Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio de la fusión fagolisosomal monocítica en pacientes con enfermedades asociadas a inmunodeficiencias secundarias, como la infección por HIV y la talasemia mayor

Pittis, María Gabriela

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Pittis, María Gabriela. (1995). Estudio de la fusión fagolisosomal monocítica en pacientes con enfermedades asociadas a inmunodeficiencias secundarias, como la infección por HIV y la talasemia mayor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2795_Pittis.pdf

Cita tipo Chicago:
Pittis, María Gabriela. "Estudio de la fusión fagolisosomal monocítica en pacientes con enfermedades asociadas a inmunodeficiencias secundarias, como la infección por HIV y la talasemia mayor". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2795_Pittis.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293
Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tesis presentada para optar por el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

Estudio de la fusión fagolisosomal monocítica en pacientes con enfermedades asociadas a inmunodeficiencias secundarias, como la infección por HIV y la talasemia mayor

Autora: María Gabriela Pittis

Directora: Dra. Luisa Sen

Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan"

IIHEMA, Academia Nacional de Medicina

1995

52

A Martín y Lucía

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luisa Sen, quien a través de su espíritu de trabajo y su pasión por la investigación me estimula a seguir creciendo.

A Gabriel Sternik, Federico Prada, Andrea Mangano, por el afecto y la riqueza que recibo durante el trabajo compartido.

A Carmen Galvez, por su asistencia técnica.

A Fernanda Palacios, Cecilia Fornari, Roberto Diez y todos mis compañeros de la Academia Nacional de Medicina, por el afecto y la ayuda que me brindaron durante los años compartidos.

A todos mis compañeros del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan", por la buena onda de cada día.

A la Dras. Aurora Feliu, Susana Abreu de Miani, Rosa Bologna y Julia Redondo, por su dedicación a los pacientes.

A los Dres. Raúl Uilich y Alicia Rovirosa del Servicio de Nutrición y a la Dra. Cecilia Galíndez del Laboratorio Central del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan" por su valiosa colaboración.

A Laurita Borodinsky, con quien comparto la actividad docente, por alivianarme la tarea para que pudiera dedicarme exclusivamente a la elaboración de mi tesis.

A mis padres, por enseñarme a amar y respetar la vida, a encarar cada proyecto con fuerza y con pasión, a no dejarme vencer por las adversidades, y por estar siempre a mi lado.

A mi hermana Paula, por el cariño y el apoyo que siempre me brindó.

A Patricia, Cristián, Luz, Gise, Pepe y Carla, por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A mis amigos.

Quiero agradecer muy especialmente a Pepe Monte por haberme dedicado hasta último momento su esfuerzo y su tiempo para la presentación de este trabajo.

INDICE

Página

ABREVIATURAS.....5

CAPITULO I: INTRODUCCION

1. El sistema fagocítico mononuclear.....8
1.1. Origen y diferenciación de los fagocitos mononucleares.....8
1.2. Morfología de los fagocitos mononucleares.....13
1.3. Expresión de moléculas de superficie.....15
1.4. Funciones de los fagocitos mononucleares.....17
1.4.1. Quimiotaxis.....17
1.4.2. Fagocitosis y destrucción de microorganismos.....18
1.4.2.1. Reconocimiento y englobamiento.....18
1.4.2.2. Mecanismos microbicidas oxígeno dependientes.....19
1.4.2.3. Mecanismos microbicidas oxígeno independientes.....24
1.4.3. Procesamiento y presentación antigénica.....25
1.4.4. Actividad secretoria.....26
2. Fusión fagolisosomal.....28
3. Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).....32
3.1. Epidemiología de la infección por HIV.....32
3.2. Etiopatogenia de la infección por HIV.....36
3.2.1. Estructura y replicación del HIV. Caracterización.....36
3.2.2. Infección primaria del HIV.....43
3.2.3. Latencia clínica.....46
3.2.4. Mecanismos inmunopatogénicos de la infección por HIV.....47
3.3. El sistema monocito-macrófago en la infección por HIV.....48
3.4. Diagnóstico de la infección por HIV.....50
3.5. Manifestaciones clínicas del SIDA.....52

3.6. SIDA pediátrico....56
3.6.1. Transmisión y progresión de la enfermedad....56
3.6.2. Diagnóstico de la infección por HIV en niños....57
3.6.3. Alteraciones inmunológicas en el SIDA pediátrico....59
4. La talasemia mayor....61
4.1. Aspectos patofisiológicos y clínicos....61
4.2. Criterios para el diagnóstico de β-talasemia....63
4.3. Alteraciones inmunológicas en los pacientes con talasemia mayor....64
4.4. Terapia con agentes quelantes de hierro....65
5. Objetivos....67
5.1. Objetivo general....67
5.2. Finalidades específicas....67

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

1. Grupos experimentales....69
1.1. Pacientes infectados con el HIV....69
1.2. Pacientes con talasemia mayor....69
1.3. Controles normales....70
2. Metodología....73
2.1. Obtención de leucocitos mononucleares a partir de sangre periférica....73
2.2. Aislamiento y cultivo de monocitos....73
2.3. Demostración de alfa naftil acetato esterasa....73
2.4. Estudio de la fusión fagolisosomal....74
2.4.1. Preparación de las partículas de levaduras....75
2.5. Estudio de la capacidad fagocítica y lítica....75
2.6. Estudio de las poblaciones linfocitarias....76
2.6.1. Detección de antígenos de membrana con anticuerpos monoclonales....76

2.6.2. Formación de rosetas E 4°C....76
2.7. Detección de la infección por HIV por PCR....77
2.7.1. Preparación de las muestras para la amplificación del ADN....77
2.7.2. Amplificación del ADN por PCR....77
2.7.3. Marcación de oligonucleótidos por fosforilación....78
2.7.4. Técnica de hibridización líquida....78
2.7.5. Electroforesis en geles de agarosa....79
2.7.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida....79
2.8. Cultivo de linfocitos para aislamiento viral....79
2.9. Determinación de la concentración de antígeno viral p24....80
2.10. Tratamiento con la glicoproteína de envoltura recombinante gp120 del HIV-1....80
2.11. Tratamiento con la proteína regulatoria recombinante tat del HIV-1....80
2.12. Tratamiento de los monocitos periféricos con hierro....81
2.13. Tratamiento de los monocitos periféricos con deferoxamina....81
2.14. Determinación de los niveles séricos de ferritina....81
2.15. Determinación de los niveles séricos de vitamina E....81
2.16. Determinación de malondialdehído....82
2.17.Tratamiento de los monocitos periféricos con un medio generador de radicales libres de oxígeno....82
3. Análisis estadístico de los resultados....83

CAPITULO III: RESULTADOS

1. Fusión fagolisosomal en la infección por HIV....84
1.1. Estudio de la fusión fagolisosomal en pacientes adultos infectados con el HIV....84
1.2. Evaluación de la fusión fagolisosomal en niños infectados con el HIV....88

1.3. Efecto de la glicoproteína recombinante de envoltura del HIV-1 sobre la fusión fagolisosomal de monocitos periféricos normales....98
1.4. Efecto de la proteína regulatoria del HIV-1 Tat sobre la fusión fagolisosomal de monocitos circulantes normales....100
2. Fusión fagolisosomal monocítica en talasemia mayor....105
2.1. Estudio de la fusión fagolisosomal en pacientes con talasemia mayor....105
2.2. Efecto *in vitro* del hierro sobre la fusión fagolisosomal normal....110
2.3. Efecto *in vitro* de la deferoxamina sobre la fusión fagolisosomal....110
2.4. Evaluación de la fusión fagolisosomal en pacientes con talasemia mayor que reciben tratamiento quelante....113
2.5. Evaluación del estrés oxidativo en pacientes talasémicos....117
2.6. Efecto de los radicales libres de oxígeno sobre la fusión fagolisosomal normal....119

CAPITULO IV: DISCUSION

1. Fusión fagolisosomal monocítica en pacientes infectados con el HIV....121
2. Fusión fagolisosomal monocítica en pacientes con talasemia mayor....126
3. Conclusión final....132

CAPITULO V: BIBLIOGRAFIA....133

ABREVIATURAS

ADIV :	Adicción intravenosa
ADN :	Acido desoxirribonucleico
ANAE :	Alfa-naftil-acetato esterasa
ARC :	Complejo relacionado con el SIDA
ARN :	Acido ribonucleico
ATP :	Adenosín trifofato
CAT :	Catalasa
CDC :	Center for Disease Control
CFU-GM :	Unidad formadora de colonias grnulocítica-monocítica
CMV :	Citomegalovirus
CSFs :	Factores estimularites de colonias
DFX:	Deferoxamina
DS:	Desvío standard
EDTA :	Acido etilendiaminotetraacético
ELISA :	Enzimoinmunoensayo
Fc IgG :	Fracción cristalizable de las inmunoglobulinas
G-CSF :	Factor estimulante de colonias granulocíticas
GM-CSF :	Factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas
GRC :	Glógulos rojos de carnero

GSH-GP : Sistema glutatión-glutatión peroxidasa

Hb: Hemoglobina

HBSS : Solución salina balanceada de Hanks

HIV : Virus inmunodeficiencia humana

HLA : Antígeno de histocompatibilidad

HPLC : Cromatografía líquida de alta presión

IFI : Inmunofluorescencia indirecta

IFN : Interferón

IL : Interleuquina

LTB4 : Leucotrieno B4

M-CSF : Factor estimulante de colonias monocíticas

MDA : Malondialdehído

MPO : Mieloperoxidasa

NA : Naranja de acridina

NADPH : Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido

NBT : Azul de tetrazolium

NO : Oxido nítrico

NOS : Oxido nítrico sintetasa

OMS : Organización Mundial de la Salud

PAS : Acido periódico-Schiff

PBS : Buffer fosfato salino

PCR : Reacción en cadena de la polimerasa

PGE2:	Prostaglandina E2
PHA :	Fitohemaglutinina
PK :	Proteinasa K
PMA :	Forbol miristato acetato
PWM :	Pokeweed mitogen
SBF:	Suero bovino fetal
SIDA:	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
SOD :	Superóxido dimutasa
TAE :	Tris-Acetato EDTA
TBA :	Acido 2-tiobarbitúrico
TBE :	Tris-Borato EDTA
TNF :	Factor de necrosis tumoral

INTRODUCCION

CAPITULO I

1. EL SISTEMA FAGOCITICO MONONUCLEAR

Los macrófagos constituyen las células más diferenciadas del sistema fagocítico mononuclear. Este sistema está compuesto por los monoblastos y promonocitos de médula ósea, los monocitos de sangre periférica y los macrófagos tisulares. Los macrófagos se encuentran ampliamente distribuídos por todo el organismo, principalmente en los órganos linfoides, el hígado, los pulmones, el tracto gastrointestinal, el sistema nervioso central, el hueso, las cavidades sinoviales y la piel, participando en un amplio rango de procesos tantos fisiológicos como patológicos (Auwerx, 1991). Estas células juegan un papel fundamental en la integridad de la defensa del huésped, ya que participan en el inicio de la respuesta inmune como células presentadoras de antígeno y en la fase efectora como células inflamatorias, microbicidas y tumoricidas, como así también en la regulación de la respuesta inmune.

1.1. Origen y diferenciación de los fagocitos mononucleares

Los macrófagos se originan en médula ósea. En el hombre, la médula ósea contiene tanto macrófagos residentes como sus precursores: monocitos, promonocitos y monoblastos (Figura 1). Los monocitos y los neutrófilos se originan a partir de un precursor común presente en médula ósea que recibe el nombre de unidad formadora de colonias granulocítica-monocítica (CFU-GM) por su capacidad de originar colonias de monocitos o neutrófilos en cultivos semi-sólidos de médula (Metcalf,1971).

Los monoblastos son las células más inmaduras del sistema fagocítico mononuclear. Esto se refleja en su morfología y ultraestructura. Los monoblastos son positivos para lisozima y esterasas inespecíficas, aunque estas enzimas se encuentran en pequeña cantidad. Todos los monoblastos expresan en su membrana receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (Fc IgG) y son capaces de fagocitar

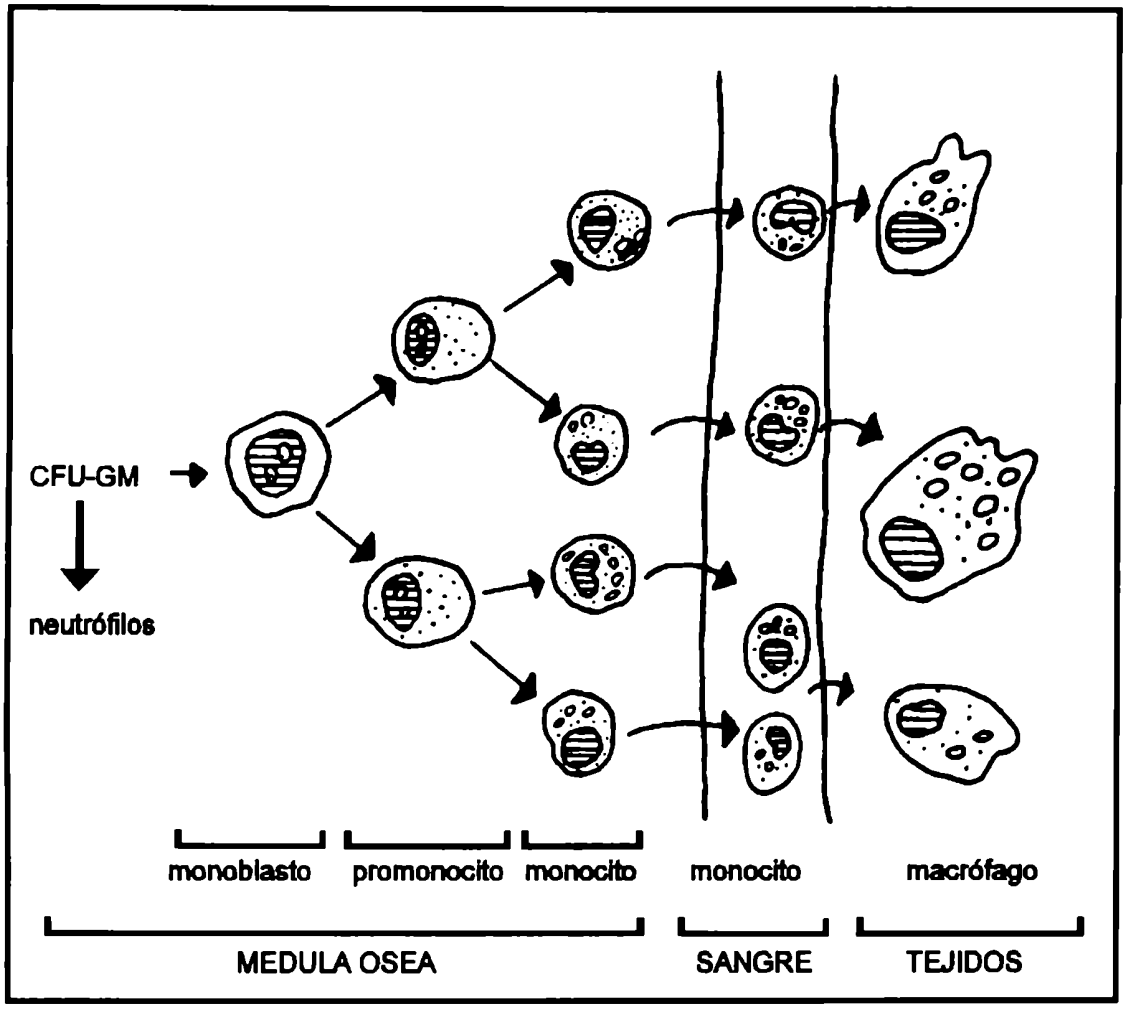

FIGURA I.1. El sistema fagocítico mononuclear (tomado de Auger & Ross, 1992).

glóbulos rojos recubiertos por IgG, pero rara vez fagocitan bacterias opsonizadas (Figura 2). Los monoblastos dan origen a los promonocitos que son los precursores directos de los monocitos. Los promonocitos son positivos para lisozima, esterasas inespecíficas y también peroxidasa. Expresan receptores para IgG, para el fragmento derivado de la activación del complemento C3b y pueden fagocitar glóbulos rojos recubiertos por IgG y bacterias opsonizadas (Auger & Ross, 1992).

Los promonocitos originan a los monocitos, que permanecen alrededor de 24 horas en la médula antes de ser volcados a circulación (Meuret & Hoffmann, 1973; Furth & Sluiter, 1986). En un individuo adulto normal el porcentaje de monocitos circulantes oscila entre 1 y 6% del total de leucocitos y raramente excede el 10%. El número absoluto de monocitos entonces se encuentra en una rango de 300-700 por microlitro de sangre. La vida media de los monocitos sanguíneos es de aproximadamente 72 horas (Auger & Ross, 1992). Luego, en ausencia de un proceso inflamatorio, emigran a los tejidos por un fenómeno aparentemente aleatorio. Allí se diferencian a macrófagos adoptando distintas características morfológicas e incluso funcionales de acuerdo al tejido donde se han localizado, en respuesta a estímulos específicos del órgano en el que residen, y permanecen como macrófagos tisulares durante varios meses (Tabla 1) (Johnston, 1988).

