuir a las alteraciones hematopoyéticas observadas en estos pacientes.

3. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL.-

El factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) es una citoquina producida principalmente por monocitos y macrófagos, así como por células NK y linfocitos T. Entre otras funciones, el TNF es el principal mediador de la respuesta inflamatoria de cualquier tipo (aguda, crónica, generalizada, inmune, etc.) por lo que tiene un importante papel en el shock séptico; induce en las células endoteliales la expresión de moléculas de adhesión que son esenciales para el acúmulo local de leucocitos. Tiene también una importante función en la eliminación de microorganismos patógenos, sobre todo intracelulares (*Listeria*, *Leishmania*, etc) (151). Su papel en la infección por el VIH aún no está bien establecido. Por ser una citoquina liberada por los macrófagos y éstos una de las principales dianas del virus, se ha pensado que el TNF-alfa podría tener relación con la patogenia de la enfermedad (152).

Induce la expresión del VIH en células T crónicamente infectadas (153-154) y en células monocíticas (155-156), de manera autocrina-paracrina, actuando en los mecanismos transcripcionales con activación del NF-kB (19,26,44,49,157-159). En estudios recientes se han corroborado estos hechos al demostrar que el TNF-alfa induce la expresión de un VIH latente, defectuoso en la proteína tat, y se ha mantenido su replicación en células T y mononucleares (160). De esta forma, la inducción de la expresión del VIH por el TNF-alfa tendría un papel importante en los estadios precoces del ciclo vital del virus y en la latencia viral.

La determinación de TNF-alfa en el suero de los pacientes infectados ha dado resultados dispares, desde niveles indetectables (161-162) hasta importantes aumentos en los estadios más avanzados de la infección (163-166) por lo que no se ha podido correlacionar con las fases de la enfermedad (167). Algo similar ocurre con la determinación de la citoquina en cultivos de monocitos purificados, donde se han encontrado niveles disminuidos

(168) o aumentados (169-171) dependiendo de los estudios revisados. Por último, la determinación en suero de receptores solubles de TNF-alfa se ha demostrado que aumenta en paralelo con la severidad del estadio clínico, lo que podría servir como un marcador potencial de progresión de la enfermedad (172).

OBJETIVOS

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida ha sido objeto en los últimos diez años de una importantísima atención investigadora. A pesar de ello, persisten numerosas incógnitas sobre esta enfermedad. Con el presente trabajo hemos pretendido aportar nuestra contribución a su estudio, abordando los siguientes objetivos:

1º.- Evaluar las diferencias en el número de pacientes que evolucionan a caso-SIDA y su supervivencia tras el diagnóstico de SIDA, según la definición de 1987 y la más reciente de 1992, para establecer la utilidad de la nueva clasificación en la práctica clínica y comprobar si el hecho de ampliar el número de enfermedades indicadoras puede suponer un cambio en la orientación pronóstica de los pacientes.

2º.- Estudiar el número de células NK y su fenotipo en función de la expresión de tres antígenos de diferenciación leucocitaria: Kp43, CD16 y CD56. Evaluar la utilidad del Kp43 (nuevo antígeno de diferenciación de células NK identificado en el laboratorio de Inmunología del Hospital de la Princesa) para el estudio de las células NK en la infección por VIH y su posible relación con la aparición de diferentes enfermedades asociadas al VIH.

3º.- Realizar un estudio funcional de las células NK y los linfocitos T, analizando su capacidad de producción del factor de necrosis tumoral (TNF-alfa).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. CONSIDERACIONES GENERALES.-

En el periodo comprendido entre enero de 1991 y mayo de 1993 se estudiaron de forma prospectiva 94 pacientes diagnosticados de infección por VIH en diversos estadios de la enfermedad. Para clasificar a los pacientes se siguieron los criterios de los "Centers for Diseases Control" (CDC) de 1987 (9) y a posteriori se les incluyó también en el grupo correspondiente en base a la nueva clasificación de 1992 (10). Además se incluyeron 25 sujetos sanos voluntarios que se enmarcan dentro de un grupo control, procedentes del personal sanitario de nuestro hospital, todos ellos con estudio analítico dentro de la normalidad.

En todos los pacientes se recogieron datos epidemiológicos, clínicos y analíticos, y se siguió su evolución hasta el fin del estudio, hasta que el paciente falleció o se perdió en el seguimiento.

En todos los casos (pacientes y controles) se realizó estudio de marcadores linfocitarios. En 49 casos (33 pacientes y 16 controles) se hizo estudio funcional de linfocitos T y células NK, para determinar la producción de TNF-alfa. Los resultados obtenidos en estos estudios se compararon con el grupo de controles sanos. Se siguió la clasificación de SIDA de 1992 para estratificar a los pacientes en el momento de hacer el estudio estadístico, basándonos en los grupos según el número de linfocitos T CD4+ (grupo 1, 2 y 3). Además, se realizó un estudio comparativo del número de células NK para ver si podía existir alguna relación con las enfermedades aparecidas en los pacientes, y para ello los clasificamos también en grupos A, B y C, dependiendo de los síntomas o enfermedades que hubieran padecido, según la definición de SIDA de 1992. En primer lugar se compararon los resultados de forma global (pacientes que habían padecido la enfermedad frente a los que no la habían padecido) y también se compararon los que la habían padecido con los que no, pero

restringidos a los grupos B y C definidos por la presencia de esa enfermedad.

2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA ESTUDIO DE MARCADORES

LINFOCITARIOS.-

Se obtuvieron 30 ml de sangre total en tubos de 10 ml con heparina y todas las muestras se procesaron de forma inmediata. Mediante centrifugación con Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia) se separaron las células mononucleares de la sangre venosa heparinizada. Estas células se concentraron por centrifugación (10 minutos a 1500 rpm) y se resuspendieron posteriormente en RPMI 1640. Las células recuperadas se lavaron dos veces y fueron sometidas a un choque hipotónico para lisar los eritrocitos residuales mediante resuspensión de los sedimentos celulares en agua destilada durante 15 segundos. Este paso se llevó a cabo para evitar que quedaran en la muestra células no mononucleares, que pudieran artefactar los resultados del estudio fenotípico disminuyendo la proporción de células CD45+. Posteriormente se diluyeron en medio suplementado con un 10% de suero de ternera fetal más penicilina y estreptomycinina.

En este momento se hizo un conteo de células antes de someterlas al siguiente paso. El número de células obtenidas osciló entre $3,7 \times 10^6$ y 32×10^6 , con una media de 15×10^6 .

El siguiente paso consistió en la separación de las células mononucleares mediante centrifugación en un gradiente de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia). Se decidió hacer la separación celular por esta técnica porque en estudios preliminares la realizamos con adherencia al plástico y la recuperación fue mas bien escasa. Tampoco hicimos separación en columna de nylon porque esta técnica puede implicar la pérdida de hasta un 30% de todas las células, situación que no deseabamos, ya que nuestros pacientes

estaban mayoritariamente leucopénicos. El Percoll es sílice coloidal recubierto de PVP, que forma un compuesto denso e inerte. Sus ventajas son: poca viscosidad, baja osmolaridad (20 mOs/Kg de H₂O), alta densidad (1130 g/l) e inocuidad. Para realizar esta separación se preparó una solución con 92 partes de Percoll y 8 partes de PBS concentrado (10×) a una osmolaridad de 285 mOs/Kg. A 46 partes de esta solución se le añadieron 54 partes de RPMI 1640 y la mezcla final fue la que se utilizó para separar las células. Sobre 10 ml de la mezcla se depositaron lentamente las células resuspendidas en 2 ml de medio suplementado con suero de ternera fetal y se centrifugaron 30 minutos a 1800 rpm. Así, se obtuvieron dos poblaciones celulares, una de alta densidad que formaba el sedimento en el fondo del tubo, cuya composición era fundamentalmente linfoide, y otra de baja densidad que quedaba en la interfase, cuya composición era fundamentalmente de monocitos.

Ambas poblaciones por separado se diluyeron en RPMI 1640 y se procedió a un lavado, tras el que se resuspendieron en medio suplementado con un 10% de suero de ternera fetal con penicilina y estreptomicina. Tras esto, se contaron las células de ambas fracciones para comprobar la recuperación que osciló globalmente entre 80 y 100%, con una media de 95%. Del total de células recuperadas, entre 80-90% correspondían a la fracción de alta densidad y entre 10-20% a la de baja densidad.

Al llegar a este punto se retiró la cantidad necesaria de células para proceder al estudio con anticuerpos monoclonales (aproximadamente 50×10^3 para cada anticuerpo). El resto de las células se reservaron para proceder a continuación al estudio funcional.

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron los mismos para el estudio de las dos poblaciones, incluyendo: CD45, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD16, CD56, Kp43, CD2 y CD19. Se introdujeron estos anticuerpos para estudiar linfocitos T y subpoblaciones (CD2, CD3, CD4, CD8), células NK (CD16, CD56, Kp43), linfocitos B (CD19) y monocitos

(CD11b). La población de alta densidad (compuesta fundamentalmente de linfocitos) es la que se usó para realizar el estudio funcional y sobre la que se analizaron los resultados del fenotipo. El análisis de la otra población nos permitió comprobar la pérdida mínima de células linfoides en la separación (<10% de células CD3+, >80% de células CD11b+ y <5% de células CD56+ en la población de baja densidad).

El antígeno Kp43 es un nuevo antígeno de activación/diferenciación leucocitario, descubierto en el laboratorio de Inmunología de nuestro centro y cuya expresión está restringida a células NK (de forma predominante), linfocitos T gamma/delta y una subpoblación minoritaria de linfocitos T alfa/beta CD8+ CD56+. El hecho de su distribución primordial en las células NK nos ha impulsado a analizarlo comparativamente en relación con los marcadores convencionales de células NK (CD16 y CD56).

El estudio con anticuerpos monoclonales se inició incubando con Ig humana agregada (50 µg/ml) para bloquear la unión inespecífica a los receptores Fc con posterior lavado para resuspender en suero fisiológico. Fueron teñidas por inmunofluorescencia indirecta incubando con los correspondientes anticuerpos, y tras los lavados, con el fragmento F(ab')₂ de un antisuero de cabra anti-IgG de ratón, marcado con fluoresceína (Mouse immunoglobulins, Dako TTS, Dinamarca). Las muestras obtenidas fueron analizadas por un citómetro de flujo (FACS) acumulando al menos 1.000 células para cada muestra. En cada caso, más del 95% de las células seleccionadas se marcaron con un anticuerpo monoclonal específico para CD45 (antígeno común leucocitario). La proporción de células positivas para cada marcador se estimó sustrayendo el fondo de fluorescencia (control negativo) de las células incubadas con el sobrenadante del mieloma P3X63.

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA PRODUCCIÓN DE TNF-

ALFA.-

Las placas de fondo plano de 96 pocillos (Costar 200 μ l/pocillo) se prepararon con los diferentes estímulos a ensayar, previamente a la siembra de las células. Para ello se preadsorbió a la placa el fragmento F(ab')₂ de un antisuero anti-IgG de ratón (Sigma Chem Co., St Louis, Mo, USA), a una concentración de 10 μ g/ml en PBS con pH alcalino, durante 24 h a 4°C. Después de lavar con PBS (4 \times) se incubaron con los correspondientes anticuerpos monoclonales. Se utilizaron tres pares de pocillos por muestra, uno para cada estímulo, que fueron los siguientes:

- Anticuerpo anti-CD2 (2 pocillos), como estímulo inespecífico.
- Anticuerpo anti-CD3 (2 pocillos), como estímulo para linfocitos T.
- Anticuerpo anti-CD16 (2 pocillos), como estímulo para células NK.

Tras dos horas de incubación a 4°C se lavaron las placas con PBS (4 \times) y se sembraron las células de la población de alta densidad, inmediatamente después de haberlas obtenido, poniendo en cada pocillo 4 \times 10⁵ células. Se cultivaron en medio completo en presencia y ausencia de 500 U/ml de r-IL-2.

Después de 24 h de cultivo en estufa a 37°C se centrifugaron las placas y se cuantificó el TNF-alfa en los sobrenadantes libres de células utilizando un método de ELISA.

4. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE TNF-

ALFA.-

El TNF-alfa se analizó por una técnica de ELISA puesta a punto en nuestro laboratorio empleando dos anticuerpos monoclonales específicos (9/17 y 10/18) cedidos amablemente por Laboratorios Andrómaco S.A. A continuación describimos el desarrollo de

la técnica.

El anticuerpo monoclonal 9/17 (20 $\mu\text{g/ml}$) diluido en PBS se adsorbe en placas de 96 micropocillos de fondo plano (Costar, 50 $\mu\text{l/pocillo}$) incubando a 4°C durante 12-18 h. Se lava (3 \times) con PBS y se incuba 1 h a 37°C con leche en polvo desnatada diluida al 1% en PBS. Después de tres lavados con PBS y leche al 0.05%, se incuban por duplicado 1 h a 37°C cada una de las muestras (50 $\mu\text{l/pocillo}$), así como las diluciones seriadas de una preparación de TNF recombinante purificado como patrón, dejando varios pocillos como control negativo (blanco).

Las placas se lavan (3 \times) con 200 $\mu\text{l/pocillo}$ de PBS y Tween-20 (Sigma) al 0.05%. Se incuba una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal 10/18 previamente marcado con biotina (Pierce) (0.1 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{l/pocillo}$) y diluido en PBS-Tween. Se lava (4 \times) con PBS-Tween y se incuba 1 h con Avidina marcada con peroxidasa (Pierce)(dilución 1/1000 en PBS-Tween). Tras lavar (5 \times) con PBS-Tween se añaden 50 μl de una solución tampón citrato fosfato (pH=5) suplementada con ortofenil diamina (OPD, Sigma 0.4 mg/ml) y H_2O_2 al 0.4%. Se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente y se para la reacción con SO_4H_2 2N (50 $\mu\text{l/pocillo}$).

La densidad óptica (D.O.) se lee aplicando un filtro de 492 nm. La curva patrón se representa en función de la D.O. obtenida para cada una de las concentraciones conocidas de la dilución de TNFr, y las concentraciones de cada muestra problema se estiman interpolando la D.O. correspondiente en la zona lineal de la curva. El límite inferior de sensibilidad de esta técnica es de 50 pg/ml.

Para realizar el estudio comparativo entre producción de TNF-alfa en controles y en los pacientes en respuesta a los estímulos específicos, decidimos normalizar los resultados calculando el índice de estimulación como el cociente entre la producción de TNF detectada

en respuesta al estímulo específico y la concentración de la citoquina en el control correspondiente. Esta aproximación atenúa el efecto de la importante dispersión de los resultados de TNF que observamos al comparar las concentraciones y, al mismo tiempo, soslaya la eventual superposición de la respuesta de los monocitos residuales. Los cocientes calculados fueron: $CD2+IL-2/CD2$, $CD3/CD2$, $CD16/CD2$, $CD3+IL-2/CD2+IL-2$ y $CD16+IL-2/CD2+IL-2$.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

La probabilidad de desarrollar la enfermedad y la de supervivencia se ha calculado por el procedimiento de Kaplan-Meier. Los resultados se expresan en probabilidad actuarial y error estandar de la estimación. La comparación entre las curvas de probabilidad se realizó mediante el test de log-rank rechazando las hipótesis nulas cuya probabilidad de que se verificaran fuese <0.05 (173).

Para la comparación de las variables cuantitativas entre las distintas muestras se ha utilizado el test de la U de Mann-Whitney. Se rechazaron las hipótesis nulas cuya probabilidad de que se verificasen fuese <0.05 (173).

La relación de las variables cuantitativas en las distintas muestras se estudió mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson, rechazando así mismo las hipótesis nulas cuya probabilidad de que se verificasen fuese <0.05 (173).

RESULTADOS

1. EVOLUCIÓN.-

1.1. Evolución a caso SIDA según la clasificación de 1992.-

Se han estudiado 94 pacientes diagnosticados de infección por VIH en diversos estadios, con un tiempo de seguimiento desde el diagnóstico de la infección de 0 a 98 meses, mediana 42 meses. Los datos epidemiológicos se describen en la tabla 3:

TABLA 3

<u>SEXO</u> <u>(PROPORCIÓN)</u>	68♂, 26♀ (2,6/1)
<u>EDAD MEDIA</u> <u>(RANGO)</u>	31 (19-53)
<u>GRUPO DE RIESGO</u>	
ADVP	58
HOMOSEX/BISEX	23
HETEROSEXUAL	11
DESCONOCIDO	2

Los estadios al diagnóstico según la clasificación de 1992 fueron los siguientes (tabla 4):

TABLA 4

A1	57	B1	5	C1	1
A2	5	B2	3	C2	5
A3	5	B3	3	C3	10

Por lo tanto, 24 pacientes ya fueron diagnosticados de SIDA en el momento de la presentación. El motivo diagnóstico de estos 24 pacientes fue: en 7 casos por presentar cifra

de linfocitos T CD4+ menor de 200/mm³, en 6 por enfermedad indicadora (grupo 1) y en 11 por ambos criterios (grupo 2). Las enfermedades indicadoras fueron:

Grupo 1:

- Tuberculosis diseminada: 3
- Neumonía por *Pneumocystis carinii*: 2
- Tuberculosis pulmonar: 1

Grupo 2:

- Neumonía por *Pneumocystis carinii*: 6
- Candidiasis esofágica: 1
- Tuberculosis diseminada: 1
- Cryptosporidiasis: 1
- Encefalopatía VIH: 1
- Toxoplasmosis cerebral: 1

De los 70 pacientes no diagnosticados de SIDA al conocerse en ellos la infección, en 8 no se ha podido seguir evolución por haberse perdido en el seguimiento (no asistieron a más controles) y su tiempo de seguimiento ha sido de 0 a 79 meses (mediana 37). Así, se conoce la evolución en 62 pacientes, a los que se ha seguido entre 2 y 97 meses (mediana 45) y son los que se analizan.