La producción, diferenciación y maduración de las células del sistema fagocítico mononuclear están controladas por factores de crecimiento hematopoyéticos conocidos como factores estimulantes de colonias (CSFs). Los CSFs son glicoproteínas producidas por una amplia variedad de células como fibroblastos, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. Los CSFs más importantes son: el factor estimulante de colonias granulocítica-monocítica (GM-CSF), el factor estimulante de colonia granulocítica (G-CSF), el factor estimulante de colonia monocítica (M-CSF) y la interleuquina 3 (IL-3). La mayoría de las células progenitoras como así también las células maduras del sistema fagocítico mononuclear expresan en su membrana plasmática receptores para los CSFs. Los niveles de estos factores reguladores son normalmente bajos, pero su síntesis aumenta rápidamente y en forma marcada en un proceso inflamatorio, provocando un

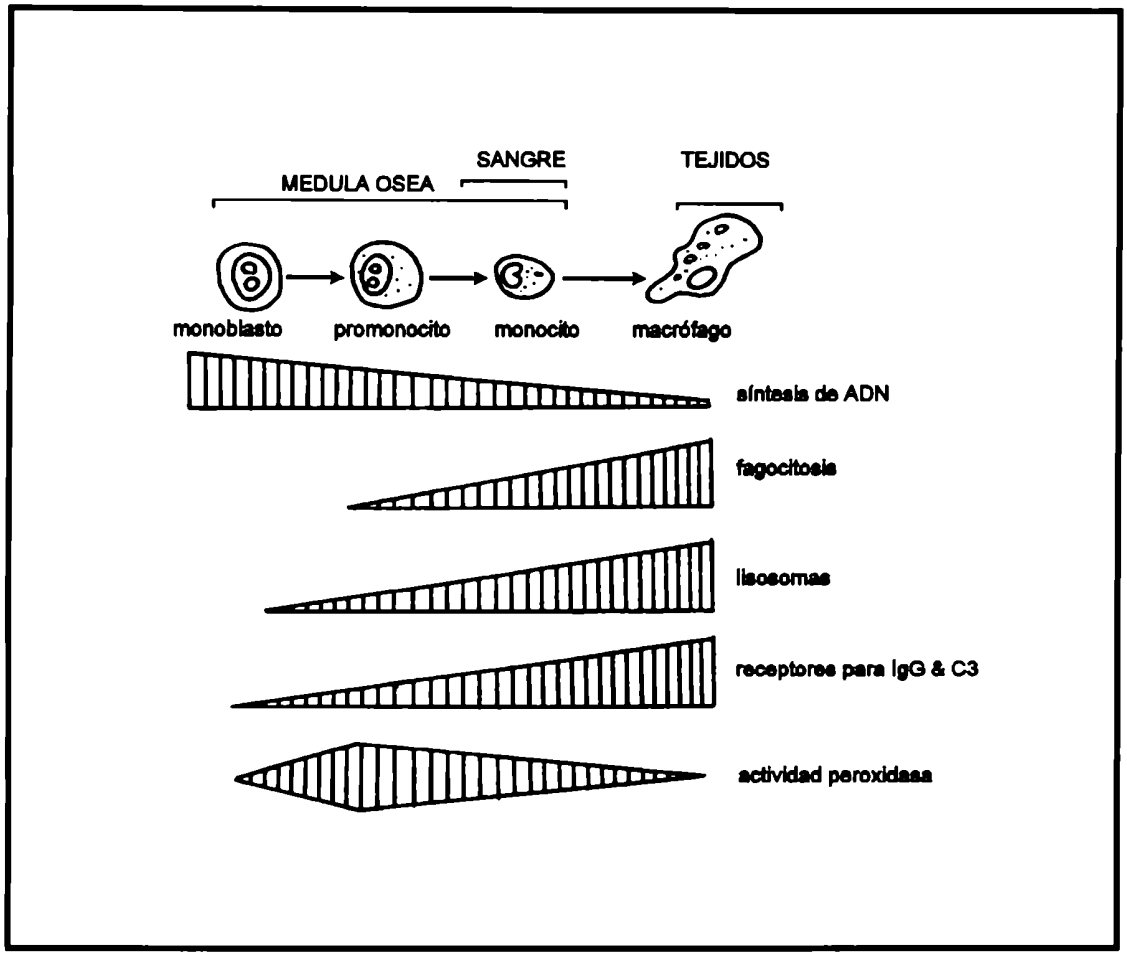

FIGURA I.2. Características de las células fagocíticas mononucleares, en función del desarrollo de la capacidad fagocítica, presencia de lisosomas, marcadores de membrana y actividad peroxidasa (tomado de Auger & Ross, 1992).

TABLA I.1. Distribución de los fagocitos mononucleares.

Médula ósea
monoblastos
promonocitos
monocitos
macrófagos
Sangre periférica
monocitos
Tejidos
hígado (células de Kupffer)
pulmones (macrófagos alveolares)
tejido conectivo (histiocitos)
bazo (macrófagos de la pulpa roja)
nódulos linfáticos
timo
hueso (osteoblastos)
tejido linfoide asociado a mucosas
tejido sinovial (células de tipo A)
tracto gastrointestinal
tracto genitourinario
órganos endócrinos
sistema nervioso central (células de la microglía)
piel (histiocitos/ células de Langerhans)
Cavidades
macrófagos pleurales
macrófagos peritoneales

aumento en la producción de fagocitos mononucleares (Sieff, 1987). Los macrófagos producen y secretan al menos dos tipos de factores hematopoyéticos, M-CSF y GM-CSF, en respuesta a estímulos externos como partículas fagocitables y endotoxina (Thorens *et al*, 1987). También liberan citoquinas que inducen en las células no hematopoyéticas la producción de M-CSF y GM-CSF. La liberación de IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF) por parte de los macrófagos inducen en los fibroblastos y en las células endoteliales la producción de M-CSF y GM-CSF que estimulan la generación de fagocitos mononucleares (Bagby *et al*, 1986; Broudy *et al*, 1986; Munker *et al*, 1986) (Figura 3). La producción y la actividad de los fagocitos mononucleares también pueden estar influenciadas por factores liberados por los linfocitos T, como GM-CSF e IL-3. Aparentemente el GM-CSF y la IL-3 cumplen un papel más importante en la regulación de la producción de fagocitos mononucleares durante los procesos inflamatorios, mientras que el M-CSF estaría vinculado a la monocitogénesis en el estado basal (Auger & Ross, 1992).

1.2. Morfología de los fagocitos mononucleares

Los macrófagos son células de forma irregular, de 25-50 μm de diámetro. Generalmente presentan un núcleo redondeado excéntrico y un citplasma abundante (Douglas & Hassan, 1990). En el citoplasma se encuentra un gran número de gránulos que pueden diferenciarse en dos poblaciones funcionalmente diferentes (Nichols & Bainton, 1973). Los lisosomas primarios, análogos a los gránulos azurófilos de los neutrófilos, contienen una amplia variedad de hidrolasas ácidas (catepsina D, catepsina G, elastasa, colagenasa, fosfatasa ácida), lisozima, diversas proteínas catiónicas antimicrobianas y mieloperoxidasa (MPO), que es la enzima crítica en la conversión de peróxido de hidrógeno en ácido hipocloroso. Los promonocitos de médula ósea y los monocitos circulantes poseen gránulos con MPO, mientras que los macrófagos carecen de ella. El contenido de la segunda población de gránulos no ha sido completamente

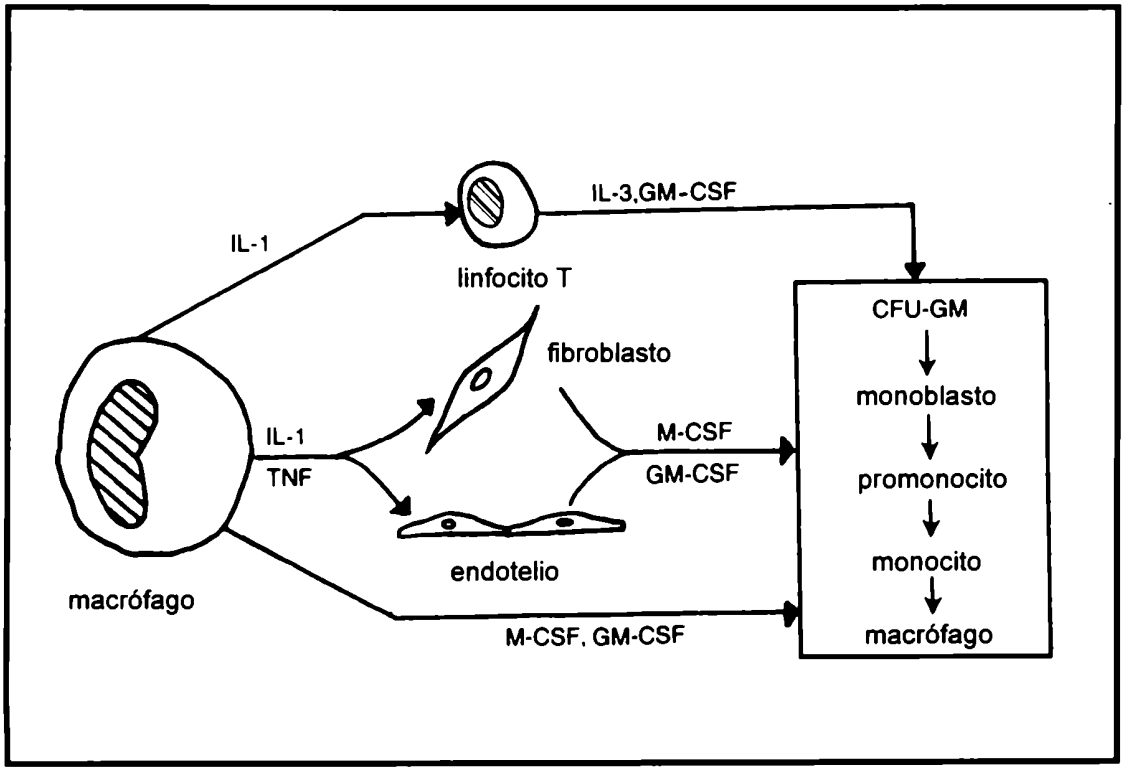

FIGURA I.3. Regulación humoral de la monocitopoyesis (tomado de Auger & Ross, 1992).

identificado, pero carece de fosfatasa ácida y en un sentido estricto no pueden considerarse análogos a los gránulos secundarios o específicos de los neutrófilos.

Los monocitos son células más pequeñas, de 12-15 μm de diámetro, con un núcleo excéntrico que ocupa aproximadamente el 50% del área celular. Los promonocitos tienen un tamaño intermedio entre los monoblastos y los monocitos y se caracterizan por la presencia de gránulos azurófilos maduros e inmaduros y un núcleo de forma irregular. Por último, el monoblasto resulta indistinguible del mieloblasto por microscopía óptica y en muestras de médula ósea normales se encuentran en un número muy bajo (Auger & Ross, 1992).

Desde el punto de vista histoquímico, se ha podido identificar en los macrófagos y monocitos la actividad de diferentes enzimas como fosfatasa alcalina, β-glucuronidasa, *N*-acetilglucosaminidasa, lisozima, α-naftil butirato esterasa y peroxidasa. Los monocitos se tiñen débilmente con la tinción de ácido periódico-Schiff (PAS) para polisacáridos y la tinción con Sudan black para lípidos. Los macrófagos son generalmente PAS negativos, pero luego de la fagocitosis pueden aparecer depósitos PAS positivos intracitoplasmáticos (Schmalzl & Braunsteiner, 1970). El marcador histoquímico más frecuentemente utilizado para el linaje monocito-macrófago es la esterasa no específica que se localiza en la superficie externa de la membrana plasmática de los monocitos y macrófagos (Yam *et al*, 1971).

1.3. Expresión de moléculas de superficie

Los macrófagos expresan en su membrana plasmática una amplia variedad de moléculas que estan involucradas en el crecimiento, diferenciación, activación, reconocimiento, endocitosis, migración y secreción, y que se resumen en la Tabla 2.

Los primeros receptores identificados en la superficie de los macrófagos fueron los receptores para la región Fc de la IgG y para factores derivados de la activación del complemento, como el fragmento C3b. Los receptores para la región Fc de la Igs están

TABLA I.2. Receptores presentes en la superficie de los monocitos y macrófagos.

Receptores para porción Fc IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_1, IgG_3, IgA, IgE
Receptores para complemento C3a, C3b, C3bi, C5a, C1q
Receptores para citoquinas MIF, MAF, LIF, CF, MFF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4 IFNα, IFNβ, IFNγ factores estimulantes de colonias (GM-CSF, M-CSF)
Receptores para péptidos y moléculas pequeñas histamina, vitamina D3 péptidos N-formilados encefalinas, endorfinas sustancia P vasopresina
Receptores para hormonas insulina, glucocorticoides, angiotensina
Receptores para transferrina y lactoferrina
Receptores para lipoproteínas y lípidos PGE2, LTB4, LTC4, LTD4, PAG apolipoproteínas B y E (quilomicrones remanentes y VLDL)
Receptores para factores de coagulación fibrinógeno/fibrina factor de coagulación VII antitrombina heparina
Receptores para fibronectina y laminina
Receptores para resiuos de carbohidratos (fucosa, manosa y galactosa)
Otros agonistas colinérgicos agonistas α1-adrenérgicos y β2-adrenérgicos

involucrados en diversas funciones celulares como la ingestión de partículas opsonizadas y de complejos inmunes, la secreción de productos como metabolitos del ácido araquidónico, derivados tóxicos del oxígeno y en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos. Dentro de este grupo de receptores se encuentran aquellos para IgG: Fcγ-RI (CD64) con alta afinidad por la IgG monomérica, Fcγ-RII (CDw32), Fcγ-RIII (CD16), ambos con baja afinidad por la IgG monomérica pero capaces de unir complejos inmunes eficientemente (Schreiber *et al*, 1992). Los macrófagos también expresan el receptor que une IgE con baja afinidad, Fcε-RIIb (CD23), luego de la inducción con IL-4. Dentro del grupos de receptores para los fragmentos derivados de la activación del complemento se encuentran: el CR1 para C3b (CD35), el CR2 para C3d (CD21) y los CR3 y CR4 para c3bi (CD11b y CD11c, respectivamente). Estas moléculas son capaces de unir partículas opsonizadas y bajo ciertas condiciones, pueden inducir la fagocitosis (Frank & Fries, 1991). Sin embargo, son incapaces de desencadenar otras funciones celulares como los Fcγ-Rc. La expresión en la membrana de los fagocitos de ambos tipos de receptores permite que actúen en forma coordinada, favoreciendo el proceso de ingestión.

1.4. Funciones de los fagocitos mononucleares

1.4.1. Quimiotaxis

La migración de los fagocitos está dirigida y orientada por un gradiente de concentración de factores quimiotácticos. La respuesta de los leucocitos a los factores quimiotácticos es vital para la defensa del huésped. En la superficie de los macrófagos se han podido identificar receptores para diferentes factores quimiotáticos incluídos los péptidos *N*-formilados, los productos de la activación del complemento tanto por la vía clásica como por la vía alterna C3a y C5a, y el leucotrieno B4 (LTB4) (Snyderman & Pike, 1984; Allen *et al*, 1988). La unión de los factores quimiotácticos a sus receptores gatillan mecanismos de señalización intracelular que conducen a la activación celular. Esto

permite la fijación de los fagocitos mononucleares a la superfice de las células endoteliales, cambios en la morfología celular debidos a los rearreglos que sufre el citoesqueleto y el movimiento a través del endotelio capilar hasta el sitio de la inflamación (Roitt, 1991).

1.4.2. Fagocitosis y destrucción de microorganismos

1.4.2.1. Reconocimiento y englobamiento

Los fagocitos, incluídos los pertenecientes al linaje monocito-macrófago y los neutrófilos, son por definición células dedicadas a la ingestión de partículas extrañas. Estas células actuan como primera línea de defensa contra los agentes agresores. Los neutrófilos son más eficientes como fagocitos, excepto cuando el tamaño de la partícula blanco es mucho mayor en relación al tamaño celular. Bajo esas circunstancias, los fagocitos mononucleares son más efectivos que los neutrófilos, y por ello desempeñan un papel fundamental en la defensa inmunológica del huésped durante la invasión de bacterias, virus, hongos y protozoarios (Nathan *et al*, 1980).

Los macrófagos alcanzan el foco infeccioso a través del proceso de quimiotaxis y engloban las partículas blanco. En una primera etapa, las partículas extrañas se fijan a la superficie de los fagocitos por interacción específica entre los factores séricos que las recubren y sus receptores expresados en la membrana plasmática (Johnston, 1988). Las opsoninas más estudiadas son la IgG y los fragmentos del complemento C3b y C3bi. Muchos microorganismos son capaces de activar el sistema del complemento por la vía altema generando así fragmentos que los recubren y opsonizan. La interacción entre glóbulos rojos opsonizados con complemento y sus receptores no es capaz de desencadenar la fagocitosis en ausencia de un segundo estímulo (Frank & Fries, 1991). En cambio, la interacción a través de los receptores para la porción Fc de las Igs promueve no sólo la adhesión sino también la ingestión de las partículas. Por otra parte,

puede ocurrir que los microorganismos se adsorban a la superficie de los fagocitos sin que exista opsonización, a través de la interacción de receptores inespecíficos como el receptor de fucosa-manosa con residuos de carbohidratos (Lund-Johansen *et al*, 1992).

El proceso de ingestión se inicia mediante la extensión de pseudopodos que rodean la partícula blanco, formando el fagosoma. Los macrófagos ingieren suficientes partículas como para internalizar aproximadamente el 40% de la membrana plasmática. Los componentes adicionales de la membrana plasmática provienen de reservas intracelulares que alcanzan para aumentar hasta dos veces la superfice celular y que son consumidas durante el proceso de ingestión (Silverstein *et al*, 1989).

1.4.2.2. Mecanismos microbicidas oxígeno-dependientes

Los mecanismos microbicidas oxígeno-dependientes incluyen la producción de intermediarios reactivos del oxígeno por medio del estallido respiratorio y la generación de intermediarios reactivos del nitrógeno a partir de arginina (Reiner, 1994) (Tabla 3).

El estallido respiratorio es el conjunto de cambios en el metabolismo del oxígeno que se generan por el contacto de la membrana de los fagocitos con distintos estímulos solubles o particulados como IgG agregada o productos derivados del complemento como los que se encuentran en el suero activado con zymosan (Goldstein & Weissmann, 1975; Babior, 1978). La activación de esta vía ocurre unos segundos después de la estimulación y se caracteriza por un abrupto aumento del consumo de oxígeno e incremento en la oxidación de la glucosa por la vía de las pentosas fosfato (De Chatelet, 1976). Como consecuencia de este proceso, se genera una cantidad suficiente de NADPH que permite la producción de metabolitos del oxígeno altamente tóxicos por acción inicial del la NADPH oxidasa. Esta enzima reduce el oxígeno molecular generando anión superóxido (O_2^-) del cual derivan otros productos de reducción parcial y excitación como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH^\bullet$), oxígeno singulete ($^1O_2$) (O'Brien, 1984; Babior, 1988). La formación de radical hidroxilo

TABLA I.3. Sistemas antimicrobianos de los macrófagos.