De esos 62 pacientes, 33 han cumplido criterios de caso-SIDA en un tiempo que oscila entre 2 y 95 meses (mediana 67) y 29 no, en un tiempo entre 3 y 97 meses (mediana 55).

El estadio al diagnóstico de infección por VIH de los que no evolucionan a SIDA se describe en la tabla 5 y el de los que evolucionan a SIDA en la tabla 6.

TABLA 5

A1	26	B1	2
		B2	1

TABLA 6

A1	25	B1	3
A2	4	B2	1

Otros datos epidemiológicos se exponen en la tabla 7:

TABLA 7

	<u>GRUPO QUE NO DESARROLLA SIDA</u>	<u>GRUPO QUE DESARROLLA SIDA</u>
	n=29	n=33
<u>EDAD MEDIA</u>	32	30
<u>SEXO</u> <u>(PROPORCIÓN)</u>	20 ♂, 9 ♀ (2,2/1)	26 ♂, 7 ♀ (3,7/1)
<u>GRUPO DE RIESGO</u>		
ADVP	13	25
HOMOSEX/BISEX	12	6
HETEROSEXUAL	4	2

El motivo diagnóstico de SIDA en los 33 pacientes fue: 13 por tener una cifra de linfocitos T CD4+ menor de 200/mm³, 10 por enfermedad indicadora (grupo 1) y 10 por ambos criterios (grupo 2). Las enfermedades indicadoras fueron:

Grupo 1:

- Caquexia VIH: 3
- Tuberculosis diseminada: 1
- Sarcoma de Kaposi: 1
- Candidiasis esofágica: 1
- Tuberculosis pulmonar o neumonía recurrente: 4

Grupo 2:

- Neumonía por *Pneumocystis carinii*: 2
- Linfoma no Hodgkin: 3
- Toxoplasmosis cerebral: 2
- Tuberculosis diseminada: 3

La incidencia acumulada de desarrollar SIDA al primer año tras el diagnóstico fue del $21 \pm 5\%$, al segundo año del $33 \pm 6\%$ y al tercer año del $37 \pm 6\%$ (Gráfico 1).

En la siguiente página (tabla 8) se exponen las enfermedades que han tenido los pacientes antes del diagnóstico de SIDA (Grupo 1) y las que han tenido los no diagnosticados de SIDA (Grupo 2) y el número de pacientes en los que se han presentado.

TABLA 8

	<u>GRUPO 1</u> n=33	<u>GRUPO 2</u> n=29
<u>LEUCOPLAQUIA</u>	1	1
<u>CANDIDIASIS ORAL</u>	14	3
<u>HEPATITIS B PASADA</u>	15	10
<u>ETS</u>	7	7
<u>HERPES ZÓSTER</u>	5	1
<u>DERMATITIS SEBORREICA</u>	2	3
<u>INFECCIÓN AGUDA CMV</u>	1	0
<u>HERPES SIMPLE</u>	1	1
<u>NEUMONIA BACTERIANA</u>	7	0
<u>ENDOCARDITIS/SEPSIS</u>	1	1
<u>HEPATITIS CRÓNICA</u>	6	6
<u>POLINEUROPATÍA</u>	4	0
<u>NINGUNA</u>	4	3

Si el paciente había sufrido al menos un episodio de candidiasis oral (total de pacientes 17), la incidencia acumulada de desarrollar SIDA al cabo de un año fue del $27 \pm 11\%$, al segundo año del $53 \pm 13\%$ y al tercer año del $56 \pm 13\%$, con una mediana de 24 meses, mientras que si no habían tenido ningún episodio ($n=45$), los valores fueron del $19 \pm 6\%$, $25 \pm 7\%$, $29 \pm 7\%$ y 83 meses respectivamente ($p < 0.01$) (Gráfico 2).

En el caso del herpes zóster (total de pacientes 6), si había tenido un episodio, la incidencia acumulada de desarrollar SIDA al primer año de seguimiento fue del 0% , al segundo año del $25 \pm 22\%$, igual que al tercer año, con mediana de 68 meses, y si no lo había tenido ($n=56$), los valores fueron del $22 \pm 6\%$, $32 \pm 7\%$, $38 \pm 7\%$ y 72 meses respectivamente (p NS) (Gráfico 3).

Para la neumonía bacteriana antes de tener SIDA (total de pacientes 7), al primer año de seguimiento la incidencia acumulada de evolucionar a SIDA si la padecieron fue del $18 \pm 8\%$, igual que al segundo y al tercer año con mediana de 71 meses, y si no la padecieron

(n=55) la incidencia acumulada fue del $20\pm 7\%$, $38\pm 8\%$, $44\pm 9\%$ y mediana 44 meses respectivamente (p NS) (Gráfico 4).

Si consideramos la aparición de cualquier enfermedad antes de desarrollar SIDA (total de pacientes 55), comparado con los que no tuvieron ninguna (n=7), al primer año de seguimiento la incidencia acumulada en el primer caso fue del $22\pm 6\%$, al segundo año del $36\pm 7\%$ y al tercer año del $39\pm 7\%$, con mediana de 54 meses y en el segundo caso del $17\pm 11\%$, $17\pm 11\%$, $26\pm 13\%$ y 76 meses respectivamente (p NS) (Gráfico 5).

En cuanto al grupo de riesgo, al primer año de seguimiento los pacientes ADVP (total 38) tenían una incidencia acumulada de evolucionar a SIDA del $16\pm 5\%$, al segundo año del $26\pm 6\%$ y al tercer año del $30\pm 7\%$ con mediana de 83 meses, y el resto de los grupos (n=24) del $50\pm 18\%$, $75\pm 7\%$, $75\pm 7\%$ y 11 meses respectivamente (p < 0.01) (Gráfico 6).

Si la cifra de linfocitos T CD4+ al diagnóstico de la infección era mayor de $400/\text{mm}^3$ (total 56 pacientes) la incidencia acumulada de evolucionar a SIDA al primer año de seguimiento fue del $13\pm 5\%$, al segundo año del $27\pm 6\%$ y al tercer año del $31\pm 7\%$ con mediana de 72 meses y si la cifra estaba entre 200 y 400 (n= 6), el 100% desarrollaban SIDA al cabo de un año, con mediana de 3 meses (p < 0.01) (Gráfico 7).

1.2. Evolución a caso-SIDA según la clasificación de 1987.-

De los 94 pacientes estudiados, en el momento del diagnóstico de la infección 15 ya fueron diagnosticados de SIDA, 75 estaban en estadio II o III y 4 en estadio IV sin criterios de SIDA. Por lo tanto, el estudio se hace sobre 79 pacientes, de los que 11 se han perdido en la evolución por no acudir a más controles (su tiempo de seguimiento fue de 0 a 79 meses, mediana 34), quedando 68 que pudieron ser seguidos, en un tiempo de 2 a 98 meses.

De esos 68 pacientes, 28 han cumplido criterios de SIDA en un tiempo que oscila

entre 2 y 98 meses (mediana 31 meses) y 40 no, en un tiempo entre 3 y 97 meses (mediana 47).

La incidencia acumulada de desarrollar SIDA al primer año tras el diagnóstico de la infección fue del $13\pm 4\%$, al segundo año del $27\pm 5\%$ y al tercer año del $33\pm 6\%$, con una mediana de 70 meses (Gráfico 8).

1.3. Comparación entre evolución a caso-SIDA por ambas clasificaciones.-

En el momento del diagnóstico de la infección por VIH, 15 pacientes fueron diagnosticados de SIDA por criterios de 1987, elevándose el número a 24 si se clasificaban por los criterios de 1992. A lo largo del seguimiento 28 han sido clasificados como caso-SIDA por criterios de 1987 y 33 por los de 1992.

Para la comparación se han incluido 25 pacientes que a lo largo de la evolución han desarrollado SIDA por ambas clasificaciones, 29 pacientes que no han desarrollado SIDA por ninguna de ellas, 8 pacientes que sólo han desarrollado SIDA por criterios de 1992, y de éstos en 6 se conocen los tiempos en los que no han desarrollado SIDA por criterios de 1987 y también se incluyen.

La incidencia acumulada de desarrollar SIDA por criterios de 1992 al primer año fue del $22\pm 5\%$, al segundo año del $33\pm 6\%$ y al tercer año del $37\pm 6\%$, con una mediana de 68 meses. La incidencia acumulada de desarrollar SIDA por criterios de 1987, al primer año fue del $14\pm 5\%$, al segundo año del $26\pm 5\%$ y al tercer año del $30\pm 6\%$, con una mediana de 88 meses (p NS) (Gráfico 9).

2. SUPERVIVENCIA.-

2.1. Supervivencia según la clasificación de 1992.-

De los 57 pacientes diagnosticados de SIDA por esta clasificación (24 al diagnóstico de la infección por VIH y 33 en la evolución) se han perdido 12 en el seguimiento (por no acudir a los controles posteriores y se siguieron de 0 a 40 meses, media 15), por lo que se incluyen en el estudio 45, de los que 24 han fallecido y 21 están vivos. Las causas de muerte fueron:

- Neumonía por *Pneumocystis carinii*: 4
- Linfoma no Hodgkin: 3
- Caquexia VIH: 2
- Criptococosis: 2
- Neumonía bacteriana: 2
- Infección por *mycobacterium avium*: 2
- Tuberculosis diseminada: 2
- Sarcoma de Kaposi: 1
- Encefalopatía VIH: 1
- Carcinoma metastásico: 1
- Candidemia: 1
- Cirrosis hepática: 1
- Toxoplasmosis cerebral: 1
- Retinitis por CMV: 1

La probabilidad de supervivencia al cabo de un año fue del $82 \pm 5\%$, al segundo año del $55 \pm 9\%$ y al tercer año del $35 \pm 9\%$, con una mediana de 26 meses (Gráfico 10).

Si comparamos la supervivencia según el motivo diagnóstico, en el caso de que éste

fuera por tener linfocitos T CD4+ menores de 200/mm³, la mediana de supervivencia fue de 35 meses, si el motivo fue por enfermedad indicadora, mediana de 18 meses, y si fue por ambos criterios, mediana de 25 meses (p NS) (Gráfico 11).

2.2. Supervivencia según la clasificación de 1987.-

De los 43 pacientes diagnosticados de SIDA por esta clasificación (15 al diagnóstico de infección por VIH y 28 en la evolución) se han perdido 9 en el seguimiento (por no acudir a controles posteriores y fueron seguidos durante un tiempo de 1 a 35 meses, mediana 15 meses). Quedan 34 pacientes que se pueden analizar, de los que 24 han fallecido y 10 están vivos.

La probabilidad de supervivencia al cabo de un año fue del 68±8%, al segundo año del 45±9% y al tercer año del 23±8% con una mediana de 23 meses (Gráfico 12).

2.3. Comparación entre la supervivencia por ambas clasificaciones.-

Se incluyen 24 pacientes diagnosticados de SIDA por ambas clasificaciones, que han fallecido, y 21 pacientes diagnosticados de SIDA por criterios de 1992 que están vivos, de los que 10 son también caso-SIDA por criterios de 1987.

La probabilidad de supervivencia de estos pacientes según la clasificación de 1992 fue del 83±6% al primer año, del 56±9% al segundo año y del 36±10% al tercer año, con una mediana de 26 meses. Según la de 1987 fue del 69±8% al primer año, del 44±10% al segundo año y del 24±9% al tercer año, con una mediana de 23 meses (p NS) (Gráfico 13).

3. GRÁFICOS.-

Gráfico 1
Evolución a SIDA por criterios de 1992

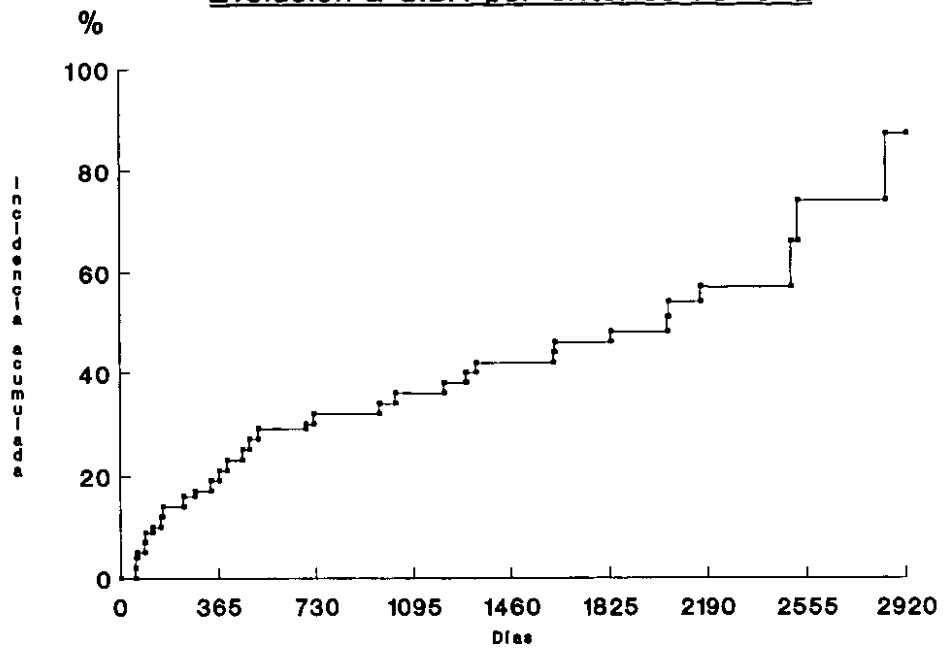
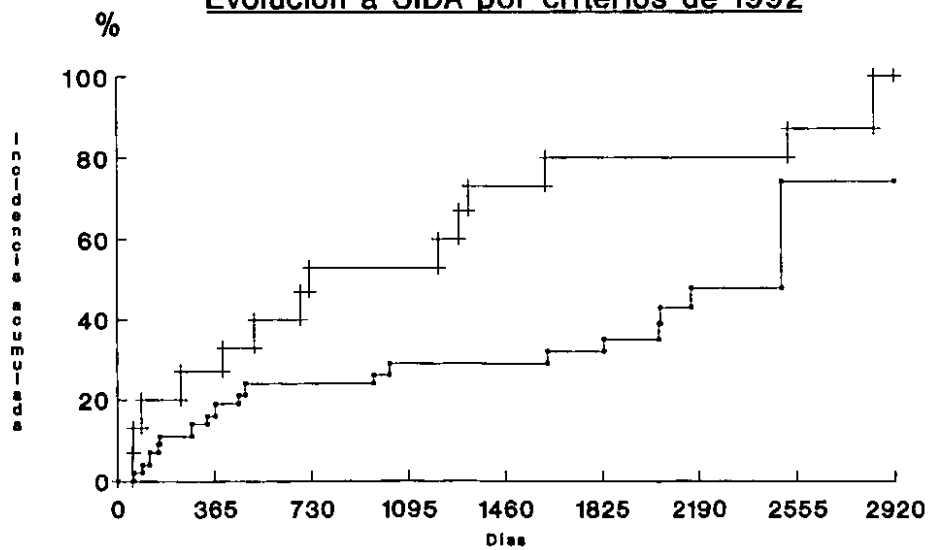


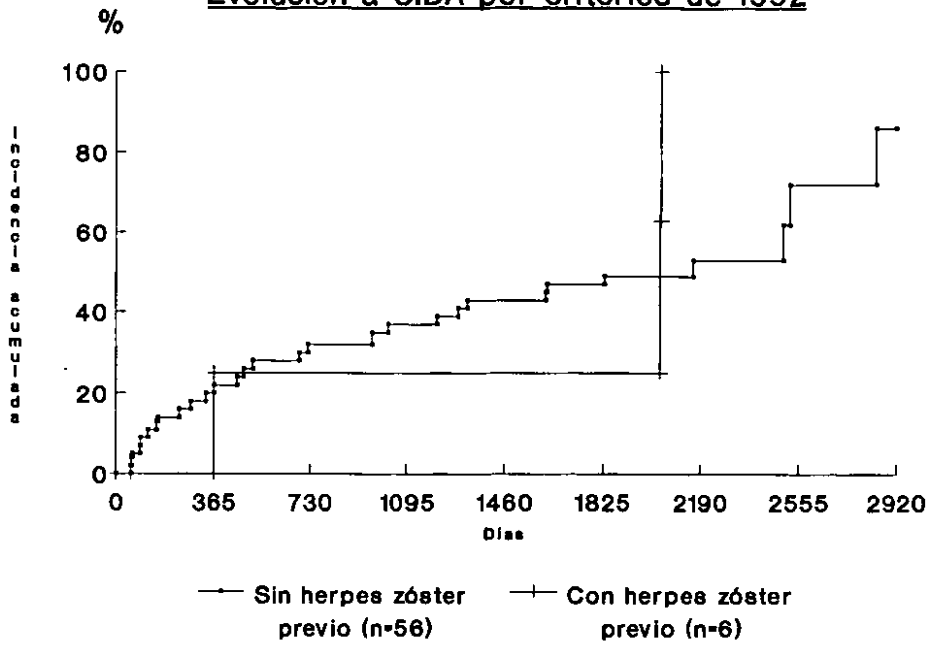
Gráfico 2
Evolución a SIDA por criterios de 1992



— Sin candidiasis previa (n=45) —+ Con candidiasis previa (n=17)