Sistema	Mecanismo
Oxígeno dependiente	
estallido respiratorio	ensamblaje y activación de la NADPH oxidasa
producción de óxido nítrico	catalizado por la óxido nítrico sintetasa NADPH-dependiente
Oxígeno independiente	
pH	acidificación de la vacuola
enzimas lisosomales	fusión fagolisosomal
secuestro de nutrientes	captura de hierro y degradación de triptofano
defensinas	permeabilización de membranas
otras proteínas antimicrobianas	???

requiere de hierro como catalizador. A continuación se detallan las reacciones de generación de estas especies reactivas:

$$O_2 + NADPH _ NADP^+ + O_2^-$$
$$2\ O_2^- + 2\ H^+ _ H_2O_2 + {}^1O_2$$
$$O_2^- + H_2O_2 _ OH^\bullet + OH^- + {}^1O_2$$

La NADPH oxidasa está formada por componentes citosólicos y componentes de membrana. El citocromo b558 es una proteína integral de membrana con dos subunidades: gp91 y p21. Cuando se activa, los componentes citoplasmáticos p47, p67 y Rac2, son translocados a la membrana donde se ensamblan con el citocromo b558 (Bastian & Hibbs, 1994; Chanock *et al*, 1994).

Además de su acción tóxica directa, la actividad microbicida oxígeno-dependiente está en parte mediada por mecanismos dependientes de mieloperoxidasa (MPO). La combinación de MPO, peróxido de hidrógeno y haluros genera productos altamente tóxicos que contribuyen a la destruccion de diversos microoganismos agresores (Nauseef, 1988).

$$H_2O_2 + Cl^- _ OCl^- + H_2O$$
$$OCl^- + H_2O _ {}^1O_2 + Cl^- + H_2O$$

En estas reacciones el cloruro puede ser sustituído por ioduro o bromuro. Sin embargo el cloruro es el reactivo favorecido ya que se encuentra presente en el fagolisosoma. El anión hipoclorito (OCl^-) tiene una alta capacidad oxidante, especialmente participa en la oxidación de aminas a cloroaminas. A pesar del potencial bactericida de este sistema, su rol en la protección contra infecciones es poco claro. Los pacientes con deficiencias de la MPO no parecen presentar un mayor riesgo de infección (Kitahara *et al*, 1981).

De los mecanismos descriptos anteriormente, los más importantes en los fagocitos mononucleares son los MPO independientes. Los promonocitos de médula ósea y los monocitos de sangre periférica poseen en el citoplasma gránulos que contienen MPO, mientras que los macrófagos carecen de ella (Ward *et al*, 1988). Los neutrófilos, que alcanzan el sitio de la infección antes de la aparición de los macrófagos, son células de vida media muy corta que contienen aproximadamente tres veces más MPO que los monocitos. Goren (1977) propuso que las células granulocíticas halladas en el lugar de la agresión durante el curso de la inflamación serían la principal fuente de MPO para los macrófagos *in vivo*. Leung y Goren (1989) demostraron *in vitro* que macrófagos murinos endocitan polimorfonucleares fijados o gránulos derivados de ellos, ambos ricos en MPO, y que aparentemente son capaces de utilizarla. La MPO ingerida queda retenida dentro de vacuolas en el citoplasma de los macrófagos. Al incubar estas células con levaduras opsonizadas, se observa que la MPO adquirida es volcada a los fagosomas.

Hasta 1987 el único mecanismo bioquímico inducible que explicaba la citotoxicidad de los macrófagos activados era la síntesis de intermediarios reactivos del oxígeno por la NADPH oxidasa. En los ultimos años se ha identificado al óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) como un potente mediador multifuncional producido por la mayoría de las células del organismo (Moncada, 1992). El $NO^{\cdot}$ se genera a partir de la L-arginina por acción de la $NO^{\cdot}$ sintetasa. Esta enzima existe al menos en dos formas: una es calcio y calmodulina dependiente y se expresa en forma constitutiva en las células endoteliales, y la otra es independiente de calcio y calmodulina y cuando se induce, produce grandes cantidades de $NO^{\cdot}$, especialmente en los macrófagos (Mülsch, 1991; Xie & Nathan, 1994).

La síntesis de NO genera otros intermediarios reactivos del nitrógeno como dióxido de nitrógeno y peroxinitrito. Se han identificado tres isoformas de NO sintetasa (NOS): la eNOS (endotelial), la nNOS (neuronal) y la iNOS (inducible). Mientras que las dos primeras se expresan en forma constitutiva, la iNOS es inducible generando grandes cantidades de NO cuando se activa (Nathan & Xie, 1994). La generación de grandes cantidades de $NO^{\cdot}$ tiene un efecto altamente tóxico, constituyendo así un mecanismo importante en la destrucción de parásitos intracelulares como *Leishmania major* (Green *et al*, 1990; Maüel

et al, 1991), *Toxoplasma gondii* (Adams *et al*, 1990; Denicola *et al*, 1993) y *Cryptococcus neoformans* (Granger *et al*, 1990).

Es importante destacar que la actividad de la NADPH oxidasa se expresa principalmente en los fagocitos mientras que la iNOS puede inducirse en casi todas las células nucleadas incluyendo hepatocitos, fibroblastos, macrófagos y neutrófilos (Murray & Teitelbaum, 1992; Denis, 1994). Esta diferencia refleja la especificidad en la función de cada una de ellas. La NADPH oxidasa es responsable de la defensa contra patógenos extracelulares accesibles a los fagocitos en los fagosomas. La iNOS, en cambio, está involucrada en la defensa contra microorganismos que proliferan en un ambiente intracelular (Bastian & Hibbs, 1994). La actividad de ambas enzimas puede inducirse en los macrófagos, pero la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno no es simultánea y se regula en forma diferente (Ding *et al*, 1988).

Los intermediarios reactivos del oxígeno, también llamados radicales libres de oxígeno son moléculas altamente reactivas, capaces de modificar y dañar lípidos de membranas biológicas, ácidos nucleicos y proteínas. Un radical libre es una molécula que posee en su último orbital un electrón no apareado y en este estado inestable posee una gran tendencia a interactuar con electrones de moléculas vecinas para formar el par. Esto ocasiona que otra molécula quede desapareada en su último orbital convirtiéndose en radical libre y generando una peligrosa reacción en cadena. Dado que son aceptores de electrones también se los considera oxidantes. El aumento en los niveles de radicales libres de oxígeno, causados por un aumento en su producción o por una falla en las moléculas que los controlan pueden generar un severo daño celular y tisular. Organelas como las mitocondrias y las membranas microsomales son muy susceptibles a la peroxidación lipídica inducida por radicales libres.

Evidentemente si los radicales libres de oxígeno han sido involucrados en el metabolismo celular normal y en procesos patológicos como mutagénesis, carcinogénesis, daños tisulares e inflamación, existen, en los organismos aeróbicos, distintas moléculas que regulan su producción. Los principales constituyentes del sistema antioxidante en estos organismos se pueden dividir en: a) un sistema enzimático donde las superóxido

dismutasas (SODs) eliminan los aniones superóxido, convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, la catalasa (CAT) que elimina el peróxido de hidrógeno producido y el sistema glutatión-glutatión peroxidasa (GSH-GP) que elimina tanto peróxidos de hidrógeno como los peróxidos orgánicos; b) sustancias que protegen de la acción tóxica de los radicales libres de oxígeno, llamadas antioxidantes, que pueden ser moléculas como las vitaminas C, A, E y K, selenio, compuestos con grupos tiol como cisteína, cisteamina o glutatión, metionina, ubiquinona, ácido úrico, glucosa y los aminoácidos en general. Estos antioxidantes pueden ejercer su acción en distintas fases del proceso oxidativo. En particular, la vitamina E interfiere en los procesos iniciales de la peroxidación lipídica, actuando como "secuestradora" de los radicales libres (revisado por Monte & Lustig, 1994).

1.4.2.3. Mecanismos microbicidas oxígeno-independientes

Los mecanismos oxígeno-independientes abarcan diferentes procesos que se resumen en la Tabla 3. En la fase inicial, los gránulos citoplasmáticos se fusionan con el fagosoma formando el fagolisosoma, con posterior descarga del contenido granular (Lehrer *et al*, 1988). Los lisosomas contienen una batería de enzimas hidrolíticas que actúan a pH ácido, capaces de degradar lípidos, polisacáridos y proteínas. Poseen también lisozima que ataca el peptidoglicano de la pared bacteriana, proteínas catiónicas y mieloperoxidasa (Boxer & Smolen, 1988). Las proteínas catiónicas son capaces de destruir bacterias Gram positivas y Gram negativas y pueden actuar aún en un ambiente anaeróbico. Su actividad óptima la alcanzan a un pH 7-8 y su forma de acción sería a través de la permeabilización de las membranas bacterianas (Sawyer *et al*, 1988; Lehrer *et al*, 1989). Los componentes granulares se encuentran presentes en forma constitutiva y no requieren de la activación de los macrófagos ni de la estimulación del estallido respiratorio para ejercer su acción bactericida (Ganz *et al*, 1986).

1.4.3. Procesamiento y presentación antigénica

Los macrófagos, junto con los linfocitos B y las células dendríticas, son células que tienen toda la maquinaria necesaria para procesar antígenos proteicos y presentarlos a los linfocitos T en el contexto del HLA de clase II. Los macrófagos endocitan el antígeno nativo solo o asociado a anticuerpos y complemento. Luego de la captación, el antígeno es procesado en el interior de la célula y los productos de ese procesamiento son reciclados a la superficie celular asociados con el HLA de clase II donde serán reconocidos por los linfocitos T CD4+. Sin embargo, el antígeno procesado puede aparecer en membrana asociado también a moléculas del HLA de clase I, y en ese caso será reconocido por los linfocitos T CD8+ (Auger & Ross, 1992) .

Existen dos vías diferentes para el procesamiento antigénico: la vía exógena o endocítica y la vía endógena o biosintética. Luego de la endocitosis del antígeno, los endosomas se fusionan con los lisosomas que contienen una serie de enzimas hidrolíticas. Estas enzimas son las encargadas del clivaje proteolítico de los antígenos. Los endosomas intercambian luego membranas con las vesículas del aparato de Golgi que contienen moléculas de HLA de clase II recién sintetizadas, en camino a la superfice celular. Allí ocurriría la unión de los péptidos a las moléculas de clase II. Esta vía de procesamiento exógena o endocítica es la utilizada para la presentación de antígenos proteicos, microorganismos muertos y algunos virus. El procesamiento para la presentación de péptidos con moléculas de clase I tiene características distintas a las recién descriptas y ocurre por la vía endógena o biosintética. En general se acepta que mientras las moléculas de clase II presentan péptidos derivados de proteínas exógenas, las moléculas de clase I presentan péptidos derivados de proteínas sintetizadas por la célula (Fainbom & Satz, 1992).

Una vez que el antígeno ha sido procesado, es presentado en la membrana del macrófago junto al HLA. El linfocito T a través de su receptor reconoce el complejo antígeno-HLA. Esta interacción es necesaria pero no suficiente; se requiere una segunda señal para la activación del linfocito. La presencia de IL-1 secretada por los macrófagos

estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos T a células efectoras mediante la inducción de la expresión de receptores para IL-2 y la producción de IL-2.

1.4.4. Actividad secretoria

Los fagocitos mononucleares secretan una gran variedad de sustancias biológicamente activas, cuyo tamaño varía desde moléculas muy pequeñas como el anión superóxido (32 kDa) hasta moléculas extremadamente grandes como la fibronectina (440000 kDa) y cuya función va desde la inducción del crecimiento hasta la muerte celular. La actividad secretoria incluye aquellas moléculas secretadas al medio externo como así también las vertidas a las vesículas fagosómicas. Dentro de los productos de secreción se encuentran una gran variedad de enzimas (hidrolasas ácidas, proteasas neutras, lipasas y arginasa), inhibidores enzimáticos y de la actividad de citoquinas, componentes del complemento pertenecientes tanto a la vía clásica como a la alterna, intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno, metabolitos derivados del ácido araquidónico, factores que participan en el proceso de coagulación, componentes de la matriz extracelular y citoquinas. A través de la secreción de diferentes citoquinas (Tabla 4) y otros compuestos inmunomodulatorios, los macrófagos desempeñan un papel fundamental en el inicio y control de la respuesta inmune (Auger & Ross, 1992).

TABLA I.4. Citoquinas producidas por los macrófagos.

Citoquina	Estímulo para su producción
IFN α	virus, bacterias
M-CSF	LPS, IL-1
GM-CSF	LPS, IL-1, TNF, infección con retrovirus
G-CSF	LPS, IL-1
TNFα	LPS, otros agentes microbianos, IL-1, IL-2, GM-CSF
IL-1	productos microbianos, IL-2, GM-CSF, TNF, presentación del antígeno
IL-6	IL-1, TNF, PDGF
TGFβ	-----
PDGF	trombina, porceso de coagulación, LPS, lectinas, zymosan
EGF	-----
FGF, HBGF, MDGF	-----

PDGF, platelet-derived growth factor; EGF, epidermal growth factor; FGF, fibroblast growth factor; HBGF, heparin-binding growth factor; MDGF, macrophage-derived growth factor.

2. FUSIÓN FAGOLISOSOMAL

El proceso de fusión de los gránulos citoplasmáticos o lisosomas con el fagosoma recibe el nombre de fusión fagolisosomal. Este proceso es una etapa crítica en la destrucción de invasores intracelulares.

Los lisosomas se caracterizan por su bajo pH, que es mantenido por una bomba de protones ATP-dependiente (Docherty *et al*, 1983). Las bombas de protones ATP-dependientes de tipo V (vacuolar) son componentes integrales presentes en las membranas de varias organelas intracelulares tanto en animales como en plantas. El pH ácido generado en el interior de estos compartimentos es crucial en la regulación de diferentes funciones como la disociación de complejos ligando-receptor, tráfico de proteínas y solutos, y la hidrólisis de macromoléculas (Lukacs *et al*, 1991). Si bien estas moléculas no son estrictamente idénticas entre sí, son las responsables de mantener el pH luminal de diversas organelas en un rango que varía entre 4.5 y 7 de acuerdo al compartimento. Lukacs *et al* (1990) demostraron en macrófagos murinos, que la acidificación de la vacuola fagosómica que sigue al proceso de fagocitosis está mediada por una bomba de protones ATP-dependiente de tipo V.

El evento de fagocitosis es considerado una forma especializada de la endocitosis. En los macrófagos, la internalización de partículas fagocitadas es seguida de un complejo proceso de maduración que involucra el tráfico de membranas y proteínas entre los fagosomas, endosomas y lisosomas (Desjardins *et al*, 1994). Este proceso resulta aparentemente crucial en la formación del fagolisosoma. Mayorga *et al* (1991) demostraron que la fusión entre fagosomas y endosomas precede la fusión fagolisosomal. Por su parte, Pitt *et al* (1992) propusieron un modelo para explicar la maduración de los fagosomas que culmina en la formación del fagolisosoma, similar al mecanismo de maduración de los endosomas. Ambos procesos se esquematizan en la Figura 4.

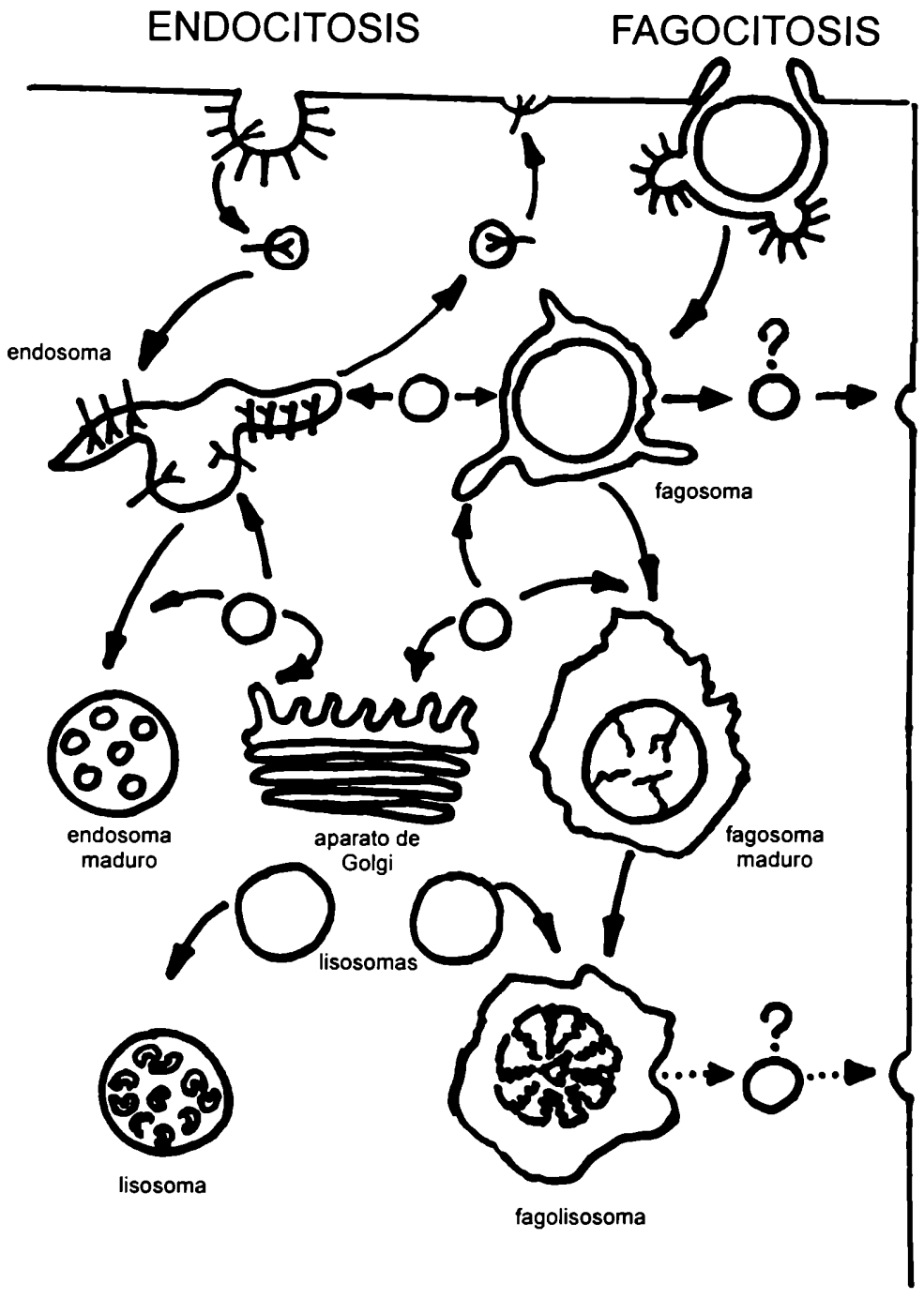

FIGURA I.4. Proceso de maduración de los endosomas y fagosomas (tomado de Pitt *et al*, 1992).