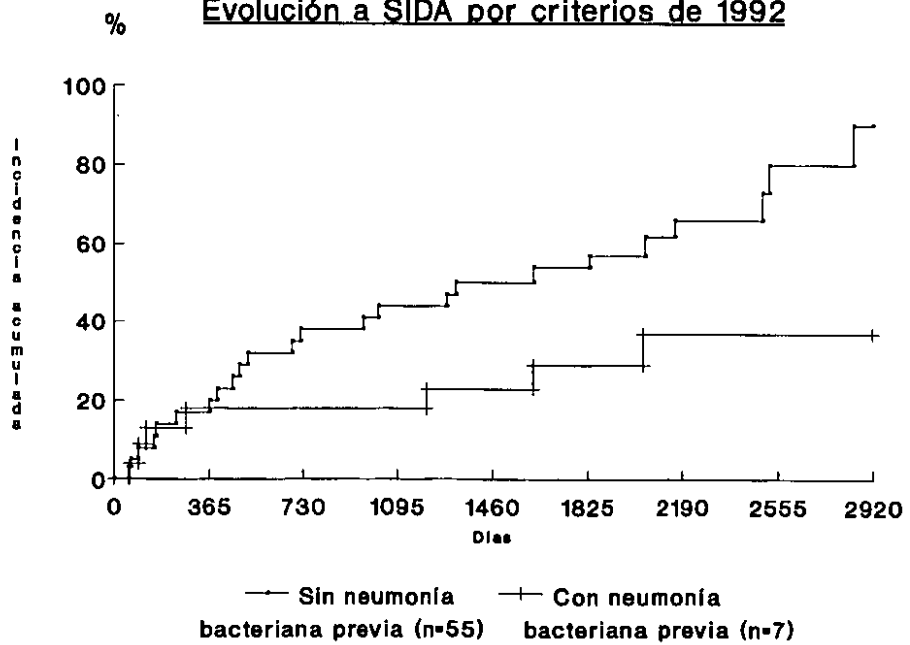
$p < 0.01$

Gráfico 3
Evolución a SIDA por criterios de 1992



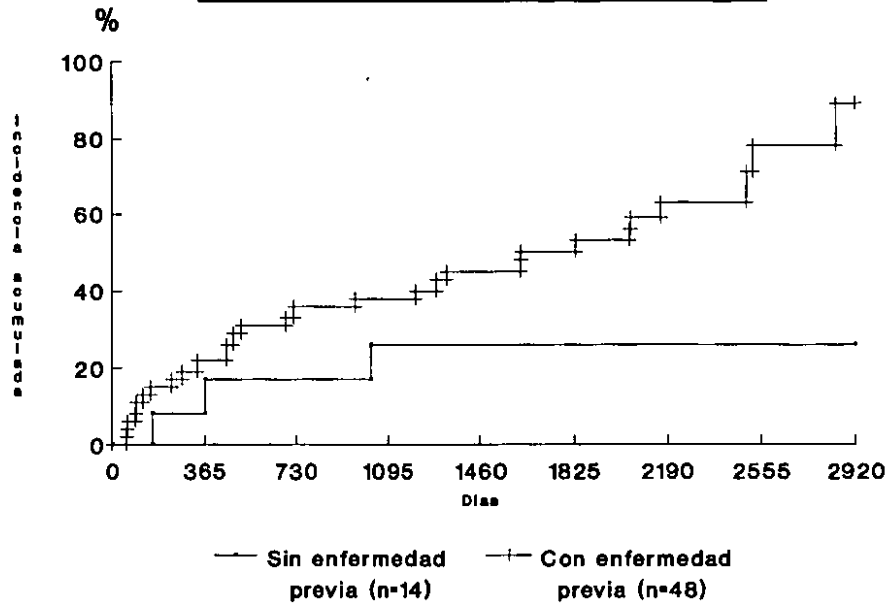
p NS

Gráfico 4
Evolución a SIDA por criterios de 1992



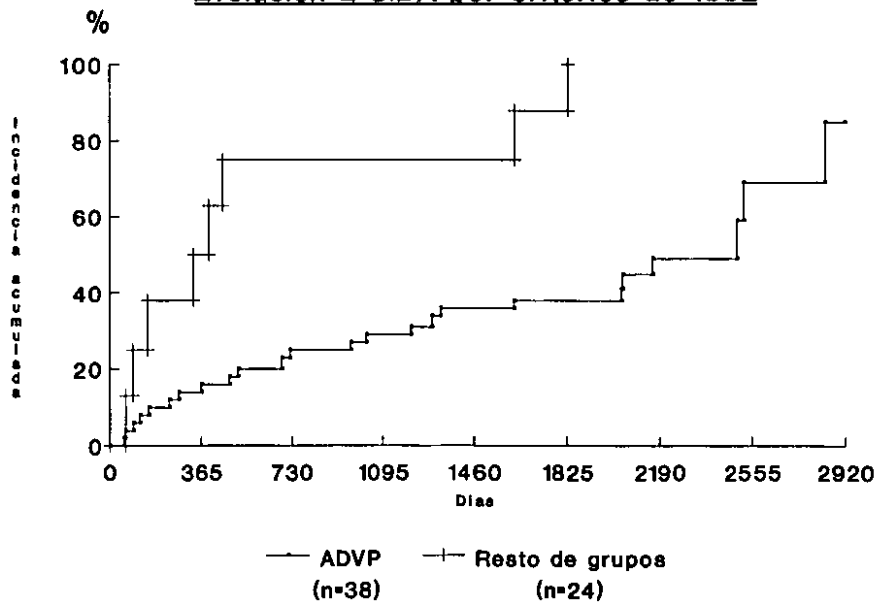
p NS

Gráfico 5
Evolución a SIDA por criterios de 1992



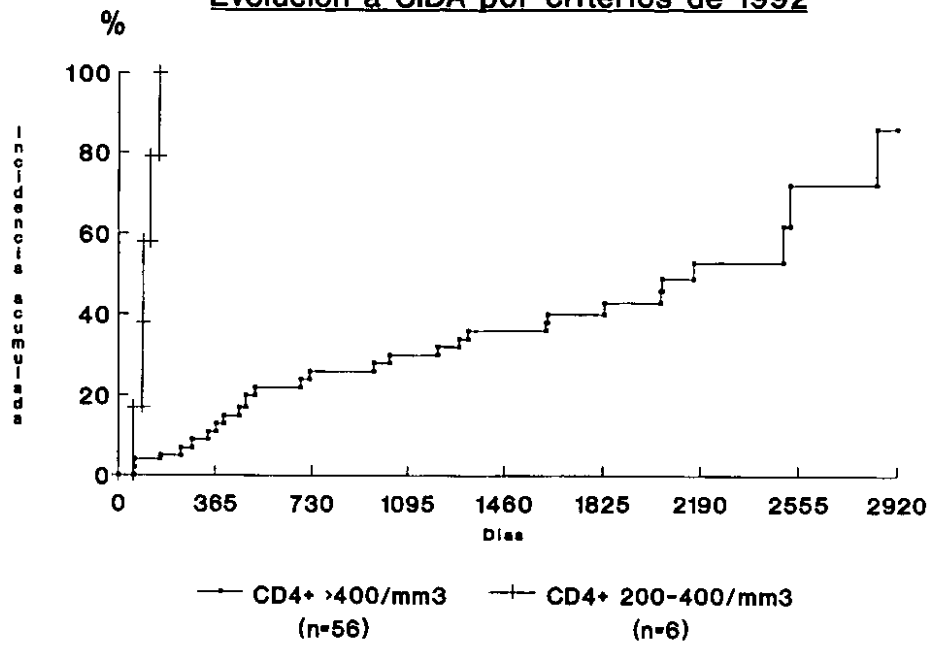
p NS

Gráfico 6
Evolución a SIDA por criterios de 1992



p<0.01

Gráfico 7
Evolución a SIDA por criterios de 1992



$p < 0.01$

Gráfico 8
Evolución a SIDA por criterios de 1987

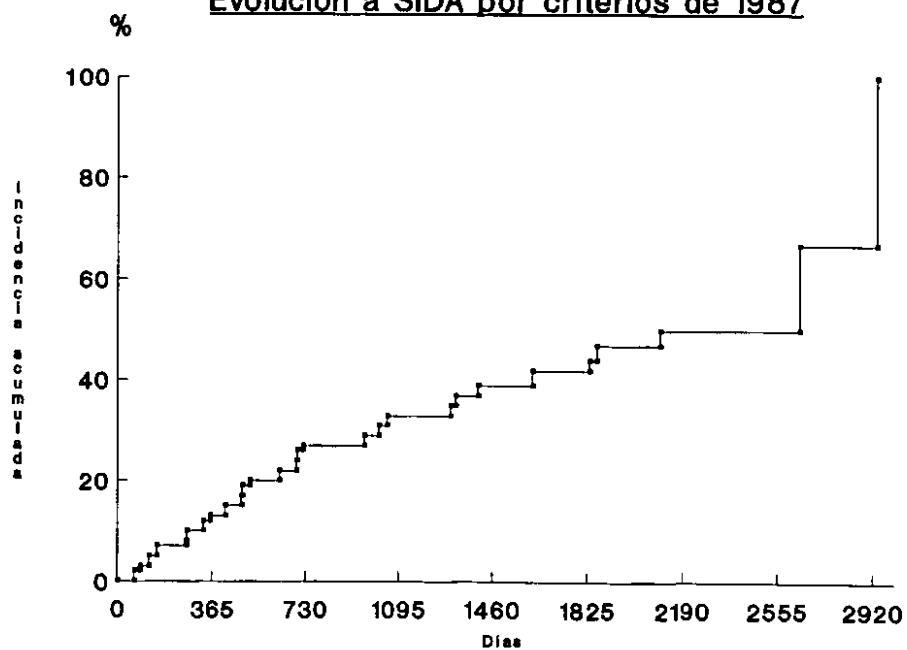
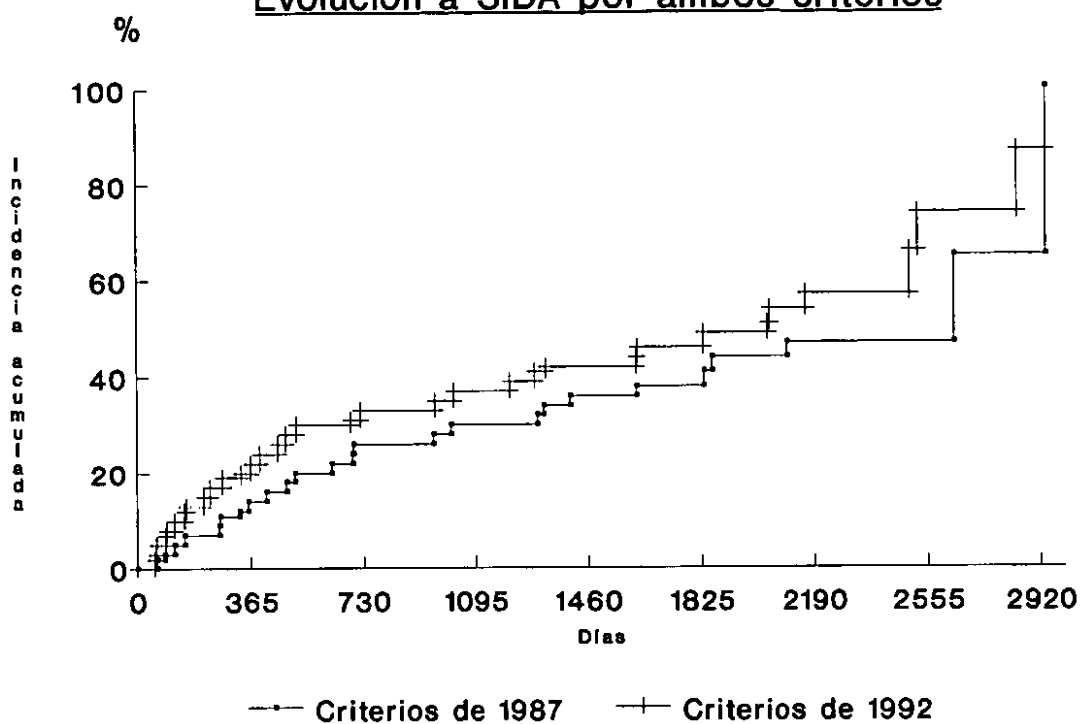


Gráfico 9
Evolución a SIDA por ambos criterios



p NS

Gráfico 10
Supervivencia por criterios de 1992

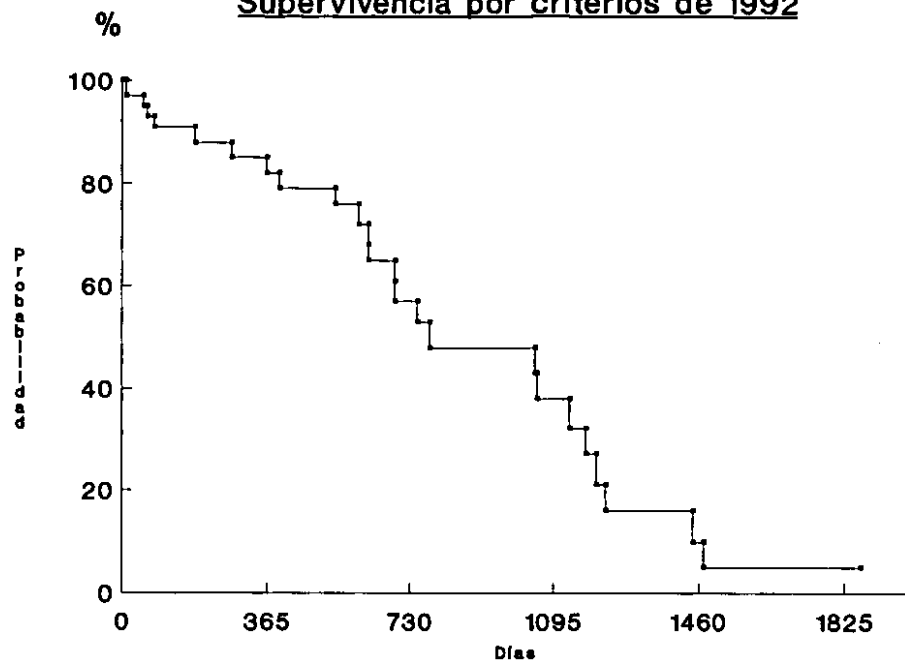
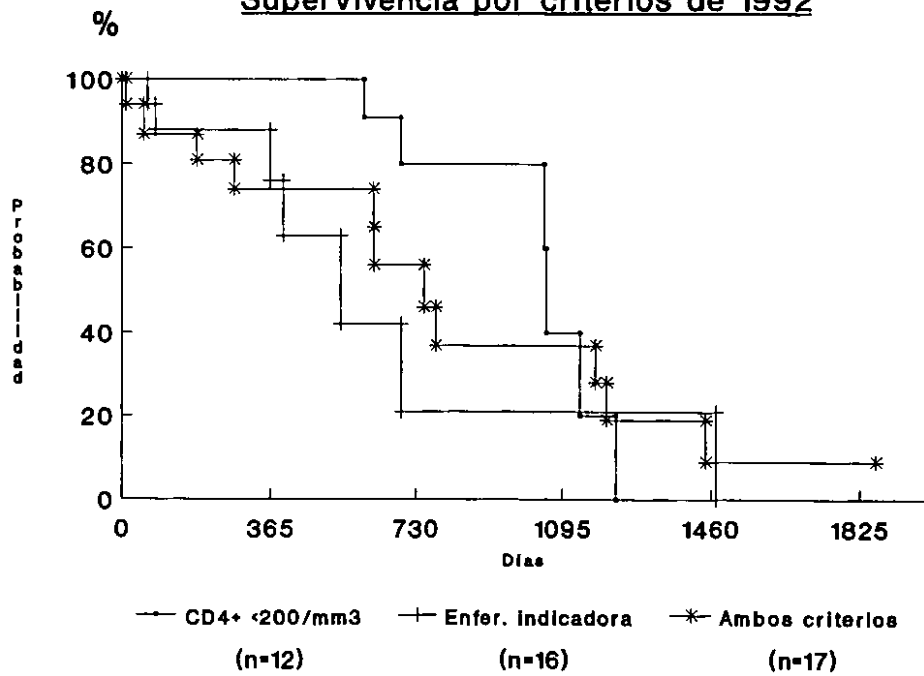