Para la formación del fagolisosoma se requiere el contacto entre las membranas de ambas organelas. La energía de interacción entre ambas membranas es la resultante de fuerzas de atracción y repulsión. En general, las fuerzas electroestáticas tienden a mantener las membranas separadas, mientras que las fuerzas de London y de Van der Waals favorecen el contacto. El segundo paso, de inducción, requeriría la liberación de calcio y ATP de las membranas que provocan una mayor movilidad de los lípidos, un aumento en la permeabilidad y una reducción en la resistencia eléctrica de la membrana. En esta etapa la fusión es posible mediante la formación de uniones estables entre las macromoléculas de las membranas en contacto (Poste & Allison, 1973; Rand, 1986).

El proceso de fusión fagolisosomal ha sido extensamente caracterizado en macrófagos murinos a través de técnicas de microscopía óptica y electrónica, usando marcadores que se concentran fundamentalmente en los lisosomas. Kielian & Cohn (1980) demostraron que la fusión fagolisosomal es dependiente de la temperatura: el proceso se inhibe a temperaturas menores de 15°C y dicha inhibición se revierte al incubar las células a 37°C. A la vez, observaron que la fusión no se afecta por el tamaño o el número de partículas fagocitadas, pero en cambio aumenta con el tiempo de cultivo y el pretratamiento de las células con forbol miristato acetato (PMA) (Kielian & Cohn, 1981a y 1981b). Esto último sugiere la asociación del proceso de fusión fagolisosomal con un aumento en la concentración de calcio citosólico libre.

Algunos patógenos intracelulares evaden la respuesta inmune del huésped a través de diferentes mecanismos vinculados con la fusión fagolisosomal. Microorganismos como *Mycobacterium tuberculosis* (Armstrong & D'Arcy Hart, 1975; Goren *et al*, 1976), *Legionella pneumophila* (Horwitz, 1983), *Toxoplasma gondii* (Goren, 1977), *Histoplasma capsulatum* (Taylor *et al*, 1989) y *Coccidioides immitis* (Beaman *et al*, 1983), impiden la fusión de los lisosomas con las vacuolas que los contienen. En el caso particular de *M. tuberculosis* se han propuesto dos factores responsables de inhibir la fusión fagolisosomal: por un lado, la presencia en la pared de un grupo de moléculas de alto peso molecular, sulfolípidos fuertemente ácidos (Goren *et al*, 1976), y por el otro, una alta concentración de amonio

como la que se libera al medio en cultivos de *M. tuberculosis* (Goren, 1977; Gordon *et al*, 1980).

La alteración de la fusión fagolisosomal por agentes patógenos llevó a la identificación de sustancias lisosomotrópicas polianiónicas que bloquean el proceso de fusión. Los primeros estudios (D'Arcy Hart & Young, 1975; Goren *et al*, 1976; D'Arcy Hart *et al*, 1979; Geisow *et al*, 1980; Kielian & Cohn, 1982a y 1982b) demostraron que sustancias como suramina, dextran sulfato y ácido poliglutámico, secuestrados en los lisosomas secundarios de macrófagos murinos, inhibían casi totalmente la fusión fagolisosomal. Estudios posteriores demostraron que al menos los agentes polianiónicos no inhiben la fusión fagolisosomal sino que retienen los marcadores dentro de los lisosomas, probablemente debido a su carácter coloidal, impidiendo su transferencia al fagolisosoma. Esta interpretación no se aplica a los sulfolípidos bacterianos, que no son hidrocoloides (Goren *et al*, 1987a y 1987b; Goren & Mor, 1990). Por otra parte, D'Arcy Hart *et al* (1983) observaron que agentes químicos conocidos por su efecto inhibitorio sobre la fusión fagolisosomal, provocan una disminución en los movimientos saltatorios de los lisosomas. Esto se traduce en una menor probabilidad de encuentro entre los fagosomas y los lisosomas, alterando el proceso de fusión. Los mismos autores observaron un efecto análogo en macrófagos murinos infectados con distintas cepas de micobacterias (D'Arcy Hart *et al*, 1987).

En nuestro laboratorio, comenzamos el estudio de la fusión fagolisosomal adaptando la técnica descripta por Kielian (1986) en macrófagos peritoneales de ratón para su evaluación en monocitos obtenidos de sangre periférica (Pittis *et al*, 1993). La puesta a punto de la técnica nos permitió realizar un análisis cuantitativo de dicha función en pacientes con patologías asociadas a inmunodeficiencias secundarias.

3. INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICENCIA HUMANA (HIV)

3.1. Epidemiología de la infección por HIV

Los primeros casos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fueron detectados en la ciudad de San Francisco a principios de los ochenta, si bien una búsqueda retrospectiva permitió identificar casos que habían ocurrido en la década de los setenta. En 1981 se reconoció la enfermedad como una nueva entidad. Estos casos se caracterizaban por presentar infecciones oportunistas, principalmente neumonía por *Pneumocystis carinii,* o tumores sólidos como el sarcoma de Kaposi, y por ocurrir básicamente en dos grupos de la población: varones homosexuales e individuos adictos a drogas por vía endovenosa. Esto último sugería que un agente infeccioso estaba involucrado como agente causante de la inmunodeficiencia.

El agente etiológico del SIDA se aisló en 1983 y se lo identificó como un retrovirus del subgrupo de los lentivirus, denominado virus de la inmunodeficiencia humana, HIV-1 (Barré -Sinoussi *et al*, 1983; Gallo *et al*, 1984). Recién en 1986 se llegó a identificar un segundo tipo de HIV, denominado HIV-2 (Clavel *et al*, 1986). Desde entonces hubo un progreso importante en el conocimiento de virus y su etiopatogenia. Sin embargo, el desafío del control y prevención de la infección permanece aún sin resolver.

En la actualidad, el SIDA se ha convertido en uno de los problemas de salud más serios y acuciantes a nivel mundial. Se calcula que el número de personas infectadas suma actualmente más de 15 millones en el mundo, y que para el año 2000, el número de personas infectadas oscilará entre 30 y 40 millones. Si bien la velocidad de diseminación de la enfermedad ha disminuído en los países más desarrollados, en los países en desarrollo está creciendo en forma acelerada. Desde el inicio de la pandemia y hasta el 30 de diciembre de 1994 se han notificado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) 1.025.073 casos de SIDA. Según estimaciones realizadas por la OMS hasta junio

de 1994 ya habrían alrededor de 4 millones de casos de SIDA en el mundo. La diferencia entre los casos notificados y los estimados reflejan un claro subregistro del número real de enfermos. La distribución porcentual de los casos notificados de SIDA a fines de 1994 se ilustra en la Figura 5.

Actualmente el número de mujeres y niños infectados está creciendo en forma vertiginosa. La transmisión del virus HIV de una madre infectada a su descendencia se está transformando en la causa líder de la diseminación en la población pediátrica. Epidemiológicamente, la infección con el HIV en mujeres ha tomado un rumbo donde la infección por el HIV en niños emerge como un alarmante problema en la salud mundial. La OMS estima que habría un total de 3-4 millones de mujeres infectadas con el HIV y que ya habrían nacido más de 1 millón de niños infectados, de los cuales aproximadamente la mitad habrían desarrollado SIDA o muerto. Más aún, se calcula que habría casi 2 millones de niños no infectados que son o serán huérfanos de padres con SIDA.

De acuerdo con los datos recogidos por el Ministerio de Salud y Acción Social (1995), la Argentina ocupa el segundo lugar después de Brasil en incidencia de casos de SIDA en América del Sur. Desde que se detectaron los primeros casos en 1982, la epidemia ha crecido en forma exponencial, llegando en la actualidad a 6.653 casos notificados. Teniendo en cuenta el retardo en la información, se estima que el número de enfermos ascendería a 9.486. Además debido al subregistro en la notificación, el número de enfermos es probablemente mayor.

La relación hombre/mujer en la Argentina no ha tenido cambios sustanciales en los últimos tres años (alrededor de 4/1). La edad media de los casos masculinos es de 31 años y en las mujeres desciende a 24 años. La Figura 6 representa los porcentajes de casos de SIDA en nuestro país de acuerdo al sexo y la edad.

La vía de contagio por adicción intravenosa (ADIV) ha adquirido mayor importancia, lo que permite observar un patrón epidemiológico diferente al de los primeros años de la aparición de la enfermedad. Para los años 1992-1995 los factores de riesgo: transmisión heterosexual, transmisión de la madre al hijo y ADIV, suman el 63%

Distribución mundial de los casos de SIDA

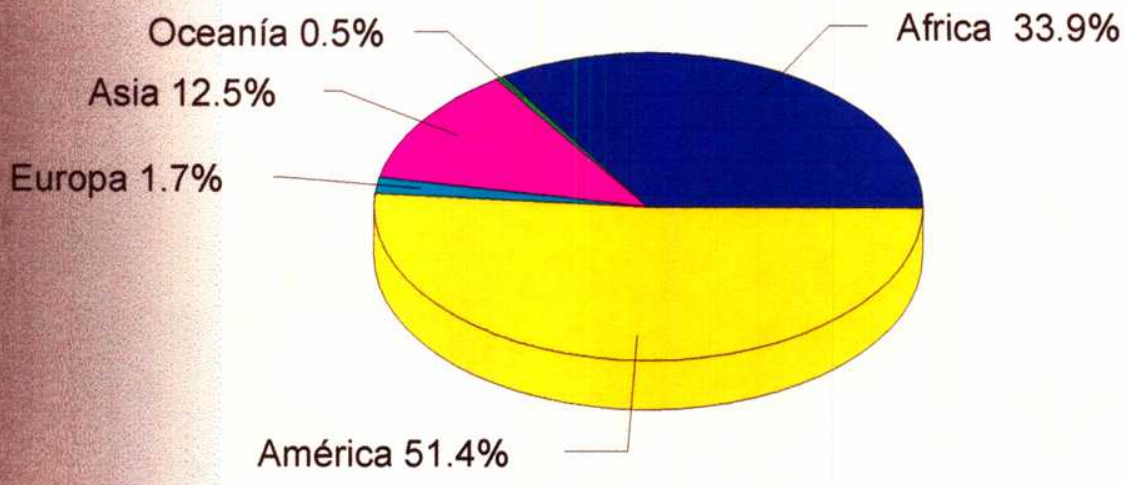

FIGURA I.5. Distribución porcentual de los casos de SIDA a nivel mundial (OMS, 1995).

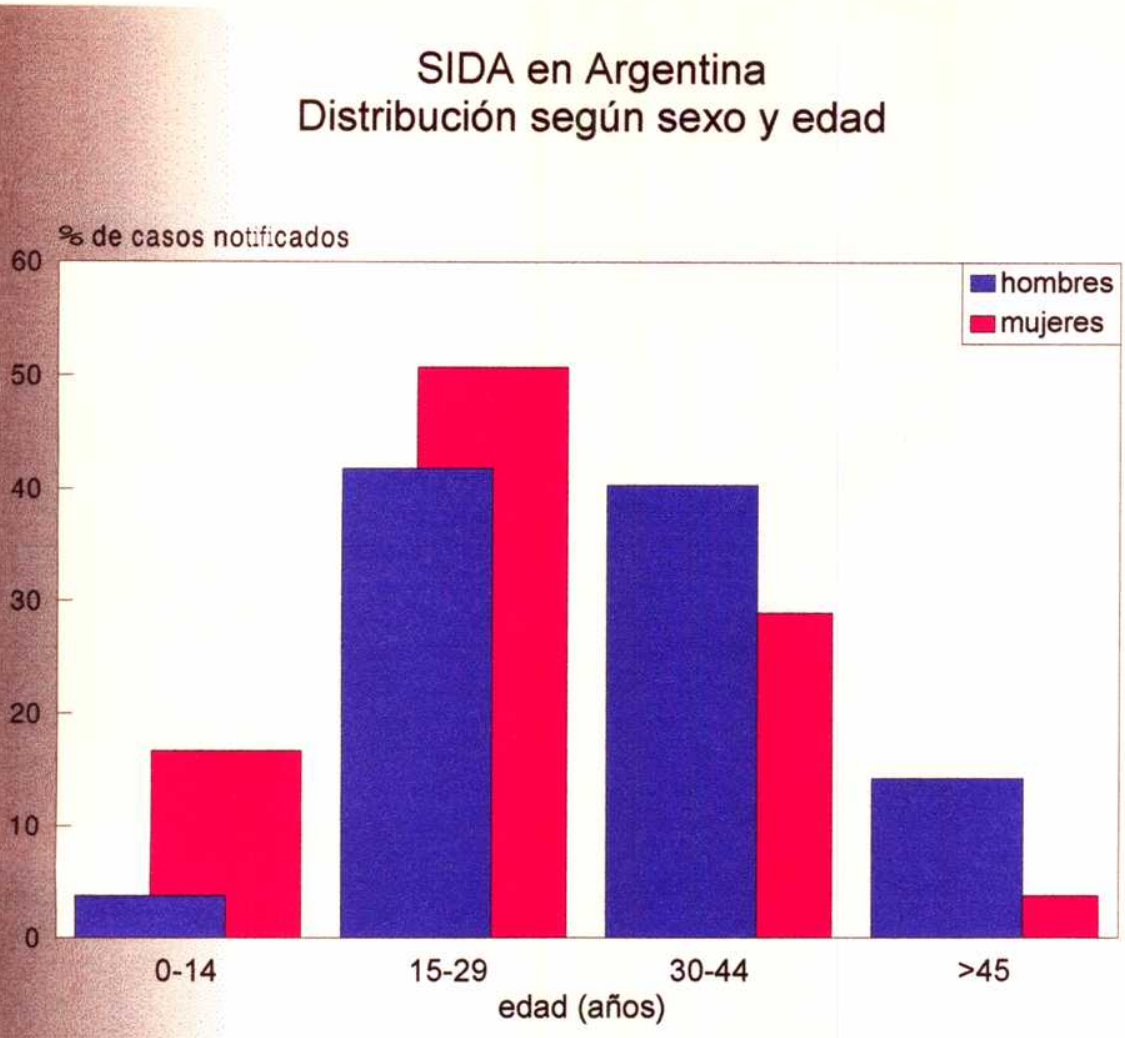

FIGURA I.6. Distribución de los casos notificados de SIDA en Argentina de acuerdo al sexo y la edad (Ministerio de Salud y Acción Social, 1995).

de los casos. Analizando en particular el sector femenino, se observa un aumento vertiginoso de los casos de SIDA en este último período, de los cuales el 75% ha adquirido la infección por contacto heterosexual (37.6%) o por vía endovenosa (37.4%). Como consecuencia, el número de casos de SIDA pediátrico también ha aumentado, ascendiendo a un total de 437 casos reportados hasta el 31 de julio de 1995. La Figura 7 muestra la distribución porcentual de los casos pediátricos de SIDA según los factores de riesgo.

3.2. Etiopatogenia de la infección por HIV

3.2.1. Estructura y replicación del HIV. Caracterización.

El HIV es un retrovirus constituído por partículas esféricas de aproximadamente 100nm (Figura 8). Posee una nucleocápside o *core* que contiene el material genético, ARN y la transcriptasa inversa. La envoltura externa es una capa bilipídica que proviene de la célula huésped y que está caracterizada por la presencia de las glicoproteínas gp120 y gp41.

El principal receptor del virus es la molécula CD4 que interactúa con la gp120 de envoltura del HIV (Sattentau & Weiss, 1988). El CD4 es una glicoproteína de superficie que se expresa en una variedad de células del sistema hematopoyético. Los linfocitos T CD4+ constituyen el blanco principal del HIV ya que expresan la molécula CD4 en muy alta concentración. Los monocitos, macrófagos y células dendríticas son un blanco alternativo de especial importancia en la infección por HIV; estas células también expresan el CD4 en la superficie pero en menor concentración que los linfocitos T. Tanto el HIV-1 como el HIV-2 se unen al receptor CD4 a través de una región conservada de la gp120. Shioda *et al* (1991) demostraron que mutaciones puntuales del gen de la gp120 pueden llegar a modificar el tropismo del virus.

Casos pediátricos en Argentina

Según factores de riesgo

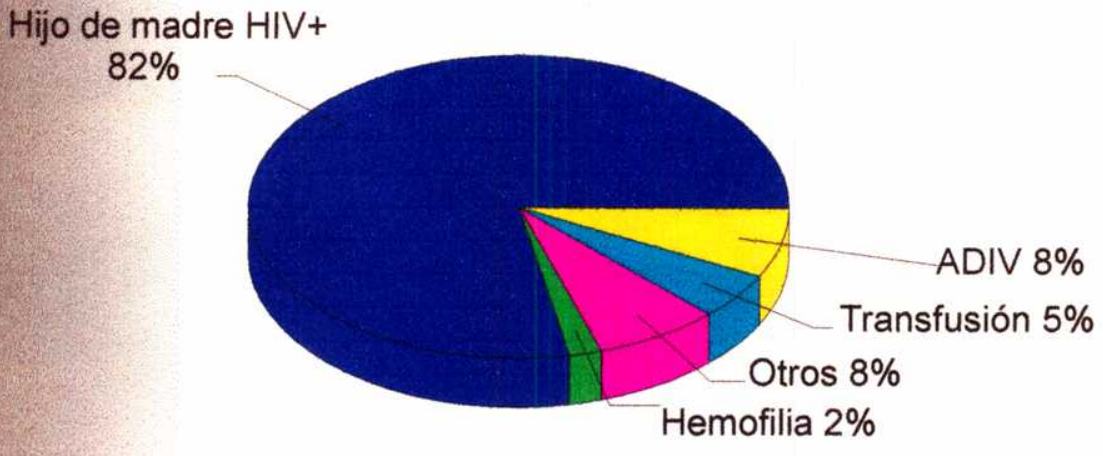

FIGURA I.7. Distribución porcentual de los casos notificados de SIDA pediátrico según los factores de riesgo (Ministerio de Salud y Acción Social, 1995).

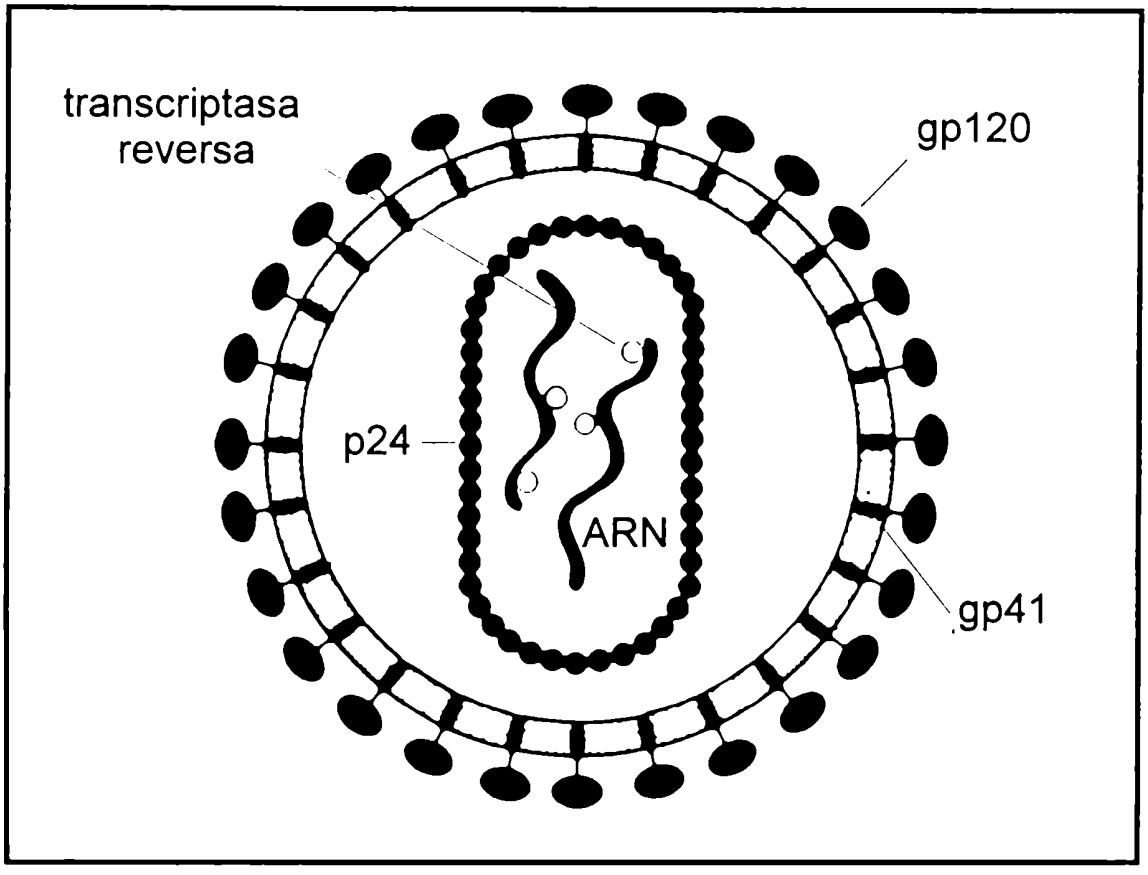

FIGURA I.8. Representación esquemática del virus de la inmunodeficiencia humana (adaptado de Rosenberg & Fauci, 1992).

Una vez que el virus invadió la célula huésped, utiliza la compleja maquinaria celular para replicarse. La Figura 9 esquematiza el ciclo de replicación del HIV. Una vez internalizado el complejo viral constituído por el genoma y la nucleoproteína, a través de la transcriptasa inversa contenida en el virión, se inicia en el citoplasma celular la síntesis de la primera cadena de ADN utilizando como molde el ARN viral. Al finalizar la síntesis del primer fragmento de ADN formando un híbrido ARN-ADN, el ARN del híbrido es degradado por la ribonucleasa H y permite que se genere un ADN de doble cadena utilizando como molde, la primera cadena de ADN sintetizada. El ADN generado de doble cadena emigra al núcleo de la célula y puede integrarse al genoma celular mediante cortes en el ADN viral y celular por acción de la endonucleasa y la integrasa viral, o bien puede acumularse como ADN circular no integrado en las células huésped (Sonza *et al*, 1994) .

El ADN viral integrado en el genoma del huésped (provirus) presenta tres genes estructurales y por lo menos siete regulatorios (Figura 10). Los genes *gag, pol* y *env* contienen la información para la síntesis de las proteínas estructurales del virus: el gen *gag* codifica las proteínas p18, p24 y p15; el gen *pol* codifica las enzimas transcriptasa reversa, endonucleasa, proteasa e integrasa, que participan en la replicación viral y el gen *env* codifica para las proteínas de la envoltura gp120 y gp41 (Cullen, 1991).

En los individuos asintomáticos infectados con el HIV-1 se ha detectado la persistencia de gran cantidad de ADN vírico de doble cadena no integrado en células infectadas (Bukrinsky *et al*, 1991). Las células del sistema monocito-macrófago son permisivas para la síntesis del provirus y su integración. Los viriones formados en el macrófago maduran y se acumulan dentro de vacuolas intracitoplasmáticas.

La carga viral intracelular se encuentra predominantemente como provirus ADN en los linfocitos T CD4+. La proporción de linfocitos T CD4+ infectados varía de acuerdo a su localización y al estadío clínico de la infección. En los sujetos asintomáticos, la proporción de células T CD4+ infectadas en sangre es menor de 1:1000 (Brinchmann *et al*, 1991) y en pacientes con SIDA puede llegar a 1:100 (Schnitman *et al*, 1989). La carga viral intracelular como provirus en el tejido linfoide puede llegar a ser 5 a 10 veces mayor que

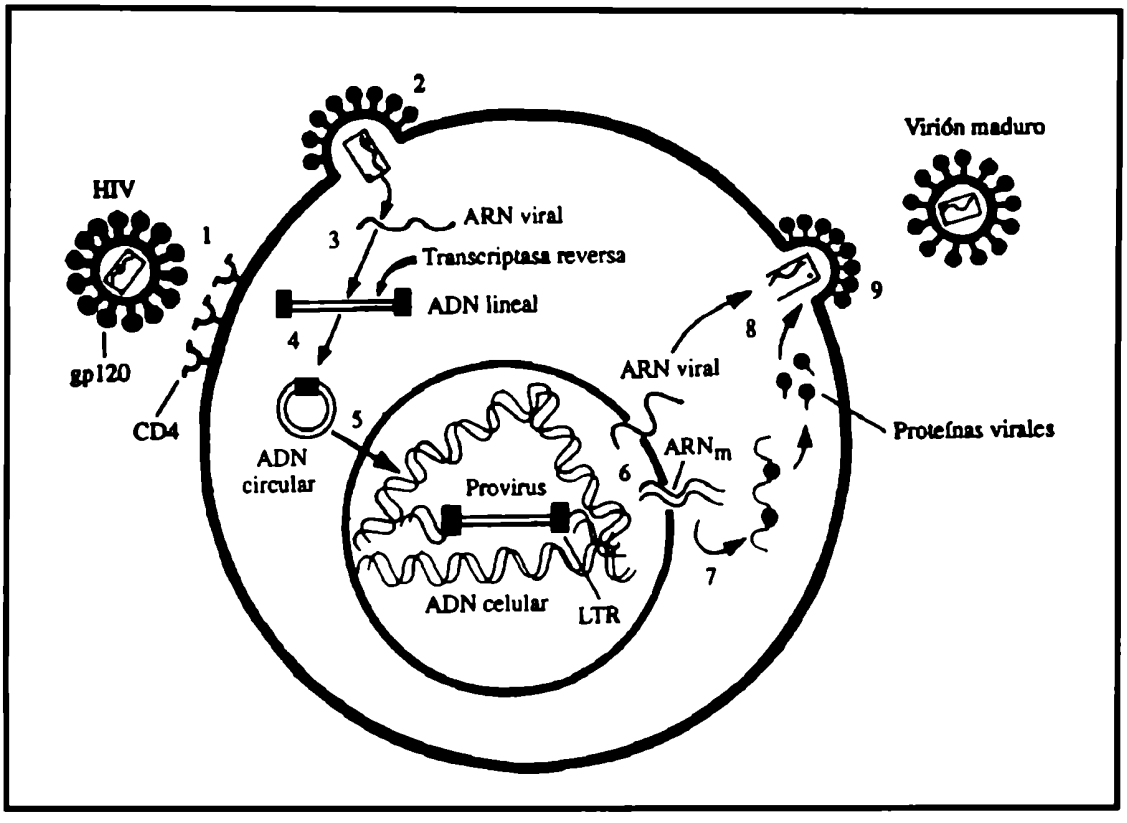

FIGURA I.9. Esquema del ciclo de replicación del HIV .

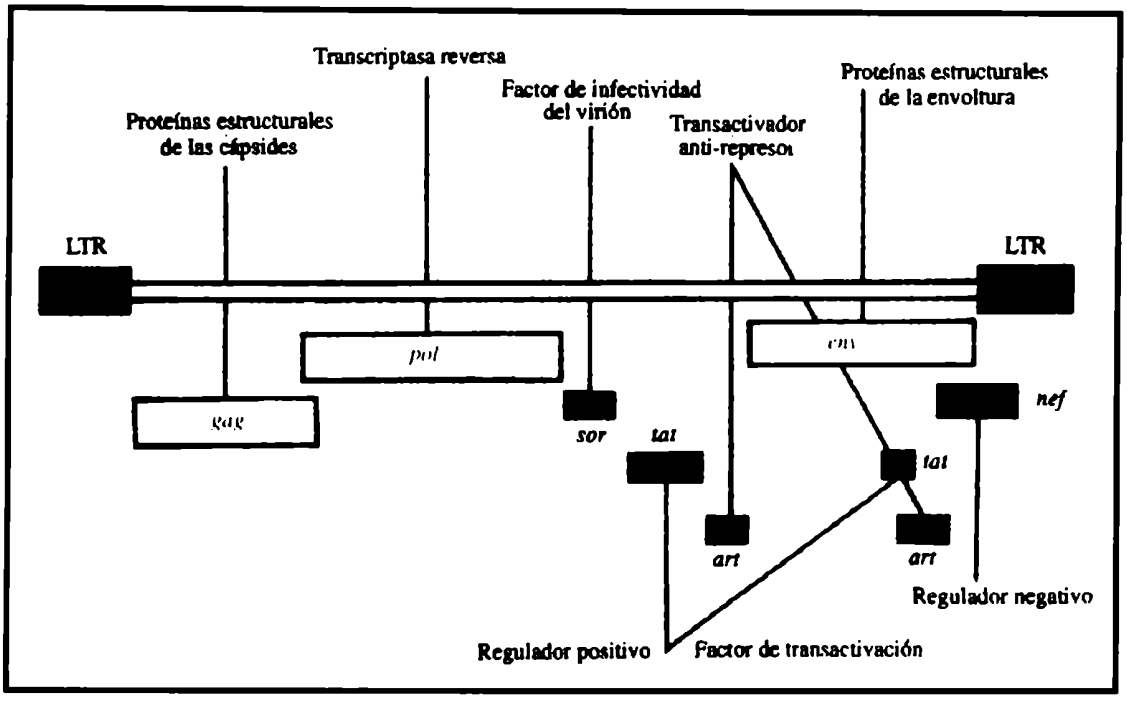

FIGURA I.10. Esquema del ADN viral, donde se observan los tres genes estructurales (*gag*, *pol* y *env*) y algunos de los genes regulatorios.

en sangre (Embretson *et al*, 1993). El desarrollo de técnicas muy sensibles ha permitido establecer que en los sujetos infectados completamente asintomáticos el número de partículas virales en plasma es muy alto (Piatak *et al*, 1993), rectificando el concepto de ausencia de replicación viral o latencia completa del mismo. Sin embargo solo una pequeña proporción de los viriones del paciente son cultivables, sugiriendo que la mayoría de las partículas son defectivas con un bajo poder de replicación.

Una de las características del HIV-1, desde el punto de vista fenotípico, es su gran variabilidad respecto de las propiedades biológicas como la capacidad de formar sincicios, el índice de replicación y el tropismo celular. Las especies de HIV-1 ailadas a partir de células mononucleares de sangre periférica de sujetos infectados asintomáticos son capaces de crecer en cultivos primarios de linfocitos periféricos estimulados con PHA, se replican lentamente, no se transmiten a líneas celulares y carecen de la habilidad de inducir la formación de sincicios. En contraste, las cepas de HIV-1 obtenidas de pacientes con SIDA o con complejos relacionados al SIDA se replican más rápido y en el 50% de los casos tienen tropismo por líneas celulares T y son inductoras de la formación de sincicios (Asjo *et al*, 1986; Evans *et al*, 1987; Cheng-Mayer *et al*, 1988; Tersmette *et al*, 1988). Las variantes del HIV-1 no inductoras de la formación de sincicios, a diferencia de las cepas inductoras, se replican en macrófagos (Schuitemaker, 1991). En más del 95% de los individuos asintomáticos, solo se encuentran cepas no inductoras de la formación de sincicios. Las variantes del HIV-1 formadoras de sincicios emergen en el curso de la infección y eventualmente se detectan en un 50% de los individuos con estadíos avanzados de la enfermedad (Tersmette *et al*, 1989). El fenotipo de las cepas de HIV-1 obtenidas de pacientes infectados en diferentes estadíos de la infección ha sido estudiado con el fin de establecer la prevalencia de variantes específicas. Durante la etapa aguda de la infección se observan tanto clones linfotrópicos como macrofagotrópicos. En la fase asintomática, predominan aquellas variantes con tropismo por los macrófagos. En los estadíos tardíos se observa un aumento de la carga viral debido a la replicación y expansión de clones linfotrópicos (Schuitemaker, 1994).

Desde el punto de vista genotípico, el HIV se encuentra en el huésped como una mezcla de variantes genéticas estrechamente realcionadas, que se denominan cuasiespecies. Los retrovirus, al replicarse y debido a la gran cantidad de errores cometidos por la transcriptasa reversa, generan una serie de variantes heterogéneas. Las más homogéneas y frecuentes constituyen lo que se llama cepa "master", que va a caracterizar a la cuasiespecie. Actualmente, se pueden distinguir 6 genotipos diferentes del HIV-1, denominados A, B, C, D, E y F (revisado por Nájera *et al*, 1995b). Aparte hay que considerar el nuevo subtipo O, descripto en Camerún y posteriormente en Francia, que hoy tiende a clasificarse como un nuevo grupo O (Gürtler *et al*, 1994). Esta gran variabilidad y su contínua evolución es responsable de la rápida aparición de variantes resistentes a la neutralización, a los linfocitos T citotóxicos y a las drogas usadas en la terapia antirretroviral (Mohri *et al*, 1993; Nájera *et al*, 1994 y 1995a). Todo esto hace que del fenómeno de la variabilidad deriven características epidemiológicas de gran importancia, tales como la transmisión y circulación viral, progresión de la enfermedad, especificidad celular y tisular, resistencia a los antirretrovirales y dificultades para el desarrollo de vacunas.

3.2.2. Infección primaria del HIV

El período de infección primaria del HIV involucra eventos virológicos e inmunológicos que reflejan la extensión y diseminación del virus. Por un lado, el surgimiento de la respuesta inmune específica para el HIV y por el otro, el control de la viremia (Graziosi *et al*, 1993).

La infección primaria se caracteriza por niveles altos de replicación viral asociada en un 50% de los casos con sintomatología clínica similar a la gripe (Daar *et al*, 1991; Safrit & Koup, 1995). Esta puede dividirse en dos etapas: una etapa de diseminación viral, que abarca las primeras 2 a 3 semanas post-infección culminando con el pico de viremia,

y una segunda etapa donde se observa un descenso brusco de la viremia, que se correspondería con la eliminación parcial del virus en sangre.

Durante la infección primaria se observa un descenso del número absoluto de linfocitos T CD4+ en sangre periférica (Pantaleo *et al*, 1993). Coincidentemente con la caída de los linfocitos T CD4+, la carga viral, medida como antígeno p24 del HIV en suero, número de células infectadas y viremia plasmática, alcanzan su valor máximo (Clavel *et al*, 1986; Daar *et al*, 1991). La Figura 11 ilustra el curso típico de la infección por HIV. Durante la infección aguda más del 1% de los linfocitos T CD4+ circulantes pueden estar infectados con el HIV-1 (Yogi *et al*, 1991). La reducción de la viremia plasmática se correlaciona con la seroconversión. Estos hechos demuestran que frente a la infección viral, la respuesta inmune del huésped es importante y eficiente, aunque no suficiente para la erradicación del virus.

En general el descenso dramático de la replicación viral en sangre periférica coincide con la aparición de respuesta inmunológica específica. En los últimos años se ha enfatizado el estudio de los mecanismos tempranos que participan en la respuesta inmune específica contra la infección por HIV, que se puedan correlacionar con la reducción de la carga viral. Existen evidencias que sugieren que la protección contra la infección viral en el organismo infectado está mediada por anticuerpos específicos contra el virus (Prince *et al*, 1991), linfocitos T citotóxicos específicos (Borrow *et al*, 1994) y células asesinas naturales o "natural killer", que si bien son capaces de reconocer células infectadas con virus no reconocen al virus en forma específica (Bukowski *et al*, 1985). Las células T con citotoxicidad espécífica contra el HIV estarían involucradas en la eliminación de las células infectadas con el HIV, mientras que los anticuerpos anti-HIV específicos serían los principales responsables de la eliminación de los viriones de circulación. La elevación del número de linfocitos T CD8+ en sangre periférica constituye un evento temprano que puede preceder a la seroconversión, pero siempre es posterior a la detección del provirus en las células circulantes (Yogi *et al*, 1991).