Gráfico 11
Supervivencia por criterios de 1992



p NS

Gráfico 12
Supervivencia por criterios de 1987

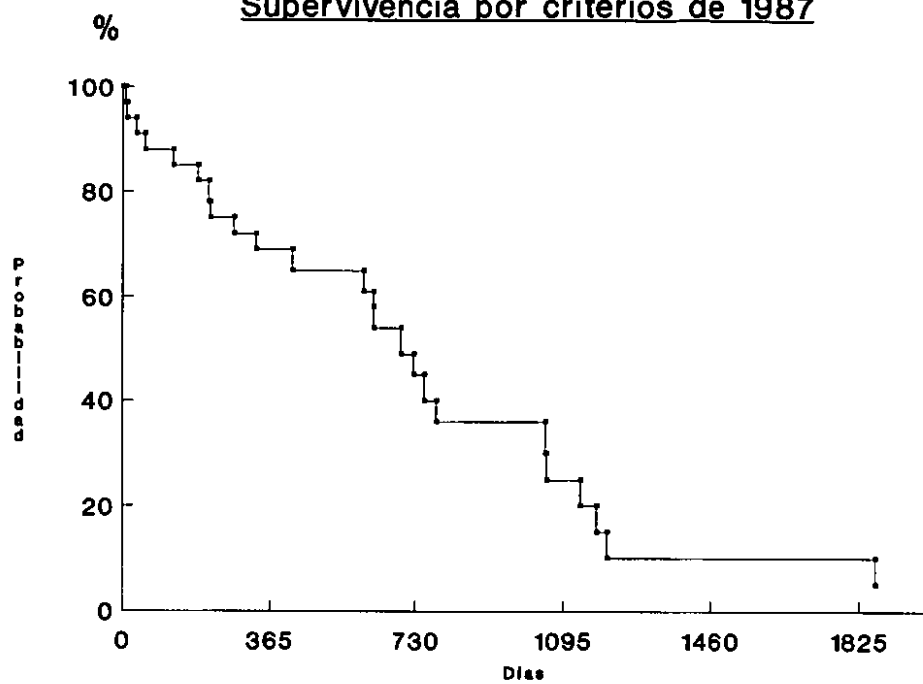
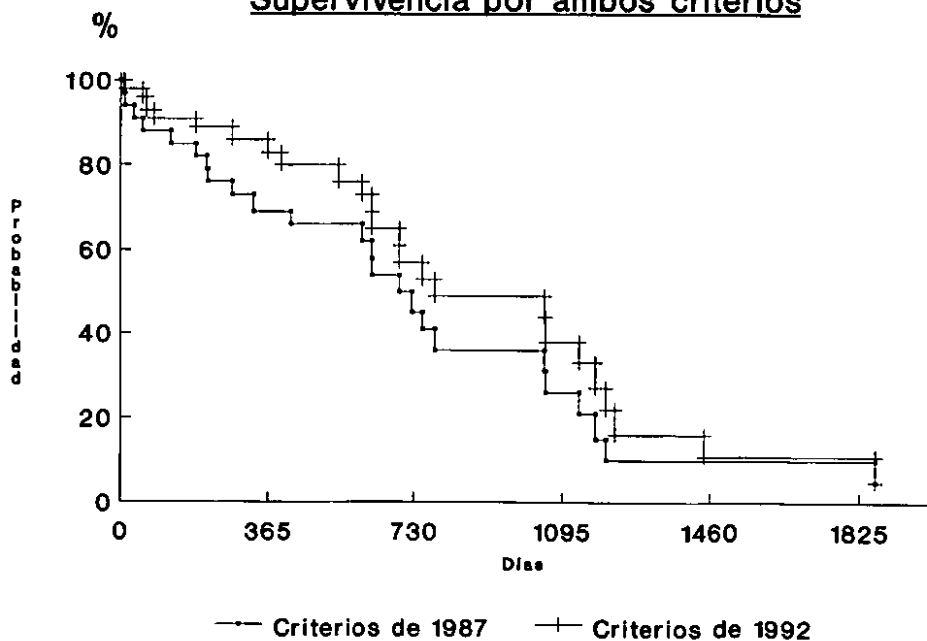


Gráfico 13
Supervivencia por ambos criterios



p NS

4. ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA EN

LOS LINFOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA.-

Se han estudiado las poblaciones linfocitarias en 119 casos, de los que 94 eran pacientes infectados por el VIH y 25 controles sanos. Sus características epidemiológicas se describen en la tabla 9:

TABLA 9

	<u>CONTROLES SANOS</u>	<u>PACIENTES</u>
<u>EDAD MEDIA (RANGO)</u>	31 (24-50)	32 (19-54)
<u>SEXO (PROPORCIÓN)</u>	6 ♂, 19 ♀ (1/3)	68 ♂, 26 ♀ (2,6/1)
<u>GRUPO DE RIESGO</u>		
ADVP		58
HOMOSEX/BISEX		23
HETEROSEXUAL		11
DESCONOCIDO		2

El estadio de infección por VIH según la clasificación de 1987 fue: II ó III en 38, IV no SIDA en 17 y IV con criterios de SIDA en 39. Y según la clasificación de 1992, 51 pacientes estaban diagnosticados de SIDA. La estratificación por grupos en base a la última clasificación fue (tabla 10):

TABLA 10

A1	18	B1	5	C1	1
A2	8	B2	12	C2	7
A3	2	B3	8	C3	33

Las enfermedades que padecían en el momento del estudio los pacientes incluidos en el grupo C fueron:

- Tuberculosis diseminada o pulmonar: 11

- Neumonía por *Pneumocystis carinii*: 9
- Toxoplasmosis cerebral: 3
- Sarcoma de Kaposi: 2
- Candidiasis esofágica: 2
- Criptococosis: 2
- Neumonía por *Pneumocystis carinii* y encefalopatía VIH: 1
- Neumonía por *Pneumocystis carinii* y retinitis por CMV: 1
- Retinitis por CMV: 1
- Encefalopatía VIH: 1
- Linfoma no Hodgkin: 1
- Candidiasis esofágica y cryptosporidiasis: 1

A lo largo del seguimiento (que ha oscilado entre 0 y 98 meses, con mediana 42 meses) han sido diagnosticados de SIDA otros 7 pacientes, según los criterios de la clasificación de 1992. En cuanto a la supervivencia en el periodo de seguimiento, 30 han fallecido, 55 siguen vivos y en 14 se desconoce la evolución. Del total de pacientes, 29 estaban en tratamiento con zidovudina y el resto sin tratamiento anti-retroviral.

El estudio se ha realizado sobre las células obtenidas en la población de alta densidad que se recuperaba tras procesar las muestras en gradiente de Percoll y se ha excluido la población rica en monocitos para el análisis de los resultados, pues esta población nos sirvió para demostrar que en ella no había un número importante de células linfoides. Los antígenos de diferenciación sobre los que se analizan los resultados fueron: CD3, CD4 y CD8 para los linfocitos T, y Kp43, CD16 y CD56 para las células NK.

A continuación se exponen los resultados de los antígenos de diferenciación leucocitaria. Los pacientes se han dividido en tres grupos de acuerdo al número de linfocitos

T CD4+, en base a la definición de caso-SIDA de 1992.

4.1. Antígenos de superficie de linfocitos T.-

En los siguientes párrafos se resumen los resultados expuestos en la tabla 11 (media \pm D. E.) resaltando las diferencias significativas que se apreciaron en los análisis estadísticos de los datos.

CD3: la proporción de células CD3+ de los pacientes del grupo 3 es menor que la de los controles y la del resto de los pacientes ($p < 0.05$). La proporción de los grupos 1 y 2 es similar a la de los controles sanos, con diferencias no significativas. El número absoluto es menor en los pacientes de los grupos 2 y 3 que en los controles sanos.

CD4: como era de esperar, dada la forma de clasificar a los pacientes, la proporción y el número absoluto de linfocitos CD4+ son menores en cualquier grupo de pacientes que en los controles sanos ($p < 0.01$) y entre los pacientes, menor lógicamente en el grupo 3 que en los otros dos.

CD8: la proporción de células que expresan este antígeno es mayor en cualquier grupo de pacientes que en los controles sanos con $p < 0.05$ para el grupo 1 y < 0.01 para los grupos 2 y 3. Sin embargo, el número absoluto es similar para el grupo 1 y 2 pero no para el 3, en el que se observa una importante disminución con diferencias significativas ($p < 0.01$).

Linfocitos totales: su número absoluto es similar para los controles sanos y para los pacientes del grupo 1. En los del grupo 2 y 3 observamos una disminución progresiva significativa ($p < 0.01$).

TABLA 11

	<u>CONTROL SANO</u> (n=25)	<u>GRUPO 1</u> (n=24)	<u>GRUPO 2</u> (n=27)	<u>GRUPO 3</u> (n=43)
<u>CD3 (%)</u>	68±10	64±14 p NS	64±16 p NS	54±19 p<0.05
<u>CD3</u> (N° absoluto)	1472±322	1505±812 p NS	934±358 p<0.01	506±450 p<0.01
<u>CD4 (%)</u>	41±10	32±8 p<0.01	23±9 p<0.01	8±2 p<0.01
<u>CD4</u> (N° absoluto)	865±216	724±210 p<0.01	322±75 p<0.01	71±61 p<0.01
<u>CD8 (%)</u>	29±8	35±10 p<0.05	40±13 p<0.01	44±17 p<0.01
<u>CD8</u> (N° absoluto)	608±162	818±569 p NS	621±357 p NS	386±334 p<0.01
<u>LINFOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	2082±417	2256±790 p NS	1523±560 p<0.01	892±620 p<0.01

En resumen en estos datos se aprecia que el número de linfocitos totales disminuye con la progresión de la enfermedad, a excepción del grupo 1. La proporción de linfocitos CD3+ sólo es menor en el grupo 3, mientras que la de CD4+ va disminuyendo de forma significativa según avanza la enfermedad, lo contrario que sucede con la de CD8+ que va aumentando. En cuanto al número absoluto, los linfocitos CD3+ están disminuídos en los grupos 2 y 3, los CD4+ lo están en todos los grupos y los CD8+ sólo en el grupo 3.

4.2. Antígenos de superficie de células NK.-

Los datos se exponen en la tabla 12 (media \pm D. E.).

CD16: la proporción de los linfocitos que expresan este marcador es menor en los pacientes que en los controles sanos ($p < 0.05$ de forma global), aunque si se analizan los grupos de pacientes por separado, la diferencia sólo alcanza significación estadística en los grupos 1 y 3.

Si el análisis se hace en relación al número absoluto, vemos que éste va disminuyendo en todos los grupos de forma progresiva a medida que avanza la enfermedad con diferencias significativas para todos ellos. En los grupos 2 y 3 es donde el descenso se hace más marcado y donde se alcanza la mayor significación estadística ($p < 0.01$).

CD56: la proporción de células positivas para este antígeno está disminuída en el grupo 1 y en el 2 ($p < 0.05$) pero en el 3 es similar a los controles sanos. Sin embargo, y como ocurría con el CD16, el número absoluto va disminuyendo de forma progresiva, haciéndose la diferencia significativa en los tres grupos ($p < 0.01$).

Kp43: la proporción de linfocitos que expresan este marcador es más baja en los pacientes del grupo 1 que en los controles sanos ($p < 0.01$), en el grupo 3 no hay diferencia significativa y en el grupo 2 la diferencia está en el límite de la significación estadística.

En cuanto al número absoluto, en todos los grupos se observa un importante descenso de estas células de forma progresiva ($p < 0.01$), haciéndose más marcada en el grupo 3.

TABLA 12

	<u>CONTROL SANO</u> (n=25)	<u>GRUPO 1</u> (n=24)	<u>GRUPO 2</u> (n=27)	<u>GRUPO 3</u> (n=43)
<u>CD16 (%)</u>	17±8	12±9 p<0.05	16±14 p NS	13±11 p<0.05
<u>CD16</u> (N° absoluto)	378±182	243±174 p<0.05	244±225 p<0.01	118±45 p<0.01
<u>CD56 (%)</u>	17±10	10±8 p<0.05	10±8 p<0.05	13±9 p NS
<u>CD56</u> (N° absoluto)	362±203	196±150 p<0.01	143±118 p<0.01	116±100 p<0.01
<u>Kp43 (%)</u>	17±7	11±8 p<0.01	14±12 p NS	17±13 p NS
<u>Kp43</u> (N° absoluto)	362±154	244±160 p<0.01	198±187 p<0.01	146±130 p<0.01
<u>LINFOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	2082±417	2256±790 p NS	1523±560 p<0.01	892±620 p<0.01

En resumen, al estudiar las células NK hemos encontrado que la proporción de células CD16+ es menor en los grupos 1 y 3, y no varía en el 2; la de CD56+ disminuye en el 1 y el 2, sin cambios en el 3, y la de Kp43 disminuye sólo en el grupo 1, manteniéndose normales en el resto de pacientes. En cambio, el número absoluto de células NK, al analizarlas por cualquiera de los tres marcadores, es menor en los pacientes que en los controles sanos, con diferencias significativas.

El descenso del número absoluto de las células Kp43+ se correlaciona significativamente con la disminución del número absoluto de los linfocitos CD4+ para todos los pacientes ($r=0.22$, $p<0.05$), es decir, en todos los pacientes en los que disminuyen los linfocitos CD4+ también disminuyen las células Kp43+. Lo mismo se observa cuando se correlacionan el número absoluto de células Kp43+ y el porcentaje de células CD3+ ($r=0.28$, $p<0.01$).

Hemos analizado también el coeficiente de correlación entre los tres marcadores utilizados para estudiar las células NK, usando para el estudio el número absoluto en todos los casos. En algún momento puede tener sentido hacer varios marcadores para estudiar una misma población celular porque pueden aumentar la información que proporcionaría uno solo, debido a que ninguno de ellos es específico de células NK.

- Relación Kp43+ ↔ CD16+. En los controles sanos hay relación significativa ($r=0.45$, $p<0.05$). En los pacientes del grupo 1 no existe correlación significativa ($r=0.29$, p NS). En cambio en el grupo 2 y en el 3 sí se establece correlación significativa ($r=0.48$, $p<0.05$ para el 2 y $r=0.79$, $p<0.01$ para el 3).

- Relación Kp43+ ↔ CD56+. Hay correlación significativa en los controles sanos ($r=0.72$, $p<0.01$) y también en cualquier grupo de pacientes ($r=0.57$, $r=0.69$ y $r=0.73$ respectivamente para el grupo 1, 2 y 3, con $p<0.01$).

- Relación CD16+ ↔ CD56+. Se observa correlación significativa en los controles sanos ($r=0.53$, $p<0.01$), en el grupo 2 ($r=0.60$, $p<0.01$) y en el 3 ($r=0.86$, $p<0.01$). En cambio en el grupo 1 la correlación no fue significativa ($r=0.28$).

4.3. Relación entre el número de células Kp43+ y las enfermedades que aparecen en el SIDA.-

En este apartado hemos intentado establecer relación entre la cifra absoluta de células Kp43+ y la aparición de enfermedades en la infección por VIH, sean o no indicadoras de SIDA. Las enfermedades que hemos relacionado han sido: neumonía por *Pneumocystis carinii*, toxoplasmosis cerebral o extra-cerebral, candidiasis oral o esofágica, tuberculosis pulmonar, diseminada o ganglionar, neumonía bacteriana, infección por virus herpes simple o zóster, infección por citomegalovirus y sarcoma de Kaposi.

1.- Neumonía por *Pneumocystis carinii*. Los pacientes que han padecido a lo largo de su evolución algún episodio de neumonía producido por este germen (n=17) presentan una importante disminución del número absoluto de células Kp43+, respecto de los pacientes que nunca la han presentado (n=77), aunque la diferencia no alcanza significación estadística. Esto mismo puede decirse de las células CD56+, pero en cuanto al número de CD16+ la diferencia sí es significativa con disminución en los pacientes que han padecido este tipo de neumonía.

El número de linfocitos totales es también menor en los pacientes con algún episodio de NPC ($p < 0.01$) y lo mismo ocurre con el número absoluto de linfocitos CD4+ ($p < 0.01$) y el número de células CD3+ y el de CD8+ ($p < 0.01$) (en la tabla 13 se expresan los datos en media \pm D.E.).

TABLA 13

(N° absoluto)	<u>NPC +</u> (n=17)	<u>NPC -</u> (n=77)	
<u>Kp43</u>	113±88	202±185	p NS
<u>CD16</u>	89±68	208±180	p < 0.01
<u>CD56</u>	75±51	139±125	p NS
<u>CD3</u>	434±318	991±700	p < 0.01
<u>CD4</u>	56±30	372±294	p < 0.01
<u>CD8</u>	364±202	608±448	p < 0.01
<u>LINFOCITOS</u>			
<u>TOTALES</u>	770±471	1575±868	p < 0.01

(NPC = neumonía por *Pneumocystis carinii*)
(+ = padecida, - = no padecida)

Si la relación se establece entre los pacientes que han presentado NPC (n=17) y los pacientes del grupo C que no la han presentado (n=24), vemos que no hay diferencias significativas en las células Kp43+, CD16+ y CD56+, ni tampoco en los linfocitos totales, CD3+ y CD8+. En cambio, la cifra de linfocitos CD4+ es menor en los casos que han padecido NPC, con diferencias significativas (tabla 14).

TABLA 14

(Nº absoluto)	<u>NPC +</u> (n=17)	<u>NPC -</u> (n=24)	
<u>Kp43</u>	113±88	136±100	p NS
<u>CD16</u>	89±68	135±101	p NS
<u>CD56</u>	75±51	103±80	p NS
<u>CD3</u>	434±318	677±561	p NS
<u>CD4</u>	56±30	181±100	p < 0.01
<u>CD8</u>	364±202	488±300	p NS
<u>LINEOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	770±471	1086±785	p NS

(NPC =neumonía por *Pneumocystis carinii*)
(+ =padecida, -=no padecida)

2. Toxoplasmosis. Los pacientes que han presentado algún episodio de toxoplasmosis (cerebral o extracerebral) a lo largo de su evolución (n=12) tienen también un menor número absoluto de linfocitos Kp43+ comparado con los que nunca lo han presentado (n=82) y la diferencia alcanza significación estadística ($p < 0.05$), sucediendo lo mismo con los linfocitos CD16+. En el número de células CD56+ no hay diferencias significativas.

Con respecto al número absoluto de linfocitos CD4+, linfocitos totales, CD3+ y CD8+, todos ellos disminuyen en los pacientes con toxoplasmosis con diferencias significativas (tabla 15, datos expresados en media \pm desviación estandar):

TABLA 15

(Nº absoluto)	<u>TOXOPLASMA +</u> (n=12)	<u>TOXOPLASMA -</u> (n=82)	
<u>Kp43</u>	85 \pm 80	201 \pm 180	p < 0.05
<u>CD16</u>	111 \pm 91	197 \pm 160	p < 0.05
<u>CD56</u>	88 \pm 60	133 \pm 110	p NS
<u>CD3</u>	544 \pm 500	941 \pm 689	p < 0.05
<u>CD4</u>	101 \pm 67	346 \pm 301	p < 0.01
<u>CD8</u>	351 \pm 229	595 \pm 440	p < 0.05
<u>LINFOCITOS TOTALES</u>	968 \pm 774	1497 \pm 854	p < 0.05

(+ = padecido, - = no padecido)

Si incluimos dentro de los dos grupos sólo a los pacientes diagnosticados de SIDA (grupo C), quedan 10 pacientes que han padecido toxoplasmosis cerebral y 31 que no. El número absoluto de células Kp43+ es así menor también en los pacientes que han presentado alguna vez toxoplasmosis cerebral, aunque no se alcanza significación estadística. El número de células CD16+ es también menor, sin diferencias significativas, y en el de CD56+ no hay diferencias. Sin embargo, en este caso tanto el número de linfocitos totales, como el de células CD4+, CD8+ y el de CD3+ no es significativamente distinto (tabla 16).

TABLA 16

	<u>TOXOPLASMA +</u> (n=10)	<u>TOXOPLASMA -</u> (n=31)	
(N° absoluto)			
<u>Kp43</u>	72 ± 60	144 ± 128	p NS
<u>CD16</u>	68 ± 52	131 ± 110	p NS
<u>CD56</u>	75 ± 64	88 ± 79	p NS
<u>CD3</u>	556 ± 500	583 ± 454	p NS
<u>CD4</u>	80 ± 68	145 ± 120	p NS
<u>CD8</u>	357 ± 300	431 ± 364	p NS
<u>LINFOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	969 ± 700	950 ± 629	p NS
(+ = padecido, - = no padecido)			

3. Herpes. Los pacientes que han tenido algún episodio de herpes simple o zóster en cualquier momento de su evolución (n=14) presentan un número absoluto de células Kp43+ similar a los que no lo han tenido (n=80), al igual que el número de CD16+ y CD56+. En el número de linfocitos T CD4+ tampoco hay diferencias, como ocurre con los linfocitos totales, los CD3+ y los CD8+ (tabla 17).

TABLA 17

(Nº absoluto)	<u>HERPES +</u> (N=14)	<u>HERPES -</u> (N=80)	
<u>Kp43</u>	200±174	184±176	p NS
<u>CD16</u>	206±129	183±179	p NS
<u>CD56</u>	159±130	122±102	p NS
<u>CD3</u>	743±524	916±708	p NS
<u>CD4</u>	258±168	325±310	p NS
<u>CD8</u>	494±345	576±448	p NS
<u>LINFOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	1327±764	1447±878	p NS

(+ = padecido, - = no padecido)

Si sólo comparamos los pacientes incluidos en los grupos B y C se observa que los que han padecido herpes (n=14) presentan un número de células Kp43+, de CD16+, de CD56+, de linfocitos T CD4+ y de linfocitos totales mayor que los que no lo han tenido (n=52) pero las diferencias siguen siendo no significativas. El número de CD3+ y de CD8+ es similar (tabla 18).

TABLA 18

(Nº absoluto)	<u>HERPES +</u> (n=14)	<u>HERPES -</u> (n=52)	
<u>Kp43</u>	200±174	170±160	p NS
<u>CD16</u>	218±134	144±91	p NS
<u>CD56</u>	161±71	106±53	p NS
<u>CD3</u>	743±524	774±700	p NS
<u>CD4</u>	258±168	184±121	p NS
<u>CD8</u>	465±341	548±506	p NS
<u>LINFOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	1327±764	1199±937	p NS

(+ = padecido, - = no padecido)

4. Neumonía bacteriana. Los pacientes con algún episodio de neumonía (n=20) tienen cifra de células Kp43+ y de CD16+ similar a los que no la han padecido (n=74). La de CD56+ es menor, sin diferencias significativas. La de linfocitos T CD4+ es discretamente menor en los que la han padecido (diferencia no significativa) y las de linfocitos totales, CD3+ y CD8+ también son similares (tabla 19).

TABLA 19

(Nº absoluto)	<u>NEUMONIA +</u> (n=20)	<u>NEUMONIA -</u> (n=74)	
<u>Kp43</u>	189±150	186±160	p NS
<u>CD16</u>	183±125	187±176	p NS
<u>CD56</u>	95±80	136±105	p NS
<u>CD3</u>	893±800	889±538	p NS
<u>CD4</u>	223±210	340±300	p NS
<u>CD8</u>	596±313	555±327	p NS
<u>LINFOCITOS TOTALES</u>	1279±1199	1470±747	p NS

(+ = padecida, - = no padecida)

Si la comparación se hace sobre los pacientes de los grupos B y C también se observa similitud en el número de células Kp43+, discreto aumento de linfocitos T CD4+ y CD3+ y similar la cifra de linfocitos, siempre con diferencias no significativas. Sin embargo, las células CD56+ son menores con diferencias significativas (tabla 20).

TABLA 20

(Nº absoluto)	<u>NEUMONIA +</u> (n=20)	<u>NEUMONIA -</u> (n=46)	
<u>Kp43</u>	195±126	169±150	p NS
<u>CD16</u>	173±131	169±93	p NS
<u>CD56</u>	92±82	138±107	p < 0.05
<u>CD3</u>	893±800	682±509	p NS
<u>CD4</u>	234±200	181±170	p NS
<u>CD8</u>	368±341	495±363	p NS
<u>LINFOCITOS TOTALES</u>	1350±1242	1152±725	p NS

(+ = padecida, - = no padecida)

5. Sarcoma de Kaposi. Los pacientes con este tumor (n=6) tienen un número de células Kp43+ y de CD8+ similar a los que no lo han tenido (n=88), así como el de linfocitos totales. La cifra de linfocitos CD4+, CD3+, CD16+ y CD56+ es algo menor, pero la diferencia no es significativa (tabla 21).

TABLA 21

	<u>S. KAPOSI +</u> (n=6)	<u>S. KAPOSI -</u> (n=88)	
(Nº absoluto)			
<u>Kp43</u>	177±150	187±174	p NS
<u>CD16</u>	102±86	192±180	p NS
<u>CD56</u>	89±51	130±106	p NS
<u>CD3</u>	700±600	903±683	p NS
<u>CD4</u>	136±120	327±298	p NS
<u>CD8</u>	547±490	565±425	p NS
<u>LINFOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	1207±979	1444±854	p NS

(+ = padecido, - = no padecido)

Comparando sólo a los pacientes del grupo C, los que tienen sarcoma de Kaposi (n=6) presentan un discreto aumento de células Kp43+ frente a los que no lo han tenido (n=35), pero sin diferencias significativas. En el resto de los parámetros no hay diferencias (tabla 22).

TABLA 22

(N° absoluto)	<u>S. KAPOSI+</u> (n=6)	<u>S. KAPOSI-</u> (n=35)	
<u>Kp43</u>	177±150	118±101	p NS
<u>CD16</u>	102±86	118±89	p NS
<u>CD56</u>	89±51	92±81	p NS
<u>CD3</u>	700±600	555±441	p NS
<u>CD4</u>	136±120	128±110	p NS
<u>CD8</u>	547±490	418±314	p NS
<u>LINEOCITOS TOTALES</u>	1207±979	1207±979	p NS

(+ = padecido, - = no padecido)

6. Candidiasis. En los que la han padecido, todas las células son menores que en el otro grupo, pero sólo hay diferencias significativas para los linfocitos CD16+, CD4+, CD8+, CD3+ y los linfocitos totales (tabla 23).

TABLA 23

	<u>CANDIDIASIS +</u> (n=35)	<u>CANDIDIASIS -</u> (n=59)	
(Nº absoluto)			
<u>Kp43</u>	140±119	214±197	p NS
<u>CD16</u>	123±105	224±190	p<0.01
<u>CD56</u>	94±80	147±130	p NS
<u>CD3</u>	534±360	1102±744	p<0.01
<u>CD4</u>	147±120	414±307	p<0.01
<u>CD8</u>	411±302	655±475	p<0.01
<u>LINFOCITOS</u>			
<u>TOTALES</u>	898±512	1745±871	p<0.01
(+=padecida, -=no padecida)			

Al comparar estos datos en los pacientes de los grupos B y C vemos que se comportan de la misma manera que en el grupo anterior (tabla 24).

TABLA 24

(N° absoluto)	<u>CANDIDIASIS +</u> (n=35)	<u>CANDIDIASIS -</u> (n=31)	
<u>Kp43</u>	140±119	219±200	p NS
<u>CD16</u>	123±103	225±200	p<0.01
<u>CD56</u>	94±88	161±102	p NS
<u>CD3</u>	534±360	1015±950	p<0.05
<u>CD4</u>	147±120	252±224	p<0.05
<u>CD8</u>	411±302	678±600	p<0.05
<u>LINEOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	898±512	1568±1094	p<0.01

(+ = padecida, - = no padecida)

7. Tuberculosis. Los datos en este caso muestran disminución de todos los parámetros para los pacientes con tuberculosis, con diferencias significativas sólo en las células CD3+, CD4+ y el número de linfocitos totales (tabla 25).

TABLA 25

	<u>TUBERCULOSIS +</u> (n=22)	<u>TUBERCULOSIS -</u> (n=72)	
(N° absoluto)			
<u>Kp43</u>	130±106	203±188	p NS
<u>CD16</u>	135±108	204±190	p NS
<u>CD56</u>	107±90	134±88	p NS
<u>CD3</u>	572±435	988±719	p < 0.01
<u>CD4</u>	153±128	365±305	p < 0.01
<u>CD8</u>	435±335	600±456	p NS
<u>LINFOCITOS</u>			
<u>TOTALES</u>	919±660	1585±856	p < 0.01
(+ = padecida, - = no padecida)			

En cambio, si consideramos sólo los pacientes del grupo C en ningún caso se obtienen diferencias con significación estadística (tabla 26).

TABLA 26

	<u>TUBERCULOSIS +</u> (n=22)	<u>TUBERCULOSIS -</u> (n=19)	
(Nº absoluto)			
<u>Kp43</u>	130±106	124±110	p NS
<u>CD16</u>	135±108	98±82	p NS
<u>CD56</u>	107±90	77±61	p NS
<u>CD3</u>	572±435	611±568	p NS
<u>CD4</u>	153±128	114±96	p NS
<u>CD8</u>	435±335	438±392	p NS
<u>LINFOCITOS</u> <u>TOTALES</u>	919±660	1044±733	p NS
(+=padecida, -=no padecida)			

8. Retinitis por citomegalovirus. El número de pacientes que la han padecido ha sido sólo de 3, por lo que no se pudo realizar un estudio estadístico fiable.

5. ESTUDIO FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T Y DE LAS CÉLULAS NK PARA PRODUCCIÓN DE TNF-ALFA EN LA INFECCIÓN POR VIH.-

Según se explica en el apartado de material y métodos se ha realizado un estudio funcional de los linfocitos T y de las células NK, con estímulos inespecíficos (CD2) y con estímulos específicos (anticuerpo CD3 para los linfocitos T y anticuerpo CD16 para las células NK). Además se ha añadido un estímulo adicional a todos los mencionados (IL-2), comparando los resultados con el estímulo específico o inespecífico sin adición de IL-2. La finalidad del ensayo fue la determinación de TNF-alfa por un método de ELISA y como también se menciona se decidió utilizar el cociente entre el valor del TNF-alfa obtenido con el estímulo específico y el obtenido con el inespecífico (o de éste más IL-2) para llevar a cabo la comparación de los resultados.

El estudio se ha realizado sobre 49 casos, de los que 33 eran pacientes infectados por el VIH y se comparó con 16 sujetos sanos que constituyen el grupo control. Todos ellos formaban parte del grupo de pacientes y controles sanos en los que también se estudiaron las poblaciones linfocitarias.

Las características epidemiológicas de los 49 casos se exponen en la tabla 27:

TABLA 27

	<u>CONTROLES SANOS</u> (n=16)	<u>PACIENTES</u> (n=33)
<u>EDAD MEDIA (RANGO)</u>	32 (27-50)	33 (22-51)
<u>SEXO (PROPORCIÓN)</u>	4♂, 12♀ (1/3)	26♂, 7♀ (3,7/1)
<u>GRUPO DE RIESGO</u>		
ADVP		19
HOMOSEX/BISEX		9
HETEROSEXUAL		3
DESCONOCIDO		2

El estadio de infección por VIH según la clasificación de los CDC de 1987 fue: II ó III en 17, IV no SIDA en 7 y IV SIDA en 9. Y según la clasificación de los CDC de 1992, 16 pacientes fueron diagnosticados de SIDA. La estratificación por grupos según esta última clasificación se expone en la tabla 28:

TABLA 28

A1	10	B1	1	C1	0
A2	2	B2	4	C2	1
A3	1	B3	4	C3	10

Como en el apartado de resultados de los antígenos de diferenciación leucocitaria se decidió analizar los datos del ensayo funcional estratificando a los pacientes con la clasificación de los CDC de 1992, en grupos según la cifra de linfocitos T CD4+ (grupos 1, 2 y 3).

Los resultados obtenidos en el ensayo funcional se exponen en la tabla 29 y fueron:

1º.- Cociente CD2+IL-2/CD2: es el valor de TNF-alfa que se obtiene con el estímulo inespecífico más IL-2 dividido por el estímulo inespecífico. Los resultados muestran que el cociente disminuye a medida que progresa la enfermedad. Sin embargo, las diferencias no alcanzan significación estadística al compararlo con los controles sanos.

2º.- Cociente CD3/CD2: valor de TNF-alfa que se obtiene con el estímulo específico para linfocitos T dividido por el obtenido con el estímulo inespecífico. Los resultados muestran que el cociente es mayor en los controles sanos que en los pacientes considerados de forma global ($p < 0.05$). Si se analizan los tres grupos de pacientes por separado, se observa que el cociente disminuye en el grupo 1 y 2, sin diferencias significativas y disminuye aún más en el grupo 3, donde se obtiene significación estadística ($p < 0.01$).

La proporción de células en la muestra estudiada para el ensayo funcional que expresan en su superficie el antígeno de diferenciación CD3 es similar para el grupo de controles sanos (69 ± 10) que para cualquier grupo de pacientes (72 ± 12 para el grupo 1, 68 ± 14 para el grupo 2 y 63 ± 16 para el grupo 3) con diferencias no significativas. Por este motivo, las diferencias observadas en el cociente CD3/CD2 no son atribuibles a un mayor o menor número de células estimuladas.

3º.- Cociente CD16/CD2: valor de TNF-alfa obtenido tras el estímulo específico de células NK dividido por el obtenido con el estímulo inespecífico. El cociente para todos los grupos de pacientes es similar al de los controles sanos con diferencias no significativas.

El porcentaje de células que expresan el antígeno CD16 en las muestras utilizadas para el ensayo es similar para los controles sanos (18 ± 8) y para cualquier grupo de pacientes (14 ± 9 para el grupo 1, 27 ± 20 para el 2 y 15 ± 12 para el 3) aunque se observa cierta tendencia a que disminuya en el grupo 1 y 3, estando la diferencia en el límite de la significación estadística ($p=0.056$)

4°.- Cociente $CD3+IL-2/CD2+IL-2$: valor de TNF-alfa obtenido con el estímulo específico de células T más IL-2 dividido por el obtenido con el estímulo inespecífico más IL-2 . Se observa que el cociente es menor en cualquier grupo de pacientes que en los controles sanos. Analizando los grupos de pacientes por separado, en el 1 y 2 la diferencia es significativa con $p < 0.05$, mientras que en el 3 también lo es pero la significación es mayor ($p < 0.01$). Como decíamos al comentar el segundo cociente, estas diferencias no pueden ser atribuibles a que exista un menor porcentaje de células CD3+ en alguno de los grupos.

5°.- Cociente $CD16+IL-2/CD2+IL-2$: valor de TNF-alfa obtenido con el estímulo específico de células NK más IL-2, dividido por el que se obtiene con el estímulo inespecífico más IL-2. Este cociente es mayor en los controles sanos que en cualquier grupo de pacientes y se observa una disminución progresiva del mismo según se avanza en la enfermedad, con diferencias significativas para los tres grupos ($p < 0.05$ para el 1 y el 2, y $p < 0.01$ para el 3).

TABLA 29

	<u>CONTROL SANO</u> (n=16)	<u>GRUPO 1</u> (n=11)	<u>GRUPO 2</u> (n=7)	<u>GRUPO 3</u> (n=15)
<u>INDICE DE ESTIMULACIÓN</u>				
<u>CD2+IL-2/</u> <u>CD2</u>	7.4±5.5	4±3 p NS	6±5 p NS	2.6±2 p NS
<u>CD3/CD2</u>	4.9±3.7	3±2.9 p NS	3.8±3.6 p NS	1.6±0.7 p<0.01
<u>CD16/CD2</u>	1.8±0.9	1.6±0.6 p NS	4.5±4 p NS	2±0.7 p NS
<u>CD3+IL-2/</u> <u>CD2+IL-2</u>	3.2±1.9	1.7±1.3 p<0.05	1.3±0.4 p<0.05	1.4±0.9 p<0.01
<u>CD16+IL-2/</u> <u>CD2+IL-2</u>	2.8±1.2	1.8±1.4 p<0.05	1.7±0.8 p<0.05	1.3±0.5 p<0.01

DISCUSIÓN

1. EVOLUCIÓN Y SUPERVIVENCIA EN LA INFECCIÓN POR VIH.-

Desde las primeras descripciones del SIDA se han propuesto diversas clasificaciones y definiciones de la enfermedad, con la idea por lo general de atender a una vigilancia epidemiológica que hiciese conocer al personal y a las autoridades sanitarias el número de pacientes afectados y el impacto social de la enfermedad.