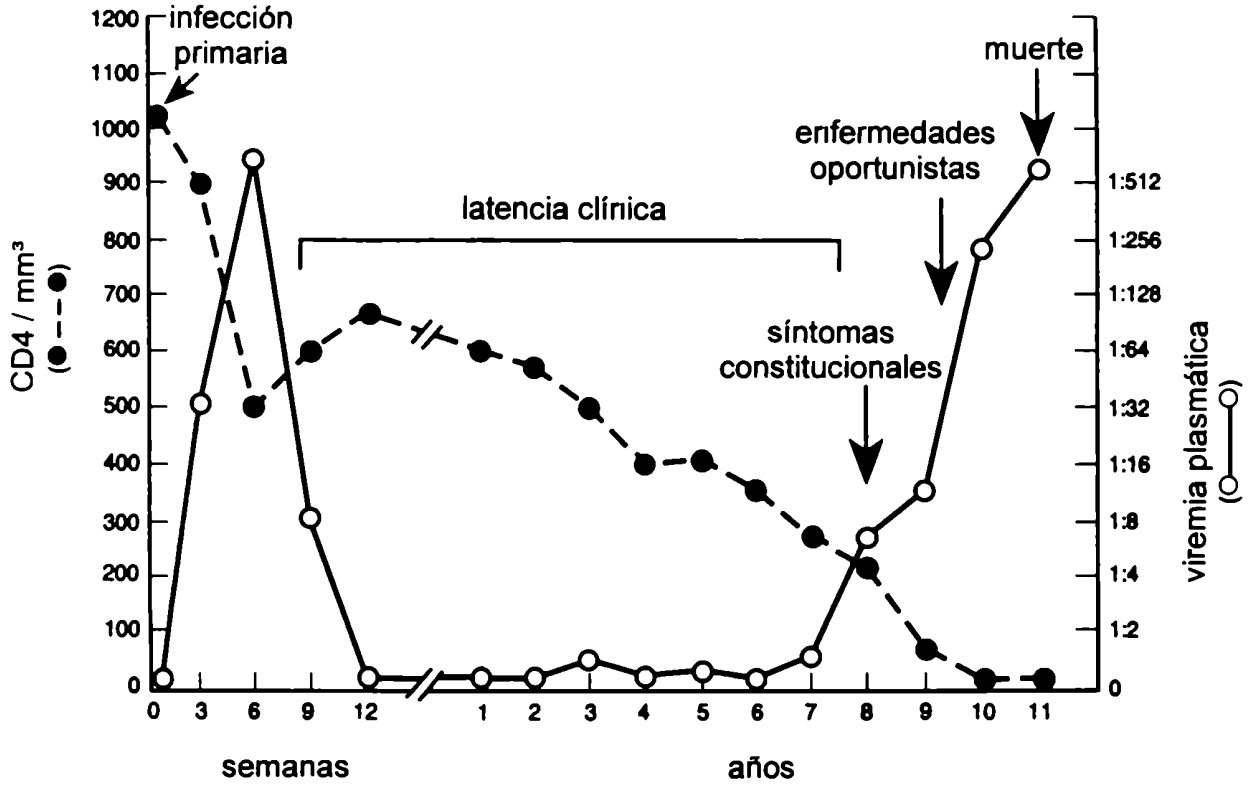

FIGURA I.11. Curso de la infección por HIV, teniendo en cuenta el número de linfocitos T CD4+ y la viremia plasmática (Pantaleo *et al*, 1993).

Cuando la sintomatología clínica de la infección primaria del HIV-1 presenta un curso prolongado, en general se asocia con un pronóstico desfavorable (Pedersen *et al*, 1989).

En conclusión, en la mayoría de los sujetos, el estallido inicial de la viremia es controlado en forma rápida y eficiente, provocando la disminución del título viral en sangre a las pocas semanas de la primoinfección. La desaparición casi total de la viremia coincidente con la aparición de una adecuada respuesta inmune específica anti-HIV, aún cuando la infección persiste, estaría a favor de la hipótesis de que el virus es capaz de escapar a los mecanismos de control de la respuesta inmune. Durante la fase aguda, la infección inicial se localiza en los ganglios linfáticos regionales (Pantaleo *et al*, 1991; Wei *et al*, 1995). Luego el HIV se disemina a otros órganos linfoides, antecediendo la aparición de la respuesta inmune específica anti-HIV. Wei *et al* (1995), monitoreando la población viral en pacientes que reciben tratamiento con drogas nuevas, han observado que las mutaciones virales generadas por resistencia a la medicación rápidamente se detectan en el pool viral plasmático, pero la diseminación como provirus en las células mononucleares de sangre periférica es mucho más lenta y se pueden detectar después de las 20 semanas en el 50-80% de los aislados virales.

3.2.3. Latencia Clínica

Después de la seroconversión sobreviene el período de latencia clínica que antecede al inicio de la enfermedad SIDA y puede variar entre 1 a 15 o más años. Durante casi todo el período de latencia, el sujeto infectado con el HIV permanece en general libre de síntomas. Sin embargo el curso de la infección continúa y se suceden una serie de fenómenos virológicos e inmunológicos. Los eventos virales muestran una dicotomía entre carga viral y replicación viral presente en ganglios linfáticos y sangre periférica. Las células HIV infectadas y los viriones atrapados en la trama de las células dendríticas foliculares son las responsables de la dicotomía (Spiegel *et al*, 1992). Desde el

punto de vista inmunológico predominan los mecanismos de activación. Tanto los linfocitos B como los T están estimulados. En los ganglios linfáticos se observa hiperplasia folicular y expansión de la red que forman las células dendríticas foliculares indicativo de activación del tejido linfoide. La activación crónica de los linfocitos T CD4+ en los ganglios linfáticos crea las condiciones que favorecerían la replicación y diseminación viral. Como consecuencia de ello, las células T CD4+ podrían ser eliminadas por infección directa o presentar alteraciones funcionales.

Hasta el presente no se sabe con seguridad como el HIV destruye a su célula blanco y al sistema inmune, aunque existen diferentes teorías que tratan de explicarlo.

El macrófago es considerado el reservorio para la producción y diseminación del HIV. Sin embargo, la mayoría de las cepas del HIV de macrófagos infectados no son citopatógenos, indicando que la infección productiva del HIV no pareciera destruir al macrófago huésped. Con respecto a las células T CD4+, estudios realizados en cultivos de líneas celulares han sugerido que dependiendo de la cepa del HIV, algunas pueden destruir a las células T CD4+ por acción directa citopatogénica o por la formación de sincicios celulares (Levy, 1993).

Durante el período de latencia clínica, comienza una reducción lenta y progresiva del número absoluto de linfocitos T CD4+, que en general persiste durante años. La reducción de CD4+ es utilizada para medir el grado de inmunosupresión del paciente y en base a ello se han establecido pautas que permiten recomendar el momento preciso para el inicio de la medicación antiretroviral específica. Hasta el presente el número de linfocitos T CD4+ en sangre se considera el mejor marcador pronóstico disponible para el seguimiento de los sujetos infectados con el HIV (De Wolf *et al*, 1988; Fahey *et al*, 1990).

3.2.4. Mecanismos inmunopatogénicos de la infección por el HIV

La inmunosupresión que se desarrolla en los sujetos infectados con el HIV se debe a alteraciones cuantitativas y funcionales de las células T CD4+. La interacción entre

la glicoproteína viral gp120 y el CD4 gatilla señales negativas en la célula blanco que inducen una falta de respuesta celular, anergia o apoptosis (Amadori *et al*, 1992; Groux *et al*, 1992). Por otra lado, la alteración en la producción de citoquinas por parte de los linfocitos T CD4+ contribuiría a la disfunción de otras células, principalmente las efectoras, como los linfocitos T CD8+ (Shearer & Clerici, 1991). Más aún, el exceso de producción de citoquinas como la IL-1, TNF e IL-10 podrían potenciar la replicación viral o inhibir una variedad de funciones inmunológicas (Rosenberg & Fauci, 1990; Clerici *et al*, 1994).

En conclusión, durante los estadíos tempranos e intermedios de la infección por el HIV existe una profunda activación del sistema inmune. Esta hiperactivación, por un lado potenciaría la replicación viral y activaría los mecanismos de muerte celular programada fisiológica, pero también induciría a una desregulación con respuestas inmunes aberrantes. Todo ello conduciría a un agotamiento del sistema inmune provocando el estado de inmunosupresión característico de las estapas tardías de la infección, que favorece la diseminación del HIV y aumenta la susceptibilidad a infecciones por gérmenes oportunistas (Pantaleo & Fauci, 1994).

3.3. El sistema monocito-macrófago en la infección por HIV

En los últimos años, se ha demostrado que el sistema monocito-macrófago constituye un blanco alternativo de especial importancia en la infección por HIV. La infección puede ocurrir a través de la fagocitosis de partículas virales o por la unión del virus a la molécula receptora CD4, que se expresa en la superficie de los monocitos y macrófagos (Talle *et al*, 1983; Stewart *et al*, 1986; Crowe *et al*, 1987; Finbloom *et al*, 1991). Diferentes autores han demostrado que el HIV puede infectar líneas monocíticas y promielocíticas establecidas (Levy *et al*, 1985), monocitos de sangre periférica (Gartner *et al*, 1986a; Ho *et al*, 1986; Nicholson *et al*, 1986, Crowe *et al*, 1987) y macrófagos alveolares (Salahuddin *et al*, 1986). Asimismo, el HIV ha podido ser aislado o detectado

en monocitos sanguíneos (Ho *et al*, 1986), pulmón y cerebro de individuos infectado con el virus (Gartner *et al*, 1986a y 1986b; Koenig *et al*, 1986; Wiley *et al*, 1986).

A diferencia de lo que ocurre en los linfocitos T CD4+, la infección de los monocitos y macrófagos parece ser más resistente al efecto citopático del virus y a la formación de sincicios. Orenstein *et al* (1988) demostraron en monocitos infectados que el HIV se acumula en vesículas intracitoplasmáticas. Se ha propuesto entonces, que los monocitos y macrófagos constituyen el principal reservorio del HIV en el organismo, permitiendo y facilitando su diseminación. Diferentes autores han sugerido que los monocitos infectados con el HIV pueden transmitir el virus a las células T CD4+ susceptibles durante interacciones inmunes normales. En experimentos de cocultivo Schrier *et al* (1990) demostraron que las células T activadas pueden inducir la expresión del HIV en monocitos de individuos infectados. Por su parte, Mikovits *et al* (1990) observaron transmisión del virus por interacción célula-célula entre una línea monocítica infectada con el HIV y células T. Por lo tanto, el sistema monocito-macrófago tendría un papel importante no solo como reservorio viral, sino también en la transmisión del virus (Mann *et al*, 1990).

Hasta el presente existen numerosos trabajos que demuestran anormalidades funcionales de las células inmunocompetentes, en particular de los linfocitos T y B, en individuos infectados con el HIV (Gupta & Safai, 1983; Lane *et al*, 1983; Pinching *et al*, 1983; Lane *et al*, 1985; Antonen & Krohn, 1986; Shearer *et al*, 1986; Giorgi *et al*, 1987). Estos pacientes se caracterizan por presentar cuadros infecciosos a repetición, que en la mayoría de los casos resultan fatales. A pesar de que el sistema monocito-macrófago cumple un rol fundamental en la eliminación de estos gérmenes oportunistas, existen menos trabajos que documentan alteraciones de su capacidad funcional. Diversos autores han demostrado que los monocitos de pacientes HIV positivos presentan un marcado defecto a nivel de la quimiotaxis (Pinching *et al*, 1983; Smith *et al*, 1994; Poli *et al*, 1985; Nielsen *et al*, 1986), la fagocitosis de *Staphylococcus aureus* (Pos *et al*, 1992), la destrucción del *Toxoplasma gondii* (Eales *et al*, 1987), la expresión de moléculas de adhesión y de receptores para Fc de Igs (Capsoni *et al*, 1994; Stent *et al*, 1994) y la

presentación antigénica (Blauvelt *et al*, 1995). En nuestro laboratorio observamos que la actividad candidacida se encuentra disminuída, acentuándose en estadíos tardíos de la infección. La disfunción lítica se correlaciona con una disminución en la producción de metabolitos tóxicos derivados del oxígeno, que llega a valores extremadamente bajos en sujetos con SIDA (Estevez *et al*, 1986). Muller *et al* (1990) también observaron una disminución del estallido respiratorio en monocitos y macrófagos de pacientes HIV positivos. En contraste, distintos autores observaron que la liberación de anión superóxido (Poli *et al*, 1985; Nielsen *et al*, 1986) y la destrucción de *S. aureus* eran normales (Pos *et al*, 1992). Por otra parte, otras funciones monocíticas como la actividad tumoricida (Kleinerman *et al*, 1985), la fagocitosis de levaduras opsonizadas y partículas de látex (Poli *et al*, 1985; Estevez *et al*, 1986; Nielsen *et al*, 1986) y la respuesta a interferón gamma (IFN-γ) (Murray *et al*, 1987), permanecen inalteradas durante la infección por HIV.

La producción de citoquinas y moduladores de la respuesta inmune por parte de los macrófagos también se encuentra alterada. En los pacientes con SIDA, la producción de IL-1 se encuentra aumentada, mientras que la secreción inducida de este factor es deficiente. Asimismo se ha detectado una mayor síntesis de IL-6, TNFα y PGE2 (Estevez & Sen, 1989).

Durante los últimos años se ha propuesto que no solo el virus, sino también productos virales solubles serían responsables de las alteraciones funcionales de las células inmunocompetentes observadas en los individuos infectados con el HIV (Mann *et al*, 1987; Shalaby *et al*, 1987; Kornfeld *et al*, 1988, Viscidi *et al*, 1989; Manca *et al*, 1990; Rieckmann *et al*, 1991; Hu *et al*, 1994).

3.4. Diagnóstico de la infección por HIV

El diagnóstico de infección por HIV se hace normalmente en base a la detección de anticuerpos específicos contra el virus. Actualmente se dispone de una serie de ELISAs

extremadamente sensibles y específicos para la detección de HIV, que son los más comunmente utilizados para las pruebas iniciales o de "screening".

A pesar de las indudables mejoras que se han introducido en estas pruebas iniciales, no son pocos los casos de resultados falsos positivos, por ejemplo cuando hay enfermedades virales concurrentes, en la insuficiencia renal crónica, en hepatopatías o por reacciones cruzadas entre anticuerpos diversos y anticuerpos anti-HIV, especialmente aquellos que se producen en respuesta a los antígenos regulados por los genes *gag* y *vif*. Por lo tanto es necesario realizar otras pruebas confirmatorias, generalmente a través de la técnica de Western blot. En esta técnica se han transferido a un papel de nitrocelulosa las proteínas virales, que al haber sido separadas por electroforesis, se ordenan según su peso molecular. De esta forma reaccionarán con los anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente, dando un patrón de bandas típico con una intensidad cromática proporcional a la cantidad de anticuerpo presente en la muestra. Las bandas características de un Western blot positivo para HIV son:

gen *gag*:	p17	p24	p55
gen *pol*:	p31	p51	p66
gen *env*:	gp41	gp120	gp160

Las bandas del gen *env* persisten a lo largo de todo el curso de la infección, y está aceptado que no se producen reacciones cruzadas frente a otras proteínas. Por el contrario la inespecificidad a nivel de las bandas del gen *gag* es un fenómeno habitual que puede deberse a la presencia de anticuerpos anti-HLA, hiperbilirrubinemia, colagenopatías y gamopatías policlonales. Un Western blot negativo es aquel que no presenta ninguna de las bandas características. Para la interpretación de un Western blot positivo, según el criterio de la OMS, se deben distinguir al menos dos bandas positivas, y una de ellas o las dos deben ser del gen *env*. El Western blot que no reúna las condiciones mínimas de positividad se considera indeterminado.

La confirmación de los resultados obtenidos con las pruebas iniciales puede hacerse también con la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).

Al principio de la enfermedad, durante la etapa aguda, y al final, con la aparición de los síntomas propios del SIDA, se produce una intensa replicación viral y un exceso de antígenos virales, principalmente p24. La detección de p24 mediante un ELISA tiene gran utilidad en el diagnóstico temprano de la infección y como marcador pronóstico de la enfermedad.

Para la detección de la infección por HIV en niños, especialmente durante los primeros meses de vida, se utilizan una serie de técnicas que se detallan más adelante en el punto 3.6. de SIDA pediátrico.

3.5. Manifestaciones clínicas del SIDA

El espectro de manifestaciones clínicas asociadas a la infección por HIV es muy heterogéneo. Aunque algunas son atribuíbles directamente al propio virus, la mayoría se relacionan con las infecciones oportunistas o neoplasias secundarias a la inmunodeficiencia. Desde la descripción de los primeros casos de SIDA hasta la actualidad se han propuesto distintos sistemas de clasificación de la infección por HIV que permiten diferenciar los estadíos evolutivos de la enfermedad.

Inicialmente se diferenciaron tres grandes grupos: el síndrome de linfoadenopatía crónica, el complejo relacionado con el SIDA y el SIDA propiamente dicho. El síndrome de linfoadenopatía crónica se definía por un aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos de más de 1 cm de diámetro, en dos o más cadenas linfáticas extrainguinales y durante al menos tres meses, en ausencia de enfermedades o fármacos que pudieran justificar las adenomegalias. El complejo relacionado con el SIDA (ARC) suponía un estadío más avanzado de la inmunodeficiencia. La inclusión en esta fase se realizó por: 1) presencia de dos o más signos clínicos como linfoadenopatía periférica, fiebre, pérdida de más del 10% del peso corporal, diarrea, malestar, fatiga y sudoración nocturna; 2) presencia de

dos o más datos de laboratorio en forma mantenida por tres meses como anemia, linfopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, reducción del número de linfocitos T CD4+, inversión del cociente CD4/CD8. El SIDA propiamente dicho se definió por la aparición de las infecciones oportunistas y neoplasias propias de las etapas más avanzadas de la inmunodeficiencia (Center for Diseases Control, 1986).

Esta clasificación inicial de la enfermedad presentaba algunas limitaciones. por ejemplo, no todos los pacientes desarrollaban de modo secuencial todos y cada uno de los estadíos. Con posterioridad se diseñaron otras clasificaciones clínicas más funcionales. Las dos más utilizadas han sido la clasificación de Walter Reed, en la cual se distinguen 7 grados evolutivos tomando en cuenta el valor de células CD4+ y las manifestaciones clínicas (Redfield *et al*, 1986) y la clasificación del CDC de 1987. Según este sistema, los individuos infectados con el HIV-1 pueden clasificarse en 4 grupos teniendo en cuenta el grado de progresión de la enfermedad. El grupo I corresponde a la primoinfección; el grupo II a la fase asintomática; el grupo III a la aparición de linfoadenopatía crónica, y el grupo IV a las enfermedades asociadas a la inmunodeficiencia. Este último grupo se divide a la vez en 5 subgrupos que se refieren a distintos tipos de procesos como se ilustra en la Tabla 5.

La exposición al virus y la primoinfección no siempre tienen expresión clínica, si bien más de un 70% de estos pacientes presentan síntomas de algún tipo, que pueden ir desde cuadros de tipo pseudogripal a procesos clínicos bien definidos como encefalitis, neumonitis, hepatitis, etc. La duración de la sintomatología asociada a la infección primaria es variable y rara vez supera las 3 o 4 semanas. Aparentemente cuanto más prolongada y severa es la sintomatología de la infección aguda más rápidamente evolucionará el paciente a SIDA (Pedersen *et al*, 1989). Tras la seroconversión y por un período variable de tiempo, los sujetos infectados permanecen asintomáticos. En esta etapa la actividad del individuo es normal y no existe dato alguno que sugiera la infección, salvo la presencia de anticuerpos circulantes.

La última revisión de la definición de SIDA y de su clasificación fue realizada por el CDC en 1993, y se indica en la Tabla 6. En la categoría clínica B (síntomas menores) se

TABLA I.5. Sistema de clasificación de la infección por HIV del CDC (1987).