La revisión de definición de caso-SIDA efectuada en 1987 (7) ha sido la que se ha seguido de forma universal en estos últimos años. El mejor conocimiento de la enfermedad en cuanto a evolución, pronóstico y tratamiento ha motivado que en el año 1992 (10) se realizara una nueva clasificación que no hará más que ampliar el número de casos de SIDA una vez que se aplique en la práctica clínica, al incluir otras enfermedades como indicadoras de SIDA y al considerar también como diagnóstico a una situación inmunológica: el descenso de los linfocitos T CD4+ por debajo de $200/\text{mm}^3$. Dado que considera como nuevas enfermedades indicadoras a la tuberculosis pulmonar y a la neumonía recidivante podría parecer en una primera impresión que el número de casos diagnosticados aumentará de forma considerable, al ser esas enfermedades tan frecuentes en nuestro medio.

Tras el análisis de nuestros resultados, observamos que con la nueva clasificación la incidencia acumulada de desarrollar SIDA al primer año tras el diagnóstico de la infección fue del $21 \pm 5\%$, al segundo año del $33 \pm 6\%$ y al tercer año del $37 \pm 6\%$, con una mediana de 67 meses. Si el análisis se hace en base a la definición-clasificación de 1987, la incidencia acumulada de desarrollar SIDA al primer año de seguimiento tras el diagnóstico fue del $13 \pm 4\%$, al segundo año del $27 \pm 5\%$ y al tercer año del $33 \pm 6\%$, con una mediana de 70 meses. Si se comparan ambos resultados con la metodología indicada, los datos de incidencia son similares, siendo las diferencias no significativas. En la literatura revisada no hemos encontrado datos como los mencionados, aunque sí se comenta que muchas personas

infectadas por el virus pero asintomáticas podrían verse etiquetadas de SIDA antes que en la actualidad (11).

Podemos concluir también con nuestros resultados que serían factores de riesgo para desarrollar SIDA: haber padecido candidiasis oral en algún momento de la evolución, pertenecer a un grupo de riesgo distinto de los ADVP y tener al diagnóstico de la infección por VIH una cifra de linfocitos T CD4+ entre 200 y 400/mm³. El motivo por el que los ADVP evolucionarían menos rápidamente a SIDA podría encontrarse, como ya ha sido descrito (15), en la edad más joven en el momento de comenzar el seguimiento, en los cuidados médicos que comienzan en estadios precoces de la infección y en el reconocimiento más temprano de las complicaciones que pueden aparecer previas al SIDA.

El número de pacientes diagnosticados de SIDA en el momento de conocerse que estaban infectados por el virus fue de 15 sobre un total de 94 según la clasificación de 1987, y de 24 según la de 1992, lo que supone un incremento del 60%. Este incremento es algo más alto que los aparecidos en algunas series de la literatura que señalan un aumento del 42% (16) y del 49% (17), pero están lejos de los que refieren que el número de casos de SIDA podría doblarse (15) e incluso triplicarse (13). No obstante, un aumento del 60% sobre el número de casos de SIDA que hasta ahora conocíamos supone una proporción considerable que podría requerir un aumento de los medios disponibles para atender de forma adecuada a estos pacientes.

En cuanto a la supervivencia, la probabilidad de sobrevivir en base a la definición de 1992 al primer año de seguimiento fue del 82±5%, al segundo año del 55±9% y al tercer año del 35±9%, con una mediana de 26 meses. Según la clasificación de 1987, la probabilidad de sobrevivir al cabo de un año fue del 68±8%, al segundo año del 45±9% y al tercer año del 23±8%, con una mediana de 23 meses. Si hacemos el análisis en

términos comparativos, las probabilidades son similares, con diferencias no significativas.

Comparando nuestros datos con los de la literatura, se observa bastante similitud, aunque los datos revisados (15) indican que la probabilidad de sobrevivir al primer año tras el diagnóstico de caso-SIDA en base a una sola determinación de linfocitos T CD4+ menores de 200 fue del 94%, con mediana de 50 meses, sensiblemente más altos que los obtenidos por nosotros, pero hay que tener en cuenta que hemos incluido en el análisis a todos los enfermos, diagnosticados por cualquier motivo. Si sólo los incluimos según el criterio de la cifra de linfocitos, nuestra mediana es de 35 meses y la probabilidad de supervivencia al primer año es del 100%.

En definitiva, la nueva clasificación supone un incremento en el número de casos etiquetados de SIDA del 60%. Su aplicación a la práctica clínica va a poner aún más de manifiesto la magnitud de la pandemia de SIDA que podría reflejarse en la necesidad de una mayor disponibilidad de medios para combatir la enfermedad.

Aplicada la definición en los términos mencionados no va a suponer un mejor pronóstico para los pacientes diagnosticados de SIDA, y si pareciera que el pronóstico mejorara, pensamos que los datos estarían enmascarados al hacerse el diagnóstico antes en el tiempo.

Estos hallazgos validan la utilidad de la nueva clasificación para lo que ha sido propuesta, es decir, sensibilizar a las autoridades sanitarias con el fin de poder tener más medios para hacer frente a la enfermedad, al aumentar el número de casos de SIDA de forma importante y no cambiar la supervivencia, identificando una población similar en evolución a la que ya se identificaba con los criterios de 1987. Por ello, hemos decidido analizar los resultados del ensayo funcional para producción de TNF-alfa y los del estudio fenotípico de las células NK, dividiendo a nuestros pacientes en grupos según la nueva definición-

clasificación de 1992.

2. ANTÍGENOS DE DIFERENCIACIÓN LEUCOCITARIA.-

En el presente estudio hemos analizado las diferencias en el número de células T y NK entre el grupo de controles sanos y los pacientes con infección por VIH, divididos éstos a su vez en tres grupos, según la nueva clasificación de 1992, dependiendo del número de linfocitos T CD4+/mm³. Para relacionar el número de células NK con la aparición de enfermedades hemos clasificado también a los pacientes en categorías clínicas (A, B y C), según la sintomatología que presentaran y de acuerdo a la definición de SIDA de 1992. Se ha determinado la expresión de tres antígenos de diferenciación leucocitaria asociados a las células NK: Kp43, CD16 y CD56.

Células T.-

Los antígenos de superficie de las células T han sido estudiados en profundidad en multitud de trabajos desde el descubrimiento del SIDA. Nuestros datos corroboran que la proporción y el número absoluto de linfocitos T CD4+ disminuyen a medida que progresa la enfermedad, por ser esas células la principal diana del VIH, y que la proporción de linfocitos T CD8+ aumenta de la misma forma, lo que da lugar a la inversión del cociente CD4/CD8 tan característica del SIDA.

Células NK.-

Hemos encontrado que la proporción de las células Kp43+ es más baja en los pacientes del grupo 1 (de 200 a 400 células CD4+/mm³) que en los controles y que en el resto de los grupos. Cuando se analiza el número total de células que expresan este antígeno se observa que en los tres grupos está disminuído, con diferencias significativas ($p < 0.01$), más acusadas en el grupo 2 y más aún en el 3.

La proporción de células CD16+ y CD56+ igualmente es menor en los pacientes del grupo 1 y también en los del grupo 3 para el CD16 y en los del grupo 2 para el CD56,

mientras que el número total de células que expresan estos marcadores está descendido en los tres grupos, más acusado a medida que la infección progresa.

No existe experiencia en la literatura sobre el número de células NK Kp43+ en la infección por VIH, por lo que no podemos comparar nuestros resultados. Sin embargo, como ya se refería en la introducción, el fenotipo de las NK en esta enfermedad ha sido estudiado por diversos autores con los antígenos CD16 y CD56.

Nuestros hallazgos coinciden con otros aportados en la literatura, como el de Margolick et al (135), quienes demuestran que en todos los seropositivos el número total de células NK CD56+ estaba disminuído aunque no diferencian por estadios claramente, pues estudian 78 pacientes, de los que sólo 7 tenían uno o más síntomas relacionados con el VIH y el resto estaban asintomáticos. Formenti et al (137) encuentran disminución del número total de células NK en los asintomáticos y en los pacientes con sarcoma de Kaposi, pero son similares a las de los controles en los pacientes con infecciones oportunistas. En esta serie estudian 17 pacientes con múltiples infecciones oportunistas y 3 con NPC. En la serie de Dines et al (130), las células NK se encuentran disminuídas en número absoluto sólo en los pacientes con leucoplaquia oral o con infección por CMV, mientras que en el resto de enfermedades asociadas no hay diferencias ni tampoco en los asintomáticos. Otros trabajos revisados encuentran también disminución del número de NK, pero a expensas del porcentaje, sin determinar el número absoluto (69). Portilla et al (134) estudian 128 pacientes en diferentes estadios de la enfermedad y comprueban disminución del porcentaje según avanza la infección, con diferencias significativas entre uno y otro grupo, pero no comparan con un grupo de controles sanos.

El resto de las series revisadas muestran que el porcentaje de las células NK es normal en todos los pacientes con infección por VIH, tengan o no enfermedades asociadas

(125,131,133,136,140). Estas series pueden criticarse desde el punto de vista de la selección y número de pacientes, pues se estudian 25 ADVP (125), 5 hemofílicos (136) y 16 pacientes con NPC o sarcoma de Kaposi (140). La más amplia es la de Tambussi et al (131) que incluye 21 pacientes, 7 para cada grupo de la clasificación de 1987 (grupo III, IV A y IV C1). Sólo hemos encontrado un trabajo (129) en el que se menciona que el número absoluto de células NK es normal en todos los pacientes infectados, pero la serie publicada está limitada a un número muy reducido de casos, sólo 13 pacientes, lo que pensamos que limita el valor de los resultados.

Por lo tanto, a la vista de nuestros datos nos parece importante reseñar que el estudio de las células NK en la infección por el VIH debe hacerse en base al número absoluto, ya que si se tiene en cuenta únicamente el porcentaje sobre el total de linfocitos se observan modificaciones sustanciales en el número sólo en el grupo 1 y según qué marcador en los otros grupos, lo que en ocasiones podría llevar a conclusiones equívocas, al deducir en base a estos hallazgos que la cifra de células NK es normal en alguno de los grupos. Lo mismo sucede con los linfocitos CD4+, siendo más importante el valor absoluto que la proporción sobre el total de linfocitos, sobre todo para definir la progresión de la enfermedad y poder establecer un pronóstico. De hecho, así se establece en la nueva definición-clasificación de SIDA de 1992, al hacer énfasis en el número absoluto y utilizar sólo el porcentaje cuando no se disponga del número total de linfocitos. Evidentemente el número de linfocitos totales va a determinar el número absoluto de células NK y si los primeros están bajos, las células NK tenderán también a estarlo, pero no en todos los casos es así (en el grupo 1 el número total de linfocitos es similar al de los controles sanos, sin diferencias significativas). El haber encontrado correlación significativa entre el descenso de las células CD4+ y el descenso de las Kp43+ nos apoya más en la idea de usar el número absoluto de células NK para valorar

su estado en esta enfermedad.

El mecanismo por el que las células NK disminuyen en la infección por VIH no está claro, como tampoco lo está por qué disminuyen a medida que progresa la enfermedad. Se ha hablado de mecanismos dishematopoyéticos, que podrían afectar a cualquier población de linfocitos. También de infección directa por el VIH, pero no existe evidencia clara para poderlo afirmar.

Recientemente (145,146) se ha visto que las células NK pueden ser infectadas directamente por el virus herpes tipo 6, cofactor asociado a la infección por VIH, y puede producirles su muerte o bien inducir receptores en las células NK para el VIH y éste infectarlas a su vez. Así, la disminución del número de las NK sería consecuencia de la muerte directa por el virus. Como sucede con los linfocitos CD4+, lo más probable es que existan varios mecanismos patogénicos que actúen conjuntamente y sea difícil definir la verdadera causa del déficit numérico de las NK.

Al determinar el coeficiente de correlación entre los tres marcadores utilizados para el estudio de las NK, hemos comprobado que no para todos los grupos de pacientes existe correlación significativa, mientras que en los controles sanos sí existe. Esto podría significar que para los sujetos sanos el estudio por cualquiera de los tres marcadores sería de utilidad, y para los pacientes deberían utilizarse los tres ya que puede haber cambios si sólo usamos uno. La causa de esta falta de correlación podría encontrarse en alteraciones en la diferenciación celular de forma precoz. Al relacionar Kp43 con CD16 se observa que no existe correlación en el grupo 1; al relacionar CD16 con CD56 también falla en el grupo 1, y al relacionar Kp43 con CD56 hay correlación en los tres grupos. Por lo tanto, parece que sólo es el grupo 1 el que puede apartarse de la norma, lo que pensamos que no impide hacer el estudio de las células NK en función del antígeno Kp43 en el momento de establecer su

relación con las infecciones del SIDA, pues son los pacientes de los grupos 2 y 3 los que las padecen. Así, el antígeno Kp43 podría tener el mismo valor que los otros dos marcadores usados para el estudio de las NK y su uso podría sustituir a cualquiera de los otros sin que los resultados se modificaran de forma significativa.

Hay datos en la literatura que demuestran el papel de las células NK en la defensa contra las infecciones virales, al encontrar en ciertas condiciones patológicas disminución de las células NK asociada a infecciones frecuentes por virus herpes zóster y citomegalovirus sobre todo. En cuanto a las infecciones bacterianas se ha dicho que podrían tener importancia en la defensa contra ciertas especies, como *Shigella*, *Legionella*, *Listeria*, etc. Menos evidente es su acción contra ciertos hongos, como *Candida albicans* o *Criptomoco neoformans*. La posible actividad sobre protozoos tampoco se ha estudiado en detalle; sobre *Toxoplasma gondii* se ha referido que en las infecciones por este protozoo existe actividad NK aumentada, además de estimular la producción de IFN-gamma, y que las células NK de ratón pueden lisar toxoplasmas in vitro.

En nuestra serie hemos observado que existe disminución del número de células NK (medidas por la expresión de Kp43 y CD16) con diferencias significativas cuando los pacientes han padecido toxoplasmosis, que se acompaña de disminución de los linfocitos totales, de los CD3+, CD4+ y CD8+ (tabla 15). En otras enfermedades hemos encontrado cierta tendencia a un mayor número de células NK (Kp43+, CD16+ y CD56+) como en la infección por virus herpes que también se acompaña de discreto aumento de los linfocitos T CD4+ (tabla 18). En otros casos, como la NPC, candidiasis y tuberculosis lo que se observa es que el número de células Kp43+ es algo menor. siendo variables el resto de los parámetros analizados y existe disminución de las células CD16+ en la NPC y la candidiasis, con diferencias significativas. Por último, en la neumonía bacteriana y en el

sarcoma de Kaposi, las células Kp43+, CD16+ y CD56+ son normales como también los son los linfocitos T CD4+.

Con todos estos datos puede decirse que las células NK disminuirían con la progresión de la enfermedad, comenzando incluso antes de la aparición de síntomas asociados, lo que puede predisponer a la progresión de la infección por el VIH, o a la aparición de infecciones asociadas, como la toxoplasmosis cerebral, que hasta ahora no se había considerado como asociada a un déficit de células NK, la NPC o la candidiasis. En otras enfermedades podemos encontrar tendencia a un mayor número de células NK, que podría poner de manifiesto una respuesta por parte del huésped de sobreproducción de estas células en un intento de controlar la infección que, sin embargo, dada la mala evolución clínica de los pacientes, sugeriría que son funcionalmente inactivas. Por último en otras situaciones, no se observa ningún cambio en la cifra de células NK, lo que podría presuponer que en esas infecciones estas células no están jugando ningún papel. Resaltamos también la necesidad de realizar el estudio de las células NK en el SIDA con la determinación de la expresión de los tres antígenos de superficie utilizados.

Sin embargo, hay que señalar la dificultad de interpretación de los resultados del papel relativo de las células NK al superponerse su disminución con la de otras poblaciones linfoides, en algunos casos.

Las diferencias observadas en el número de células NK no sabemos si pueden tener importancia pronóstica como marcador de progresión, lo que debería ser determinado en estudios más amplios y prospectivos, con seguimiento de los pacientes a largo plazo y estudio de estas células repetidos secuencialmente.

3. ENSAYO FUNCIONAL.-

Se han descrito anomalías funcionales en las células T y en las células NK en la infección por VIH que ocurren en todos los estadios de la enfermedad y que afectan a multitud de funciones en ambos tipos de células. Esto va a dar como consecuencia las alteraciones clínicas características del SIDA, manifestada en una gran mayoría de pacientes por la aparición de infecciones recurrentes a lo largo de su evolución.

Hemos encontrado que la respuesta relativa en la producción de TNF-alfa tras el estímulo inespecífico más IL-2 está disminuida en los pacientes respecto de los controles sanos, pero sin diferencias significativas (tabla 29).

Linfocitos T.-

Cuando el estímulo se realiza con CD3, la respuesta de los linfocitos T no presenta diferencias significativas respecto de los controles sanos en los grupos 1 y 2. Sin embargo, en el grupo 3 la respuesta es significativamente menor, lo que podría implicar que la función de los linfocitos T en estadios avanzados de la enfermedad estaría alterada, como ya ha sido descrito ampliamente en la literatura. También vemos disminución de la respuesta relativa cuando el estímulo se hace con CD3 y adición de IL-2, pero en este caso se observa que el defecto ocurre en todos los estadios de la enfermedad con diferencias significativas. Rosenberg y Fauci (19) refieren que podría existir cierta homología entre la gp120 del VIH y la IL-2, y así la gp120 se uniría al receptor de IL-2 de los linfocitos T, no permitiendo que lo hiciera la citoquina. Esto podría interferir con la actividad de esa citoquina de forma directa o indirecta. La gp120 estaría activando continuamente a los linfocitos en reposo con inducción de un aumento de expresión de receptores de IL-2, con lo que se suprimiría su función haciéndolas menos respondedoras a las señales encontradas durante la respuesta inmunológica normal.