Grupo I:	infección aguda
Grupo II:	infección asintomática
Grupo III:	linfoadenopatía generalizada persistente
Grupo IV:	otras enfermedades
	Subgrupo A: enfermedad constitucional
	Subgrupo B: enfermedades neurológicas
	Subgrupo C: infecciones oportunistas
	categoría C-1: diagnósticas de SIDA
	categoría C-2: otras infecciones
	Subgrupo D: neoplasias asociadas
	Subgrupo E: otros procesos

TABLA I.6. Sistema de clasificación de la infección por HIV del CDC (1992).

Categoría inmunológica (N° linfocitos T CD4+)	Categoría clínica		
	A primoinfección asintomático o linfoadenopatía	B síntomas menores	C entidades indicadoras de SIDA
1 (> 500/mm^3)	A1	B1	C1
2 (200-500/mm^3)	A2	B2	C2
3 (< 200/mm^3)	A3	B3	C3

incluyen: angiomatosis bacilar, muguet, candidiasis vulvovaginal, displasia *cervical*, leucoplasia vellosa, trombocitopenia idiopática, listeriosis, enfermedad inflamatoria pélvica y neuropatía periférica. En la categoría clínica C (entidades definitorias de SIDA) se incluyen, entre otros procesos, candidiasis esofágica o traqueal, neumonía por *P.carinii,* toxoplasmosis cerebral, enfermedad diseminada por micobacterias, sarcoma de Kaposi, infección diseminada por citomegalovirus, tuberculosis pulmonar, etc.

3.6. SIDA pediátrico

3.6.1. Transmisión y progresión de la enfermedad

La transmisón vertical del virus de madre al hijo es la vía más frecuente en la infección por HIV en la población pediátrica. Esta puede ocurrir antes, durante o inmediatamente después del nacimiento (Neweel & Peckham, 1993).

La infección intrauterina se ha demostrado a través de la identificación de virus en el tejido fetal, placenta y sangre de cordón. La infección también puede ser perinatal debido al intercambio sanguíneo entre la madre y el hijo, y la presencia de partículas virales en la secreción cervical. La proporción de transmisión perinatal no varía de acuerdo a que el parto ocurra por vía vaginal o por cesárea (European Collaborative Study, 1992). La transmisón por la lactancia se observó inicialmente en situaciones donde la madre había adquirido la infección poco tiempo después del parto (Neweel & Peckham, 1994).

Diferentes estudios (Scarlatti *et al*, 1991; European Collaborative Study, 1992) han demostrado que ciertas características clínicas de la madre pueden aumentar el riesgo en la transmisión vertical del vírus. El incremento de la carga viral y/o el descenso en el número de linfocitos T CD4+ en la madre favorecen la transmisión de la infección al niño. Más aún, factores estrechamente vinculados a la viremia, como la infección primaria, o a la estimulación del sistema inmune, como la presencia de infecciones crónicas y el uso de

drogas endovenosas también son importantes. Asimismo, la presencia de niveles elevados de anticuerpos matemos capaces de neutralizar cepas autólogas de HIV ofrecen cierta protección a la transmisión materno infantil del virus (Scarlatti *et al*, 1993). En cambio, títulos altos de anticuerpos maternos capaces de mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, no disminuyen la transmisión (Broliden *et al*, 1993).

Por otra parte, la edad gestacional también puede ser considerada un factor de riesgo en la transmisión vertical. Goedert *et al* (1989) observaron un mayor porcentaje de infección en los niños nacidos antes de las 34 semanas de gestación.

Teniendo en cuenta los factores de riesgo identificados se han propuesto diferentes alternativas para reducir la transmisión materno-infantil de la infección por HIV, como el lavado vaginal, la inmunización pasiva y la terapia antiviral con AZT.

La progresión de la enfermedad en los niños infectados por transmisión vertical es más rápida que en los adultos, observándose dos patrones claramente diferentes (Blanche *et al*, 1990; Tovo *et al*, 1992; European Collaborative Study, 1994). Aproximadamente entre 10-25% de estos niños desarrollan una inmunodeficiencia severa, frecuentemente asociada a trastornos neurológicos, dentro de los dos primeros años de vida. El índice de mortalidad en esta población se acerca al 100% alrededor de los cuatro años de edad. El resto, 75-90%, experimentan una progresión de la infección mucho más lenta, permaneciendo asintomáticos o con síntomas leves hasta la adolescencia (Wilfert *et al*, 1994).

3.6.2. Diagnóstico de la infección por HIV en niños

Uno de los principales problemas en el SIDA pediátrico es su diagnóstico precoz. El pasaje a través de la placenta de los anticuerpos IgG anti-HIV de la madre al feto hace que todos los niños de madres infectadas tengan anticuerpos contra el virus al nacer y persistan por meses. De allí que la presencia de anticuerpos en el niño no indica necesariamente que éste se encuentre infectado, sino que refleja la infección materna

(Rogers *et al*, 1991). Los anticuerpos de tipo IgM e IgA no atraviesan la placenta, por lo tanto, la detección de anticuerpos anti-HIV pertenecientes a dichos isotipos en el suero del niño indicaría infección por el HIV (Weinblen *et al*, 1990). Sin embargo, antes del tercer mes de vida, los linfocitos B no están maduros como para producir anticuerpos suficientes para ser detectados por las pruebas serológicas de rutina. Debido a lo anteriormente mencionado, resulta imposible realizar un diagnóstico precoz de infección por HIV en los niños recién nacidos mediante la detección de anticuerpos. La aplicación de técnicas más sensibles permite identificar infección viral antes que la detección de anticuerpos específicos. En la actualidad, la metodología utilizada para el diagnóstico precoz de infección por HIV en niños nacidos de madres serológicamente positivas incluye: el aislamiento viral a partir de cultivo de células mononucleares totales del individuo potencialmente infectado (Burgard *et al*, 1992), la determinación de antígeno p24 plasmático (Miles *et al*, 1993) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que amplifica secuencias específicas del ADN viral (Ou *et al*, 1988).

La determinación de la infección por PCR consiste en amplificar secuencias características del HIV utilizando como "primers" oligonucleótidos sintéticos específicos. La identificación de los productos amplificados puede realizarse a través de una electroforesis en geles de agarosa, previa tinción con bromuro de etidio o bien pueden hibridizarse con sondas específicas marcadas radioactivamente, someter los productos hibridizados a una electroforesis en geles de poliacrilamida y revelarlos por autorradiografía. La segunda opción aumenta la sensibilidad del método. Otra alternativa es utilizar la técnica de PCR "nested", en la cual se realiza una segunda reacción de amplificación sobre alícuotas de la primera, con "primers" diferentes cuya secuencia es complementaria a fragmentos internos de la primera amplificación. En este caso, los productos amplificados se detectan mediante una electroforesis en geles de agarosa.

La metodología de aislamiento viral a partir de células procedentes de sujetos potencialmente infectados, se realiza a partir de células mononucleares totales aisladas de la sangre periférica de los pacientes. Estas se cocultivan con células de donantes sanos previamente estimuladas con PHA. El cocultivo se sigue por un período de 3-4

semanas y la demostración de la presencia de virus se lleva a cabo mediante la detección de antígeno p24 en el sobrenadante de cultivo.

Los criterios para determinar la infección por HIV en los niños nacidos de madres infectadas han sido establecidos y revisados por el CDC (1994) y se detallan en el punto 1.2. del Capítulo II, Materiales y Métodos.

3.6.3. Alteraciones inmunológicas en el SIDA pediátrico

Hasta el presente, los distintos estudios realizados sobre SIDA en pediatría han estado dirigidos principalmente a evaluar los mecanismos y factores de riesgo en la transmisión materno-infantil del virus y a la búsqueda de métodos adecuados para el diagnóstico temprano de la infección por HIV. Existen en cambio muy pocos trabajos que reporten alteraciones funcionales de las diferentes poblaciones de células inmunocompetentes. Roilides *et al* (1991b) demostraron en un grupo de niños infectados con el HIV, variaciones en la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T estimulados con diferentes antígenos o PHA, asociando aquellos no respondedores a una mayor incidencia de infecciones oportunistas. Por su parte, De Martino *et al* (1991) también observaron en niños infectados que el número y funcionalidad de las células inmunocompetentes es inadecuado, resultando en una colaboración T-B deficiente. Más aún, en los niños verticamente infectados con el HIV los niveles de citoquinas tipo Th1 (IL-2 e IFNγ) se encuentran disminuídas independientemente del estadío clínico, mientras que las citoquinas tipo Th2 (IL-4 e IL-10) están aumentadas, preferentemente en estadíos avanzados (Viganó *et al*, 1995). En cuanto a la producción de anticuerpos, una característica frecuente de los niños infectados con el HIV es la presencia de hipergamaglobulinemia, aunque se han detectado casos de deficiencias de IgG_2, donde se aplica terapia con gamaglobulina para controlar las infecciones bacterianas (Mofeson *et al*, 1991; Roilides *et al*, 1991a). Asimismo, Español *et al* (1994) han demostrado un aumento en los niveles séricos de IgA asociados a un mal pronóstico.

Por último, en nuestro laboratorio hemos observado una actividad "natural killer" deficiente en grupo de niños verticalmente infectados respecto de sus controles no infectados (Prada *et al*, 1995).

4. LA TALASEMIA MAYOR

4.1. Aspectos patofisiológicos y clínicos

La talasemia mayor es una enfermedad genética caracterizada por alteraciones en la síntesis de la cadena beta de la hemoglobina humana del adulto (Stamatoyannopoulos, 1991). Como consecuencia se genera un desbalance entre las cadenas alfa (α) y no alfa (no-α), constituyendo el mayor determinante de la severidad de la enfermedad (Flint *et al*, 1993; Forget, 1993). Las alteraciones moleculares que dan origen a la β-talasemia incluyen mutaciones puntuales y pequeñas deleciones o inserciones que pueden afectar la transcripción, el procesamiento del ARN o la traducción de la proteína, pero también puede deberse a deleciones de dos o más genes (Cao *et al*, 1994).

Como consecuencia del desequilibrio en la síntesis de las cadenas α/ no-α, hay una reducción en la cantidad de tetrámeros α2/β2 en los eritroblastos debido a la menor cantidad de cadenas β y una acumulación de cadenas α. Este exceso es la mayor causa del daño celular y de las anormalidades hematológicas. En la sangre de los individuos talasémicos se observan eritrocitos hipocrómicos, con variación de tamaño y forma, fragmentos eritrocitarios y un aumento en el número de células rojas nucleadas. La destrucción de los eritrocitos en los β-talasémicos se debe a la acumulación de cadenas α que se observan como cuerpos de inclusión. Estos cuerpos reducen la flexibilidad de la membrana de los eritrocitos, dificultando su circulación por espacios estrechos, y la perforan. El proceso de formación de los cuerpos de inclusión ocurre no solo en los eritrocitos circulantes, sino también en los proeritroblastos de médula ósea; su destrucción conlleva a una eritropoyesis inefectiva. Por lo tanto, los pacientes talasémicos padecen de una anemia crónica y requieren como tratamiento paliativo transfusiones sanguíneas en forma regular durante toda su vida. Como consecuencia de las múltiples transfusiones, presentan una sobrecarga de hierro que determina su acumulación en diversos tejidos. La

deposición de hierro en el bazo provoca con el tiempo un aumento de su tamaño que frecuentemente requiere la esplenectomía. La hemocromatosis irreversible en hígado y corazón es finalmente la causa de muerte, generalmente en edades tempranas. Paradójicamente los pacientes con talasemia mayor presentan un marcado aumento de la absorción de hierro a nivel intestinal.

Bajo condiciones normales, el hierro se encuentra unido a proteínas que poseen alta afinidad por este metal: transferrina, lactoferrina y ferritina. La transferrina se encuentra en suero y líquido cefalorraquídeo; la lactoferrina está presente en las secreciones corporales. Ambas proteínas facilitan el transporte del hierro en el organismo. La ferritina se encuentra en el citoplasma de las células y está vinculada a la acumulación intracelular de hierro. A medida que la carga de hierro aumenta ya sea por transfusiones o por absorción intestinal, la transferrina se satura en un 90% o más. Existe un pool de hierro libre circulante presente exclusivamente en los pacientes con sobrecarga de hierro cuya transferrina sérica está saturada, del cual se desconoce con exactitud su origen (McDonagh & Nienhuis, 1993; Kontoghiorghes & Weinberg, 1995).

Aparentemente el daño celular descripto en diferentes tejidos es el resultado de la oxidación de los componentes de las membranas, catalizada por el exceso de hierro. Diferentes autores han postulado que el daño hepático en los pacientes con sobrecarga de hierro se debería a la acción de las enzimas hidrolíticas que se liberan de los lisosomas al aumentar la fragilidad de su membrana (Frigerio *et al*, 1984; Mak & Weglicki, 1985). La peroxidación de las membranas mitocondrial y microsomal en hígado fue demostrada *in vivo* en ratas con administración crónica de hierro por vía oral y parenteral (Bacon *et al*, 1983), y en el bazo de pacientes talasémicos (Heys & Dormandy, 1981). La peroxidación de los lípidos de membrana inducen alteraciones funcionales que son parcialmente revertidas por vitamina E y deferoxamina (Hershko *et al*, 1987). Más aún, el hecho de que los niveles de vitamina E, un potente antioxidante, en el suero y glóbulos rojos de pacientes talasémicos avala la hipótesis del daño celular mediada por radicales libres (Rachmilewitz *et al*, 1976; Miniero *et al*, 1983).

4.2. Criterios para el diagnóstico de β-talasemia

El diagnóstico de β-talasemia se realiza habitualmente entre los 6 meses y 2 años de edad, cuando la anemia fisiológica del recién nacido no es superada. El defecto en la síntesis de la cadena β de la globina se manifiesta cuando la hemoglobina fetal (Hb F) debe ser reemplazada por la hemoglobina del adulto (Hb A). Ocasionalmente la enfermedad puede pasar desapercibida hasta los 3-5 años, dado que la deficiencia en la producción de Hb A es compensada parcialmente por una prolongación en la producción de Hb F. En su presentación, los niños talasémicos presentan un crecimiento y desarrollo más lento y agrandamiento abdominal.

La β-talasemia puede distinguirse fácilmente de otras anemias hemolíticas congénitas por una serie de parámetros de laboratorio. Al momento del diagnóstico, el patrón de corrida electroforética revela un 20-100% de Hb F, 2-7% de Hb A_2 y 0-80% de Hb A, dependiendo del genotipo exacto del paciente. El recuento de reticulocitos es característicamente bajo, menos del 1%. Este hecho es consistente con la marcada deficiencia a nivel de la eritropoyesis y la esplenomegalia. El volumen corpuscular medio de los glóbulos rojos es inferior al normal y el contenido de hemoglobina por célula puede alcanzar valores tan bajos como 12-18 pg/glóbulo rojo. La hematopoyesis aumentada puede verse reflejada por un aumento en el recuento leucocitario. Esta leucocitosis se distingue de la ocasionada por procesos infecciosos ya que el recuento diferencial es normal. Los valores de hierro y ferritina en el suero se encuentran marcadamente elevados y la saturación de la transferrina es superior al 80% (McDonagh & Nienhuis, 1993).

4.3. Alteraciones inmunológicas en los pacientes con talasemia mayor

Una de las complicaciones de esta enfermedad es el aumento de la susceptibilidad a ciertas infecciones. Diferentes autores han observado una mayor incidencia de infecciones por *Yersinia enterocolítica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Listeria monocytogenes* (Wasi, 1971; Melby *et al*, 1982; Van Asbeck *et al*, 1982; Gordts *et al*, 1984). Las septicemias relacionadas con estos patógenos son poco frecuentes y han sido previamente descriptas en pacientes con cuadros asociados a un exceso de hierro como en hemocromatosis, cirrosis, intoxicación con hierro. Asimismo, los pacientes talasémicos presentan un mayor riesgo e incidencia de infecciones virales como hepatitis B, C, infección con HIV, debido a las múltiples transfusiones sanguíneas que reciben (De Virgiliis *et al*, 1980; Clemente *et al*, 1994; Kumar *et al*, 1994).

Los pacientes con talasemia mayor presentan defectos inmunes secundarios, generalmente atribuídos a la estimulación antigénica alogeneica y a la sobrecarga de hierro que resultan del tratamiento hipertransfusional; este deterioro inmunológico es progresivo con la evolución de la enfermedad y la esplenectomía (Gascon *et al*, 1984; Ballart *et al*, 1985; Mandalenaki-Lambrou *et al*, 1987; Ballart *et al*, 1988; De Sousa, 1989; Seri *et al*, 1989).

Al evaluar el estado del sistema inmune de pacientes con talasemia mayor, se han encontrado tanto alteraciones cuantitativas en las subpoblaciones linfocitarias (Kapadia *et al*, 1980; Guglielmo *et al*, 1984; Akbar *et al*, 1985; Grady *et al*, 1985; Dwyer *et al*, 1987; Pardalos *et al*, 1987; khalifa *et al*, 1988) como defectos funcionales en la citotoxicidad natural (Neri *et al*, 1984; Goicoa *et al*, 1987; Goicoa *et al*, 1992), diferenciación de los linfocitos B (Akbar *et al*, 1985; Nualart *et al*, 1987), en la colaboración T-B (Nualart *et al*, 1987) y en la respuesta linfoproliferativa frente a mitógenos (Dwyer *et al*, 1987).

El defecto de las células fagocíticas de pacientes con talasemia mayor es amplio e involucra tanto a los neutrófilos como a los monocitos y macrófagos. En nuestro laboratorio observamos que la capacidad de los neutrófilos de migrar bajo capa de

agarosa en respuesta a factores quimiotácticos es normal, mientras que la quimiotaxis medida en cámara de Boyden se encuentra disminuída (Testoni *et al*, 1990; Palacios *et al*, 1993), coincidentemente con lo descripto por Khan *et al* (1977). Por otra parte, Martino *et al* (1984) demostraron una menor producción de anión superóxido en neutrófilos estimulados con zymosan opsonizado, mientras que ésta aumenta en los neutrófilos de los mismos pacientes en ausencia de estímulo o tratados con PMA. La generación de anión superóxido en las células sin estimular se correlaciona con los niveles de ferritina sérica. Al evaluar la capacidad de fagocitar y destruir *C. albicans* y *C. pseudotropicalis*, encontramos que la ingestión es normal mientras que la actividad lítica se encuentra disminuída (Giuntoli *et al*, 1984). En otro estudio, Cantinieaux *et al* (1987) examinaron la fagocitosis de levaduras, la activación del estallido respiratorio a través de la prueba de reducción del azul de tetrazolium (NBT) y la ingestión y lisis de *Escherischia coli*. En ambos casos la fagocitosis se encuentra disminuída, mientras que no existen diferencias significativas en la reducción del NBT y la destrucción de *E. coli*. Khalifa *et al* (1983) también observaron una reducción en la capacidad de fagocitar *S. typhi*, que se acentúa con la esplenectomía. Por otra parte, en nuestro laboratorio demostramos que los monocitos periféricos de individuos con talasemia mayor presentan una actividad candidacida deficiente, con una disminución en la generación de metabolitos tóxicos del oxígeno, que se correlacionan en forma inversa con la edad de los pacientes y los niveles de ferritina en el suero; la actividad fagocítica, en cambio, se encuentra conservada (Ballart *et al*, 1986). Todos estos estudios sugieren que las alteraciones funcionales de los fagocitos en la β-talasemia podrían estar causadas por las múltiples transfusiones recibidas a través de la sobrecarga de hierro.