Células NK.-

El estímulo con CD16 da lugar a una respuesta idéntica a los controles en producción de TNF-alfa en todos los estadios de la enfermedad. Se ha descrito que la producción de TNF-alfa tras estímulo con CD16 en sujetos normales es reducida y se intensifica cuando se añade el estímulo de la IL-2. Por otro lado, la activación de las células NK a través de CD16 potencia el efecto mitogénico de la IL-2. En nuestra experiencia, cuando analizamos el efecto del estímulo con CD16 y adición de IL-2 se observa disminución de la respuesta de forma significativa respecto a los controles en todos los grupos de pacientes, lo que hace pensar que la IL-2 en la infección por VIH no aumentaría el efecto del estímulo con CD16 y hace patente la disfunción de estas células, como se ha descrito en el apartado anterior para los linfocitos T.

En esta infección se ha encontrado alteración de la citotoxicidad NK en distinto grado dependiendo del estadio de la enfermedad. Hahn et al (124) observan que la citotoxicidad está disminuída en pacientes con SIDA y es normal en los asintomáticos, al igual que Voth et al (128) y Poli et al (125). Tambussi et al (131) y Hersh et al (132), por el contrario, refieren que la citotoxicidad estaría disminuída también en los asintomáticos. Por último, Dines et al (130) encuentran que la citotoxicidad en los asintomáticos está elevada. Una posibilidad, al igual que ocurría con el número de células, es que los defectos en la función inmune de las células NK ocurran pronto tras la seroconversión, en asociación con disminución de linfocitos T CD4+ y aumento de los CD8+ (126).

Los trabajos más importantes, como el de Sirianni et al (139) y Bonavida et al (127) demuestran que hay defecto en la citotoxicidad localizado en la fase de la lisis que ocurre tras la unión a la célula diana, debido a que no polarizan la tubulina alfa y beta y a que no segregan NKCF. Bonavida et al (127) y Lifson et al (140) han demostrado que este defecto

se recupera sólo parcialmente cuando las células NK se exponen a la IL-2, en forma dosis-dependiente, y la respuesta no depende de si el paciente presenta infección oportunista o tumor. La respuesta citotóxica tras el estímulo con IL-2 no llega a los niveles máximos, comparado con los controles sanos, lo que sugeriría que tal vez se requieran otros factores para alcanzar la actividad máxima. Nuestras observaciones coinciden con estos resultados en la medida que demuestran como la IL-2 tampoco normaliza la producción de TNF activado vía CD16. El estudio con otros estímulos, como fitohemaglutinina (131), pone de manifiesto que se produce un aumento de la actividad, sobre todo en los pacientes del grupo II de los CDC, mientras que en los grupos IV A y IV C1 el aumento es moderado. Estos autores sugieren que los pacientes con enfermedad avanzada pueden no responder, aún tras estímulos, probablemente porque la maquinaria lítica de las células efectoras está sumamente comprometida.

Por otro lado, y en la misma línea que nuestras observaciones, Scott-Algara et al (138) han encontrado que la producción de TNF-alfa está disminuída tras la unión a la célula diana y que no se restaura esta actividad aunque se cultiven en presencia de niveles elevados de IL-2, lo que a ellos les sugiere que en la infección por VIH debe haber un "proceso de anergia general" que es independiente del efecto citopático del VIH.

Pensamos por lo tanto que nuestros resultados están de acuerdo con los referidos en la literatura, aunque el método utilizado haya sido diferente. La respuesta de las células NK al estímulo con CD16 en los pacientes es indistinguible a la de los controles sanos; sin embargo, combinado a la IL-2 está disminuída en todos los estadios de la infección, lo que demostraría la existencia de un defecto en la actividad funcional de las células NK.

CONCLUSIONES

1^a. No observamos diferencias significativas en el riesgo de evolucionar a SIDA tras estratificar a los pacientes según la clasificación de 1992, aunque se aprecia un aumento del 60% en el número de casos de SIDA en el momento del diagnóstico de la infección. Tampoco hemos observado diferencias entre la probabilidad de supervivencia cuando se estratifican los pacientes por cualquiera de las dos clasificaciones. Estos hallazgos validan la utilidad de la nueva clasificación al identificar la misma población que se describía con la de 1987.

2^a. Como factores de riesgo para desarrollar SIDA hemos observado: haber padecido candidiasis oral, pertenecer a un grupo de riesgo distinto de los ADVP y tener al diagnóstico de la infección por VIH una cifra de linfocitos T CD4+ de 200 a 400/mm³.

3^a. Existe una disminución significativa del número de células NK, identificadas por cualquiera de los marcadores (Kp43, CD16 o CD56) a medida que progresa la infección por VIH, que se comienza a apreciar ya en estadios precoces.

4^a. Se ha observado una disminución significativa de la producción de TNF-alfa por parte de las células NK cuando son estimuladas con CD16 en presencia de IL-2, apreciable en todos los estadios de la enfermedad y más acusada en el grupo 3.

5^a. Las células Kp43+ están disminuídas de forma significativa en los pacientes que han padecido toxoplasmosis cerebral, mientras que las CD16+ lo están en la NPC, toxoplasmosis y candidiasis. Sin embargo, dado el solapamiento con la disminución de otras subpoblaciones de linfocitos, los resultados de este análisis no permiten percibir claramente el papel relativo de las células NK en la aparición de infecciones.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. N Eng J Med 1981; 305: 1425-1431.
- 2.- Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Vande Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S. An outbreak of community-acquired pneumocystis carinii pneumonia. N Engl J Med 1981; 305: 1431-1438.
- 3.- Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR, Parham DM, Siegal M, Cunningham-Rundles S, Armstrong D. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. N Eng J Med 1981; 305: 1439-1444.
- 4.- Durack DT. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. N Eng J Med 1981; 305: 1465-1467.
- 5.- CDC: Update on acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). United States. MMWR 1982; 31: 507-514.
- 6.- CDC: Revision of case definition of acquired immunodeficiency syndrome for national reporting. United States. JAMA 1985; 254: 599-600.
- 7.- CDC: Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. JAMA 1987; 258: 1143-1154.
- 8.- Redfield RR, Wright DC, Tramont EC. The Walter-Reed staging classification for HTLV-III/LAV infection. N Engl J Med 1986; 314: 131-133.
- 9.- CDC: Classification system for HTLV-III/LAV infections. MMWR 1986; 35: 334-348.
- 10.- Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR 1992; 41: 1-19.

- 11.- Editorial. Cambios en la definición de casos de SIDA. Lancet 1992 (edición española); 22: 223-225.
- 12.- Buehler JW, Ward JW. A new definition for AIDS surveillance. Ann Intern Med 1993; 118: 390-392.
- 13.- Cohn D, Rietreijen C, St. John C, Paulson A, Haggland B, Davidson A. Impact of the revised CDC classification system of HIV infection: Denver 1990-1991. VIII International Conference on AIDS/III STD World Congress. Amsterdam, July 1992, abstract PoC4113.
- 14.- Chêne G, Morlat P, Dabis F. Impact of revision of AIDS case definition. Lancet 1992; 339: 1298-1299.
- 15.- Brettle RP, Gore SM, Bird G, McNeil AJ. Clinical and epidemiological implications of the Centers for Disease Control/World Health Organization reclassification of AIDS cases. AIDS 1993; 7: 531-539.
- 16.- Velázquez A, Sanz T, Pulido F, Rubio R, Costa JR, De Juanes JR. Impact of 1992 expanded AIDS surveillance case definitions for adolescents and adults. Third European Conference on Clinical Aspects and Treatment of HIV Infection. Paris, March 1992. Abst P270.
- 17.- Sheppard HW, Winkelstein W, Osmond D, Boss AR. Effect of new AIDS case definition on number of cases among homosexual and bisexual men in San Francisco. JAMA 1991; 266: 2221.
- 18.- Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. FASEB J 1991;5:2349-2360.
- 19.- Rosenberg ZF, Fauci AS. The immunopathogenesis of HIV infection. Advances in Immunology 1989;47:377-431.
- 20.- Barré-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus

from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983;225:63-66.

21.- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Eta L. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984; 225: 497-500.

22.- Warner MA, Kunkel SE. Human Immunodeficiency Virus Infection. *Anesthesiology Clinics of North America* 1989;7: 795-811.

23.- Levy JA. Human Immunodeficiency Viruses and The Pathogenesis of AIDS. *JAMA* 1989; 261: 2997-3006.

24.- Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 308-317.

25.- Rosenberg ZF, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *FASEB J* 1991; 5: 2382-2390.

26.- Rosenberg ZF, Fauci AS. Immunopathogenic mechanism of HIV infection: cytokine induction of HIV expression. *Immunol Today* 1990; 11:176-180.

27.- Beverley P, Sattentau Q. Immunology of AIDS. *B Med J* 1987; 294:1536-1538.

28.- Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP. Quiescent T-lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 1991; 254: 423-427.

29.- Levy JA. Patogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). *Hospital Practice* 1991; 6: 31-39.

30.- Clavel F, Guetard D, Brun-Bezinet F. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 223: 343-346.

31.- Weissman I. Approaches to an understanding of pathogenetic mechanism in AIDS. *Reviews of Infectious Diseases* 1988; 10: 385-398.

- 32.- Sninsky JJ, Kwok S. Detection of human immunodeficiency viruses by the polymerase chain reaction. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 259-262.
- 33.- Meltzer MS, Skillman DR, Hoover DL, Hanson BD, Turpin JA, Chester Kalter D, Gendelman HE. Macrophages and the human immunodeficiency virus. *Immunol Today* 1990; 11: 217-223.
- 34.- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci SC. Mechanism of disease: The immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus Infection. *New Engl J Med* 1993; 328: 327-335.
- 35.- Marx J. Clue fond to T cell loss in AIDS. *Science* 1991; 254: 798-800.
- 36.- Zinkernagel RM. Virus-triggered AIDS: a T-cell mediated immunopathology? *Immunol Today* 1988; 9: 370-371.
- 37.- Kion TA, Hoffman GW. Anti-HIV and anti-MHC antibodies in alloimmune and autoimmune mice. *Science* 1991; 253: 1138-1140.
- 38.- Imberti L, Sottini A, Bettinardi A. Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V subbeta sequences. *Science* 1991; 254: 360.362.
- 39.-Nájera Morrondo R. Superantígenos y patogenia del SIDA. *Pub SEISIDA* 1991; 2: 279-282.
- 40.- Cheng-Mayer C, Shioda T, Levy JA. Host range, replicative and cytophatic properties of human immunodeficiency virus type 1 are determined by very few aminoacid changes in tat and gp120. *J Virol* 1991; 65: 6931-6941.
- 41.-Nájera Morrondo R. Aislamiento y caracterización del VIH. *Pub SEISIDA* 1992;3:55.
- 42.- Malkovsky M, Philpott K, Dalglish AG, Mellor AL, Patterson S, Webster ADB, Edwards AJ, Maddon PJ. Infection of B lymphocytes by the human immunodeficiency virus and their susceptibility to cytotoxic cells. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1315-1321.
- 43.- Brenneman DE, Westbrook GL, Fitzgerald SP, Ennist DL, Elkins KL, Ruff MR, Pert

CB. Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. *Nature* 1988; 335: 639-642.

44.- Merrill JE, Chen ISY. HIV-1, macrophages, glial cells, and cytokines in AIDS nervous system disease. *FASEB J* 1991; 5: 2391-2397.

45.- Quinnan GV, Siegel JP, Epstein JS, Manischewitz JF, Barnes S, Wells MA. Mechanism of T-cell functional deficiency in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1985; 103: 710-714.

46.-Bachetti P, Moss AR. Incubation period of AIDS in San Francisco. *Nature* 1989;338:251-253.

47.-Cotton P. Cofactor question divides codiscoverers of HIV. *JAMA* 1990; 264:3111-3112.

48.- Nájera R. Cofactores en la infección por VIH y en el SIDA. *Pub SEISIDA* 1991; 2: 203-206.

49.- Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. Immunopathogenic mechanism in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1991; 114: 678-693.

50.- Carrigan DR, Knox KK , Tapper MA. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by human herpesvirus-6. *J Infect Dis* 1990; 162:844-851.

51.- Spira TJ, Bozeman LH, Sauderlin KC. Lack of correlation between human herpesvirus-6 infection and the course of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1990; 165:567-570.

52.- Lusso P, De María A, Mainati M. Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T Lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* 1991;349: 553-555.

53.-Laurence J. Molecular interactions among herpesviruses and Human Immunodeficiency Viruses. *J Infect Dis* 1990; 162: 338-346.

- 54.- Quinlivan EB, Holley-Guthrie E, Mar EC. The Epstein-Barr virus BRLF1 immediate-early gene product transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by a mechanism which is enhancer independent. *J Virol* 1990; 64: 1817-1820.
- 55.- Lefrère JJ, Couroucè AM, Mariotti M. Rapid progression to AIDS in dual HIV-1/HTLV-I infection. *Lancet* 1990; 336: 509-510.
- 56.- Page JB, Lai S, Chitwood DD. HTLV-I/II seropositivity and death from AIDS among HIV-1 seropositive intravenous drug users. *Lancet* 1990; 335: 1439-1441.
- 57.- Gallo R. Mechanism of disease induction by HIV. *J Acq Immun Def Synd* 1990;3: 380-389.
- 58.- Levreo M, Balsano C, Natoli G. Hepatitis B virus X protein transactivates the long terminal repeats of human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J Virol* 1990; 64: 3082-3086.
- 59.- Kiviat N, Rompalo A, Bowden R. Anal human papillomavirus infection among human immunodeficiency virus seropositive and seronegative men. *J Infect Dis* 1990; 162: 358-361.
- 60.- Chowdhury IH, Munakata T, Koyanagi Y. Mycoplasma can enhance replication "in vitro": a possible cofactor responsible for the progression of AIDS. *Bioch Bioph Res Com* 1990; 170:1365-1370.
- 61.- Lo SC, Tsai S, Behish JR. Enhancement of HIV-1 cytocidal effects in CD4+ lymphocytes by the AIDS-associated mycoplasma. *Science* 1991;251:1074-1076.
- 62.- Lysterly HK, Matthews TJ, Langlois AL, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Human T-cell lymphotropic virus IIIB glycoprotein (gp120) bound to CD4 determinants on normal lymphocytes and expressed by infected cells serves as target for immune attack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4601-4605.
- 63.- Joly P, Guillon JM, Mayaud C, Plata F, Theodorou I, Denis M, Debre P, Autran B.

Cell-mediated suppression of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1989; 143: 2193-2201.

64.- Norley SG, Mikschy U, Werner A, Staszewski S, Helm EB, Kurth R. Demonstration of cross-reactive antibodies able to elicit lysis of both HIV-1- and HIV-2-infected cells. *J Immunol* 145; 1700-1705.

65.- Ljunggren K, Böttiger B, Biberfeld G, Karlson A, Fenyö E, Jondal M. Antibody-dependent cellular cytotoxicity-inducing antibodies against human immunodeficiency virus. *J Immunol* 1987; 139: 2263-2267.

66.- Rook AH, Lane HC, Folks T, McCoy S, Alter H, Fauci AS. Sera from HTLV-III/LAV antibody-positive individuals mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against HTLV-III/LAV-infected cells. *J Immunol* 1987;138: 1064-1067.

67.- Tyler DS, Stanley SD, Nastala CA, Austin AA, Bartlett JA, Stine KC, Lyerly HK, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Alterations in antibody-dependent cellular cytotoxicity during the course of HIV infection. *J Immunol* 1990; 144: 3375-3384.

68.- Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987; 328: 345-348.

69.- Vanham G, Kestens L, Gigase P, Colebunders R, Vandenbruaene M, Brijs L, Ceuppens JL. Evidence for circulating activated cytotoxic T cells in HIV-infected subjects before the onset of opportunistic infections. *Clin Exp Immunol* 1990; 82: 3-9.

70.- Koup RA, Sullivan JL, Levine PH, Brettler D, Mahr A, Mazzara G, McKenzie S, Panicali D. Detection of major histocompatibility complex class I-restricted, HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in the blood of infected hemophiliacs. *Blood* 1989; 73: 1909-1914.

71.- Koenig S, Earl P, Powell D, Pantaleo G, Merli S, Moss B, Fauci AS. Group-specific,

major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic responses to human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) envelope proteins by cloned peripheral blood T cells from an HIV-1 infected individual. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8638-8642.

72.- Kundu SK, Merigan TC. Inverse relationship of CD18+ CD11+ suppressor T cells with human immunodeficiency virus (HIV)-specific cellular cytotoxicity and natural killer cell activity in HIV infection. *Immunology* 1991;74: 567-571.

73.- Tsubota H, Lord CI, Watkins DI, Morimoto C, Letvin NL. A Cytotoxic T lymphocyte inhibits acquired immunodeficiency syndrome virus replication in peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 1989; 169: 1421-1434.

74.- Weinhold KJ, Matthews TJ, Ahearne PM, Langlois AJ, Lyerly HK, Tyler DS, Stine KC, Durack DT, Bolognesi DP. Cellular anti-gp120 cytolytic reactivities in HIV-1 seropositive individuals. *Lancet* 1988; 6: 902-904.

75.- Ruscetti FW, Mikovits JA, Kalyanaraman VS, Overton R, Stevenson H, Stromberg K, Herberman RB, Farrar WL, Ortaldo JR. Analysis of effector mechanism against HTLV-I and HTLV-III/LAV-infected lymphoid cells. *J Immunol* 1986; 136: 3619-3624.

76.- Zheng Z, Zucker-Franklin D. Apparent ineffectiveness of natural killer cells vis-à-vis retrovirus-infected targets. *J Immunol* 1992; 148: 3679-3685.

77.- Bandyopadhyay S, Ziegner U, Campbell DE, Miller DS, Hoxie JA, Starr SE. Natural killer cell-mediated lysis of T cell lines chronically infected with HIV-1. *Clin Exp Immunol* 1990; 79: 430-435.

78.-Lemp GF, Payne SF, Neal D, Temelso T, Rutherford GW. Survival trends for patients with AIDS. *JAMA* 1990; 263: 402-406.

79.- Tindall B, Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991; 5: 1-14.

- 80.- Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 961-964.
- 81.- Clark SJ, Saag MS, Decker WD. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324: 954-960.
- 82.- Michael NL, Vahey M, Burke DS, Redfield RR. Viral DNA and mRNA expression correlate with the stage of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection in humans: evidence for viral replication in all stages of HIV disease. *J Virol* 1992; 66: 310-316.
- 83.- Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. *Science* 1989; 245: 305-308.
- 84.- Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, Wong-Staal F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individual by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 772-776.
- 85.- Fauci AS, Masur H, Gelmann EP, Markham PD, Hahn BH, Lane HC. NIH conference: The acquired immunodeficiency syndrome: un update. *Ann Intern Med* 1985; 102: 800-813.
- 86.- Price RW, Brew B, Sidtis J, Roseblum M, Scheck AC, Cleary P. The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. *Science* 1988; 239: 586-592.
- 87.- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L. Lymphoid organ function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9838-9842.
- 88.- Shibata D, Brynes RK, Nathwani B, Kwok S, Sninsky J, Arnheim N. Human immunodeficiency viral DNA is readily found in lymph node biopsies from seropositive individuals: analysis of fixed tissue using the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1989; 135: 697-702.

- 89- Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, Foss HD, Stein H. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am J Pathol* 1992; 140:15-22.
- 90.- Rouse RV, Ledbetter JA, Weissman IL. Mouse lymph node germinal centers contain a selecte subset of T cells-the helper phenotype. *J Immunol* 1982; 128: 2243-2246.
- 91.-Trinchieri G. Biology of Natural Killer Cells. *Advances in Immunology* 1989; 47: 187-376.
- 92.- Lewis CE, McGee J. The natural killer cell. Oxford University Press. 1992.
- 93.- Lanier LL, Philips J, Hackett J, Tutt M, Kumar V. Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J Immunol* 1986; 137: 2735-2737.
- 94.- Fitzgerald-Bocarsly P, Herberman R, Hercend T, Hiserodt J, Kumar V, Lanier L, Ortaldo J, Pross H, Reynolds C, Welsh R, Wigzell H. A definition of natural killer cells. *Immunol Today* 1988; 9: 292-294.
- 95.- Rosenberg S. Lymphokine-activated killer cells: a new approach to immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75: 595-600.
- 96.- Nelson DB, Bundy DM, Strober W. Spontaneous cell-mediated cytotoxicity by human peripheral blood lymphocytes in vitro. *J Immunol* 1977; 119: 1401-1404.
- 97.- Jondal M, Pross H. Surface markers on human B and T lymphocytes. VI. Cytotoxicity against cell lines as a functional marker for lymphocyte subpopulations. *Int J Cancer* 1975; 15: 596-599.
- 98.- Brunner KT, Manuel J, Cerottini JC, Chapuis B. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on Cr⁵¹-labeled allogeneic target cells in vitro: inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 1968; 14: 181-183.
- 99.- Targan S. A single cell marker of active NK cytotoxicity: only a fraction of target

binding lymphocytes are killer cells. *J Clin Lab Immunol* 1980;4: 165-168.

100.- Rubin P, Pross HF, Roder JC. Studies on human natural killer cells. II. Analysis at the single cell level. *J Immunol* 1982; 128: 2553-2560.

101.- O'Shea J, Ortaldo JR. The biology of natural killer cell. En Lewis CE, McGee J. *The natural killer cell. Oxford University Press. 1992.*

102.- Funaro A, Bellone G, Alessio M, De Monte L, Palestro G, Matera L, Caligaris-Cappio F, Malavasi F. Recognition by monoclonal antibody CB02 of a surface molecule shared by B lymphocytes and a discrete large granular lymphocyte subset with cytotoxic activity. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1988; 7: 106-110.

103.- Brooks CF, Moore M. Presentation of a soluble bacterial antigen and cell-surface alloantigens by large granular lymphocytes (LGL) in comparison with monocytes. *Immunology* 1986; 58: 343-346.

104.- Chow SC, Ng J, Nordstedt C, Fredholm BB, Jondal M. Phosphoinositide breakdown and evidence for protein kinase C involvement during human NK killing. *Cell Immunol* 1988; 114: 96-100.

105.- Aramburu J, Balboa MA, Ramírez A, Acevedo A, Silva A, Sánchez- Madrid F, O. de Landázuri M, López-Botet M. A novel functional cell surface dimer (Kp43) expressed by natural killer cells and T cell receptor-gamma/delta+ lymphocytes. I. Inhibition of the IL-2-dependent proliferation by anti-kp43 monoclonal antibody. *J Immunol* 1990; 144: 3238-3247.

106.- Aramburu J, Balboa MA, Izquierdo M, López-Botet M. A novel functional cell surface dimer (Kp 43) expressed by natural killer cells and gamma/delta TCR+ T lymphocytes. *J Immunol* 1991; 147: 714-721.

107.- Wright SC, Bonavida B. Selective lysis of NK-sensitive targets cells by a soluble mediator released from murine spleen cells and human peripheral blood lymphocytes. *J*

Immunol 1981; 126: 1516-1522.

108.- Wright SC, Bonavida B. Studies on the mechanism of natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity (CMC). I. Release of cytotoxic factors specific for NK-sensitive target cells (NKCF) during coculture of NK effector cells with NK target cells. J Immunol 1982; 129: 433-439.

109.- Wright SC, Bonavida B. Studies on the mechanism of natural killer cytotoxicity. II. Coculture of human PBL with NK-sensitive or resistant cell lines stimulates release of natural killer cytotoxic factor (NKCF) selectively cytotoxic to NK-sensitive target cells. J Immunol 1983; 130: 2479-2484.

110.- Wright SC, Bonavida B. Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. VII. Functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. J Immunol 1987; 138: 1791-1797.

111.- Young JDE, Cohn ZA. Cellular and humoral mechanism of cytotoxicity. Structural and functional analogies. Adv Immunol 1987; 41: 269-274.

112.-Lichtenheld MG, Olsen KJ, Lu P, Lowrey DM, Hameed A, Hengartner H, Podack ER. Structure and function of human perforin. Nature 1988; 335: 448-452.

113.- Russell JH. Internal disintegration model of cytotoxic lymphocyte-induced target damage. Immunol Rev 1983; 72: 97-100.

114.- Jiang S, Pereschini P, Zychlinsky A, Liu CC, Perussia B, Young JD. Resistance of cytolytic lymphocytes to perforin mediated killing: lack of correlation with complement-associated homologous species restriction. J Exp Med 1988; 168: 2207-2211.

115.- Cassatella MA, Anegón I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G, Perussia B. FcR (CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Differential role of Ca²⁺ in FcR (CD16) and Il-2 induced

- transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med* 1989; 169: 549-555.
- 116.- Trinchieri G, Santoli D. Antiviral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J Exp Med* 1978; 147: 1314-1319.
- 117.- Silva A, Bonavida B, Targan S. Mode of action of interferon-mediated modulation of natural killer cytotoxic activity: recruitment of pre-NK cells and enhanced kinetics of lysis. *J Immunol* 1980; 125: 479-485.
- 118.- Targan S, Dorey F. Interferon activation of "pre-spontaneous killer" (pre-SK) cells and alteration in kinetics of lysis of both "pre-SK" and active SK cells. *J Immunol* 1980; 124: 2157-2159.
- 119.- Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin 2 augments natural killer cell activity. *Nature* 1981; 291: 335-338.
- 120.- Lanier LL, Benike CJ, Phillips JH, Engleman EG. Recombinant Interleukin 2 enhanced natural killer cell-mediated cytotoxicity in human lymphocyte subpopulations expressing the Leu 7 and Leu11 antigens. *J Immunol* 1985; 134: 794-801.
- 121.- García-Peñarrubia P. Natural killer cell in viral infection. En Lewis CE, McGee J. *The natural killer cell*. Oxford University Press. 1992.
- 122.- Bancroft GJ. The role of natural killer cell in innate resistance to infection. *Current Opinion in Immunology* 1993; 5: 503-510.
- 123.- Rook AH, Manischewitz JF, Frederick WR, Epstein JS, Jackson L, Gelmann E, Steis R, Masur H, Quinnan GV. Deficient, HLA-restricted, cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells and natural killer cells in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *J Infect Dis* 1985; 152: 627-630.

- 124.- Hahn T, Schattner A, Handzel ZT, Levin S, Bentwich Z. Possible role of natural cytotoxic activity in the pathogenesis of AIDS. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 50: 53-61.
- 125.- Poli G, Introna M, Zanaboni F, Peri G, Carbonari M, Aiuti F, Lazzarin A, Moroni M, Mantovani A. Natural killer cells in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome. *Clin Exp Immunol* 1985; 62: 128-135.
- 126.- Rappocciolo G, Toso JF, Torpey DJ, Gupta P, Rinaldo CR. Association of alpha interferon production with natural killer cell lysis of U937 cells infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 41-48.
- 127.- Bonavida B, Katz S, Gottlieb M. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Immunol* 1986; 137: 1157-1163.
- 128.- Voth R, Rossol S, Gräff E, Laubenstein HP, Schröder HC, Müller WEG, Meyer zum Büschenfelde KH, Hess G. Natural killer cell activity as a prognostic parameter in the progression to AIDS. *J Infect Dis* 1988; 157: 851-852.
- 129.- Plaeger-Marshall S, Spina CA, Giorgi JV, Mitsuyasu R, Wolfe P, Gottlieb M, Beall G. Alterations in cytotoxic and phenotypic subsets of natural killer cells in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J Clin Immunol* 1987; 7: 16-23.
- 130.- Dines I, Schechter M, Silva AT, Persechini PM. Clinical correlates of NK cell number and activity in HIV positive patients. IX International Conference on AIDS. Abstr PO-A24-0529. Berlin 1993.
- 131.- Tambussi G, Ridolfo AL, Gori A, Albarello V, Galli M, Moroni M. Natural killer cytotoxic test in the presence of phytohemagglutinin distinguishes between patients in the early and late stages of human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1991; 164:

1027-1028.

132.- Hersh EM, Gutterman JU, Spector S, Friedman H, Greenberg SB, Reuben JM, LaPushin R, Matza M, Mansell PWA. Impaired in vitro interferon, blastogenic, and natural killer cell responses to viral stimulation in acquired immune deficiency syndrome. *Cancer Research* 1985; 45: 406-410.

133.- Khayat D, Soubrane C, Andrieu JM, Visonneau S, Eme D, Tourani JM, Beldjord K, Weil M, Fernandez E, Jacquillat C. Changes of soluble CD16 levels in serum of HIV-infected patients: correlation with clinical and biologic prognostic factors. *J Infect Dis* 1990; 161: 430-435.

134.- Portilla J, Sánchez J, Boix V, Muñoz C, Sen ML, Pérez- Mateo, M. NK cells in HIV infection. Relation with clinical stages and CD4 cell counts. IX International Conference on AIDS. Abstr PO-A24-0537. Berlin 1993.

135.- Margolick JB, Scott ER, Odaka N, Saah AJ. Flow cytometric analysis of gamma-delta T cells and natural killer cells in HIV-1 infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 58: 126-138.

136.- Katzman M, Lederman M. Defective postbinding lysis underlies the impaired natural killer activity in factor VII-treated, human T lymphotropic virus type III seropositive hemophiliacs. *J Clin Invest* 1986; 77: 1057-1062.

137.- Formenti SC, Turner RR, de Martini RM, Boone DC, Bishop PC, Levine AM, Parker JW. Immunophenotypic analysis of peripheral blood leukocytes at different stages of HIV infection: an analysis of asymptomatic, ARC, and AIDS populations. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 300-307.

138.- Scott-Algara D, Vuillier F, Cayota A, Dighiero G. Natural killer (NK) cell activity during HIV infection: a decrease in NK activity is observed at the clonal level and is not

- restored after in vitro long-term culture of NK cells. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 181-187.
- 139.- Sirianni MC, Soddus S, Malorni W, Arancia G, Aiuti F. Mechanism of defective natural killer cell activity in patients with AIDS is associated with defective distribution of tubulin. *J Immunol* 1988; 140: 2565-2568.
- 140.- Lifson JD, Mark DF, Benike CJ, Koths K, Engleman EG. Human recombinant Interleukin-2 partly reconstitutes deficient in-vitro immune responses of lymphocytes from patients with AIDS. *Lancet* 1984; 5: 698-702.
- 141.- Rook AH, Masur H, Lane C, Frederick W, Kasahara T, Macher AM, Djeu JY, Manischewitz JF, Jackson L, Fauci AS, Quinnan JV. Interleukin-2 enhances the depressed natural killer and cytomegalovirus-specific cytotoxic activities of lymphocytes from patients with the acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Invest* 1983; 72: 398-403.
- 142.- Rook AH, Hooks JJ, Quinnan GV, Lane C, Manischewitz JF, Macher AM, Masur Ha, Fauci AS, Djeu JY. Interleukin 2 enhances the natural killer cell activity of acquired immunodeficiency syndrome patients through a gamma-interferon-independent mechanism. *J Immunol* 1985; 134: 1503-1507.
- 143.- Robinson WE, Mitchell WM, Chambers WH, Scuffman SS, Montefiori DC, Oeltmann TN. Natural killer cell infection and inactivation in vitro by the human immunodeficiency virus. *Human Pathol* 1988; 19: 535-540.
- 144.- Harris DT, Cianciolo GJ, Snyderman R, Argov S, Koren HS. Inhibition of human natural killer cell activity by a synthetic peptide homologous to a conserved region in the retroviral protein, p15E. *J Immunol* 1987; 138: 889-894.
- 145.- Lusso P, Malnati M, Garzino-Demo A, Crowley RW, Gallo RC. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6: induction of CD4 and HIV-1 susceptibility. IX International Conference on AIDS. Abstr PO-A15-0328.

- 146.- Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A. Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* 1993; 362: 458-462.
- 147.- Katz JD, Mitsuyasu R, Gottlieb MS, Timares Lebow L, Bonavida B. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Immunol* 1987; 139: 55-60.
- 148.- Blumberg RS, Paradis T, Harsthorn KL, Vogt M, Ho DD, Hirsch MS, Leban J, Sato VL, Schooley RT. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against cell infected with the human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1987; 156: 878-884.
- 149.- Tyler DS, Nastala CL, Stanley SD, Matthews TJ, Lyerly HK, Bolognesi DP, Weinhold KJ. Gp120 specific cellular cytotoxicity in HIV-1 seropositive individuals. *J Immunol* 1989; 142: 1177-1182.
- 150.- Sirianni MC, Tagliaferri F, Aiuti F. Pathogenesis of the natural killer cell deficiency in AIDS. *Immunol Today* 1990; 11: 81-82.
- 151.- Vassalli P. Tumor necrosis factor. Knock-out but not knocked out. *Current Biology* 1993; 3: 607-610.
- 152.- Beutler B. The presence of Cachectin/Tumor Necrosis Factor in human disease states. *Am J Med* 1988; 85: 287-288.
- 153.- Folks TM, Clouse KA, Justement J, Rabson A, Duh E, Kehrl JH, Fauci AS. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2365-2368.
- 154.- Butera ST, Roberts BD, Folks TM. Regulation of HIV-1 expression by cytokine networks in a CD4+ model of chronic infection. *J Immunol* 1993; 150: 625-634.
- 155.- Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, Justement S, Stanley S, Fauci S. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected

monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanism. *J Exp Med* 1990; 172: 151-158.

156.- Michichiko S, Yamamoto N, Shinozaki F, Shimada K, Soma G, Kobayashi N. Augmentation of in-vitro HIV replication in peripheral blood mononuclear cells of AIDS and ARC patients by tumour necrosis factor. *Lancet* 1989; 7: 1206-1207.

157.- Clouse KA, Powell D, Washington I, Poli G, Strebel K, Farrar W, Barstad P, Kovacs J, Fauci AS, Folks TM. Monokine regulation of human immunodeficiency virus-1 expression in a chronically infected human T cell clone. *J Immunol* 1989; 142: 431-438.

158.- Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2336-2340.

159.- Okamoto T, Matsuyama T, Mori S, Hamamoto Y, Kobayashi N, Yamamoto N, Josephs SF, Wong-Staal F, Shimotohno K. Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression by tumor necrosis factor alpha. *AIDS Res Hum Retrov* 1989;5: 131-138.

160.- Popik W, Pitha PM. Role of tumor necrosis factor alpha in activation and replication of the tat-defective human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1993; 67: 1094-1099.

161.- Grunfeld C, Kotler DP, Kwuan J, Doerrler W, Tierney A, Wang J, Pierson RN, Feingold KR. Circulating interferon-alpha levels and hypertriglyceridemia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1991; 90: 154-162.

162.- Jones PD, Shelley L, Wakefield D. Tumor necrosis factor-alpha in advanced HIV infection in the absence of AIDS-related secondary infections. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5: 1266-1271.

163.- Ketlinskii SA, Kalinina NM, Tsvetkova SN, Rakhmanova AG, Maslov VN, Khaldeeva

172.- Godfried MH, van der Poll T, Jansen J, Romijin JA, Eeftinck JKM, Endert E, van Deventer SJH, Sauerwein HP. Soluble receptors for tumour necrosis factor: a putative marker of disease progression in HIV infection. *AIDS* 1993; 7: 33-36.

173.- Altman DG. *Practical statistics for medical research*. Chapman & Hall ed. 1992.