4.3. Terapia con agentes quelantes de hierro

La mayoría de los individuos β-talasémicos politransfundidos reciben tratamiento con agentes quelantes de hierro como la deferoxamina. La aplicación subcutánea de

deferoxamina ha demostrado disminuir efectivamente la carga de hierro del organismo, reduciendo la incidencia de complicaciones cardíacas, endócrinas y hepáticas en estos pacientes (Hoffbrand & Wonke, 1989; Cohen, 1990; Hershko *et al*, 1990).

La deferoxamina es una hidroxilamina con alta afinidad por el hierro. Esta droga penetra en las células, captura el hierro y aparece en suero o bilis como feroxamina (McDonagh & Nienhuis, 1993).

El efecto de esta droga sobre el sistema inmune es controvertido. Speer *et al* (1990) analizaron distintos aspectos de la respuesta inmune en un grupo de niños talasémicos tratados con deferoxamina, encontrando que todos los parámetros evaluados se comportaban en forma similar a los controles normales. Por el contrario, otros autores han sugerido que la deferoxamina interfiere con la activación de los linfocitos T, inhibiendo la expresión de los receptores para IL-2 (Carotenuto *et al*, 1986; Polson *et al*, 1990).

En algunos casos, los pacientes con terapia quelante reciben suplemento con vitamina C y ácido fólico. El rol de la vitamina C en el metabolismo del hierro y en el efecto de la terapia quelante es complejo y controvertido. Los pacientes con sobrecarga de hierro son deficientes en vitamina C debido a su acelerado catabolismo. La adrninsitración de vitamina C aumenta la excreción de hierro urinario y los niveles de hierro y ferritina en el suero, y la peroxidación lipídica. Desde el punto de vista clínico, los pacientes talasémicos suplementados con vitamina C pueden presentar complicaciones cardíacas que revierten al suspender el tratamiento. Estos pacientes también pueden presentar una deficiencia de ácido fólico debida a una disminución en la absorción y un aumento en la demanda por parte de la médula ósea. Para compensar esta deficiencia, los pacientes talasémicos son tratados con dosis diarias de ácido fólico (McDonagh & Nienhuis, 1993).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Las alteraciones del sistema inmune específico en inmunodeficiencias secundarias ha sido exhaustivamente estudiado en las últimas décadas. Si bien el sistema monocito-macrófago cumple un rol esencial en la regulación de la respuesta inmune, existen muchos menos reportes acerca de su funcionalidad en estas patologías. Por esta razón, durante los últimos años nos hemos dedicado a evaluar la funcionalidad del sistema monocito-macrófago en pacientes con patologías asociadas a inmunodeficiencias secundarias, como la infección por HIV (Estevez *et al*, 1986), la lepra (Estevez *et al*, 1979), la talasemia mayor (Ballart *et al*, 1986) y la enfermedad de Hodgkin (Estevez *et al*, 1980). Nuestros estudios han estado dirigidos principalmente a la evaluación de la actividad microbicida oxígeno dependiente en los monocitos circulantes de estos pacientes. El objetivo general de este trabajo fue estudiar los mecanismos microbicidas oxígeno independientes, en especial la fusión fagolisosomal, en los monocitos periféricos de individuos que padecen enfermedades asociadas a inmunodeficiencias secundarias. Para ello seleccionamos dos modelos de inmunodeficiencias secundarias, en los cuales el agente etiológico fuera claramente diferente: la infección por el HIV y la talasemia mayor.

5.2. Finalidades específicas

a) Estudiar la fusión fagolisosomal en los monocitos de sangre periférica de pacientes adultos y niños infectados con el HIV y establecer si ambas poblaciones siguen un patrón común en relación a dicha función.

b) Teniendo en cuenta que se ha postulado que las alteraciones funcionales de las células inmunocompetentes en la infección por HIV podría deberse a la presencia no solo

del virus completo sino también a factores solubles del HIV-1, quisimos evaluar el efecto de diferentes componentes del HIV-1 sobre la fusión fagolisosomal normal.

c) Estudiar la fusión fagolisosomal en monocitos de sangre periférica de pacientes con talasemia mayor.

d) Dado que el deterioro inmunológico observado en los pacientes talasémicos ha sido atribuído a la sobrecarga de hierro por las múltiples transfusiones sanguíneas que reciben, deseamos evaluar el rol del hierro en la alteración de la fusión fagolisosomal.

e) Establecer si la alteración de la fusión fagolisosomal observado en ambos modelos de inmunodeficiencias secundarias puede o no deberse a un mecanismo común.

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO II

1. GRUPOS EXPERIMENTALES

1.1. Pacientes infectados con el HIV

Se estudiaron 20 sujetos adultos infectados con el HIV, 3 mujeres y 17 varones, con edades comprendidas entre 19 y 48 años. En todos los casos, el diagnóstico se realizó por la detección de anticuerpos anti-HIV y Western blot.

Estudiamos también 83 niños nacidos de madres infectadas con el HIV, con edades comprendidas entre 1 mes y 8 años, que concurren al Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan". Para el diagnóstico de infección por HIV seguimos las pautas establecidas por el CDC (Center for Disease Control, 1987). Los niños menores de 18 meses de edad se consideraron infectados con el HIV al obtener resultados positivos en dos determinaciones separadas de PCR, cocultivo celular y/o determinación de antígeno p24. Los niños de 18 meses de edad o mayores se consideraron infectados con dos determinaciones positivas de PCR y/o la persistencia de anticuerpos anti-HIV en suero. De esta manera, nuestro grupo se dividió en 45 niños infectados con el HIV y 38 niños no infectados, nacidos de madres serológicamente positivas.

1.2. Pacientes con talasemia mayor

En una primera etapa estudiamos 15 pacientes con talasemia mayor, 6 mujeres y 9 varones, con edades entre 2 y 23 años. Todos los pacientes se encontraban bajo régimen de hipertransfusión para mantener los niveles de hemoglobina en 10 g/dl. El diagnóstico de talasemia mayor se realizó en el Servicio de Hematología del Hospital de Niños "Ricardo Gutiérrez" según técnicas hematológicas estándar, análisis de hemoglobina y estudios familiares. Las muestras de sangre se obtuvieron en el momento previo a ser transfundidos.

Solo 3 pacientes recibían deferoxamina (25-45 mg/kg/día por infusión subcutánea). En la tabla 1 se detallan los antecedentes infecciosos previos de este grupo, aunque al momento del estudio ninguno de los pacientes presentaba cuadros infecciosos. Los pacientes 1, 8 y 10 fallecieron por insuficiencia cardíaca. Estudiamos también 10 padres de pacientes talasémicos, considerados portadores de un alelo talasémico: 6 mujeres y 4 varones, con edades comprendidas entre 23 y 50 años.

En una segunda etapa estudiamos 10 pacientes con talasemia mayor, 3 mujeres y 7 varones, con edades entre 3 y 18 años. El diagnóstico de talasemia mayor y el seguimiento de estos pacientes se realiza en el Servicio de Hemato Oncología del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan". De los 10 pacientes estudiados, 9 se encuentran bajo régimen de hipertransfusiones, mientras que el restante recibe transfusiones esporádicas. Todos los pacientes de este grupo se encuentran vacunados contra el virus de hepatitis B y reciben ácido fólico (2 mg/día), vitamina C (50 mg/día) y terapia quelante. La dosis de deferoxamina suministrada se encuentra en relación con los niveles de ferritina sérica, según se detalla en la Tabla 2.

Todos los pacientes de este grupo tienen serología positiva para CMV y el paciente 20 es Chagas positivo. Ninguno de los pacientes estudiados presentaban cuadros infecciosos al momento del estudio. En todos los casos, las muestras se obtuvieron con el consentimiento de los padres.

1.3. Controles normales

Se estudió un total de 126 controles normales adultos, 36 mujeres y 90 varones, con edades comprendidas entre 18 y 65 años. Los dadores de sangre se obtuvieron de los bancos de sangre del Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano Castex", Academia Nacional de Medicina y del Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan".

TABLA II.1. Antecedentes infecciosos de los pacientes talasémicos.

PACIENTE	INFECCIONES
3	hepatitis C
4	hepatitis B
7	hepatitis B
8	hepatitis C angina (S. viridans) candidiasis (C. albicans) meningitis viral
14	hepatitis C infección por CMV
15	infección viral (hospitalizado 3 veces)

Los pacientes están numerados como en la Tabla III.6

TABLA II.2. Dosis de deferoxamina suministrada de acuerdo a la ferritina sérica.

ferritina sérica (ng/ml)	deferoxamina (mg/kg/día)
< 2000	25
2000-3000	35
> 3000	55

Se estudiaron también 16 controles normales pediátricos, 4 mujeres y 12 varones, con edades comprendidas entre 16 meses y 13 años, con una mediana de 8 años. Las muestras se obtuvieron en el Hospital de Pediatría "Juan P. Garrahan", con el consentimiento de los padres. Ninguno de los niños incorporados como controles presentaban enfermedades infecto-contagiosas, autoinmunes o asociadas a trastornos inmunológicos. Los principales motivos de consulta fueron por problemas oftalmológicos, fracturas e implantaciones de prótesis traumatológicas.

Los controles normales fueron distribuídos en cada experiencia de acuerdo a como se detalla en el Capítulo III, Resultados.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtención de leucocitos mononucleares a partir de sangre periférica

La sangre se obtiene por punción venosa utilizando heparina o EDTA como anticoagulante. Las células mononucleares se separan por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (d=1.077). La fracción rica en células mononucleares se recoge, se lava y se resuspende en solución salina balanceada de Hanks (HBSS) para hacer el recuento en cámara de Neubauer.

2.2. Aislamiento y cultivo de monocitos

Las células mononucleares totales obtenidas se cultivan en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal (SBF) 10% y 1% de antibiótico-antimicótico (10000 U/ml de penicilina G sódica, 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina y 25 μg/ml de anfotericina B). Los cultivos se realizan sobre cubreobjetos de vidrio en placas de 24 pocillos durante 24 o 48 hs a 37°C en atmósfera humedificada con 5% de CO_2. Las células no adherentes se remueven con HBSS tibio. Los fagocitos mononucleares se identifican por la presencia de alfa naftil acetato esterasa (ANAE), observándose un 95% de células reactivas.

2.3. Demostración de alfa naftil acetato esterasa (ANAE)

La demostración citoquímica de ANAE se basa en la capacidad de esta enzima de liberar grupos aromáticos de los ésteres que son sus sustratos específicos para dar

un complejo coloreado observable al microscopio óptico por medio de una reacción de copulación de sales de diazonio.

Los cultivos se fijan con una solución acuosa de citrato de sodio y acetona, durante 2 min a temperatura ambiente. Luego los cubreobjetos se colocan en la solución colorante (Tris-maleato, sal de diazonio Fast Blue RR Salt, naftil AS-BI acetato diluído en etilenglicol) durante 30 min, protegidos de la luz, a 37°C. Después de la incubación se lavan con agua corriente y se cubren con hematoxilina de Mayer durante 10 min. Se vuelve a lavar y se deja secar al aire. Se observa al microscopio óptico con objetivo de 100X.

La positividad de esta enzima se manifiesta en todo el sistema fagocítico mononuclear como una granulación negra que cubre todo el citoplasma.

2.4. Estudio de la fusión fagolisosomal

Basándonos en la técnica descripta por Kielian en macrófagos peritoneales murinos (1986), adaptamos el método para la evaluación de la fusión fagolisosomal en monocitos humanos (Pittis et al, 1993). Las células adherentes se lavan suavemente con HBSS tibio y se agrega a cada pocillo 0.5 ml de una suspensión de levaduras ($2x10^6$ partículas/pocillo) opsonizado con 10% de un pool de suero normal. Las placas se centrifugan inmediatamente a 1800 rpm durante 3 min para favorecer el contacto de las levaduras con la superficie celular, se lavan y se agrega 1 ml de HBSS a cada pocillo, incubando durante 30 o 60 min a 37°C. Bajo estas condiciones se puede considerar que la fagocitosis de las partículas unidas a la superficie celular ocurre en forma sincronizada. Luego se aspira el líquido de cada pocillo y se agrega 1 ml de una solución de naranja de acridina (NA) 4 μg/ml. Las placas se mantienen a 37°C en oscuridad durante 5 min. Los cubreobjetos se lavan con buffer fosfato salino (PBS) frío, se montan invertidos sobre portaobjetos y se observan en el microscopio óptico por contraste de fase y fluorescencia con objetivo de 100X. El NA es un colorante

metacromático que da una coloración naranja cuando está concentrado y verde cuando está diluído. Las partículas fagocitadas de color naranja se consideran positivas para la fusión fagolisosomal y las partículas fagocitadas de color verde se consideran negativas. El porcentaje de fusión fagolisosomal se calcula como el número de partículas fusionadas sobre el número total de partículas fagocitadas por cien, en un total de 100 o más monocitos analizados. Las determinaciones se realizan por duplicado o triplicado.

2.4.1.Preparación de las partículas de levaduras

Siguiendo el procedimiento de Lachman y Hobart (1978), las levaduras frescas se resuspenden en PBS, se autoclavan durante 30 min a 120°C, se centrifugan y se lavan con PBS hasta obtener un sobrenadante claro. Luego se resuspenden en PBS-β-mercaptoetanol 0.1 M y se incuban a 37°C con agitación durante 2 hs. Las levaduras se centrifugan y se lavan una vez con PBS para remover el mercaptoetanol. Se resuspenden en una solución NaCl 0.85%, buffer fosfato 10 mM pH 7.2, iodoacetamida 30 mM y se incuban a temperatura ambiente con agitación durante 2 hs. Se centrifugan, se lavan tres veces con PBS y se autoclavan durante 30 min a 120°C. Nuevamente se centrifugan y se lavan con PBS hasta obtener un sobrenadante claro. Finalmente se prepara una suspensión de levaduras 50% v/v en PBS con NaN_3 0.02% y se conserva a 4°C.

2.5. Estudio de la capacidad fagocítica y lítica

Como partícula blanco se emplea *Candida tropicalis*. Las cándidas se siembran en agar glucosado de Sabouraud y se cosechan aproximadamente 18 hs después. Se resuspenden en HBSS, se ajusta la concentración a 10^6 cándidas/ml y se opsonizan

con 10% de un pool de suero normal. Se agrega 0.5 ml de esta suspensión a cada pocillo que contiene los cubreobjetos con los monocitos adheridos y se incuban a 37°C durante 30 min. Luego los cubreobjetos se lavan para eliminar las cándidas excedentes, se dejan secar al aire y se colorean con Giemsa. La actividad fagocítica se determina como el número total de cándidas fagocitadas por 100 células. La actividad lítica se expresa como porcentaje de cándidas lisadas (imágenes fantasma que no toman la coloración de Giemsa) en relación al total de cándidas ingeridas (Ballart et al, 1987).

2.6. Estudio de las poblaciones linfocitarias

2.6.1. Detección de antígenos de membrana con anticuerpos monoclonales

La detección de los antígenos de membrana CD4 y CD8 se realiza por inmunofluorescencia indirecta. Las células mononucleares totales ($3x10^6$ células) se incuban con 20 µl del anticuerpo monoclonal en prueba durante 30 min a 4°C. Luego se lavan y se agrega 20 µl del anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón marcado con fluoresceína (dilución 1:20) durante 30 min a 4°C. Las células se montan entre porta y cubreobjetos y se observan al microscopio de fluorescencia con objetivo de 100X. Los valores normales en sangre periférica para sujetos adultos sanos son: para CD4, 40-60% y para CD8, 20-35%.

2.6.2. Formación de rosetas E 4°C

Los linfocitos T poseen en su membrana la molécula CD2 capaz de ligar glóbulos rojos de carnero (GRC), lo que que permite que formen con ellos rosetas espontáneas llamadas rosetas E. Los linfocitos T normales de sangre periférica forman

rosetas a 4°C. Las células mononucleares totales ($5x10^6$ células) se incuban con 100 µl de reactivo para rosetas durante 5 min a 37°C. Luego se llevan a 4°C durante 3 hs. Las células se montan entre porta y cubreobjetos y se observan en el microscopio óptico con objetivo de 40X. Se considera como roseta a todo linfocito que posea tres o más GRC adheridos a su membrana. El rango normal para adultos normales en sangre periférica es de 50-75%.

2.7. Detección de la infección por HIV por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

2.7.1. Preparación de las muestras para amplificación del ADN

Las células mononucleares aisladas de sangre periférica ($1x10^6$ células) se lavan con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}, se centrifugan y se resuspenden en 50 µl de una solución de Tris-Cl 5mM pH 8.3, Tween-20 0.5% y Tritón 0.5%. Luego las muestras se tratan con una solución de proteinas K (PK) (concentración final, 120 µg/ml) durante 60 min a 60°C, seguidas de una incubación a 95 °C para inactivar la PK. Las muestras se conservan a -20°C.

2.7.2. Amplificación del ADN por PCR

La reacción de PCR se utiliza para la amplificación de los genes *gag* y *env* del HIV-1, y la amplificación de una secuencia compartida entre el HIV-1 y el HIV-2 (Ou *et al*, 1988). Paralelamente como control se amplifica una región del HLA-DQ. Para ello se utilizan los siguientes pares de primers: SK38 y SK39 (*gag*); SK68 y SK69 (*env*); SK431 y SK145 (HIV-1/HIV-2); GH26 y GH27 (HLA-DQ).

La mezcla de reacción (50 µl) contiene buffer para PCR (Tris-Cl 30 mM, $MgCl_2$ 50 mM, KCl 30 mM) , dNTPs 200 µM, $MgCl_2$ 2.5 mM, 20 pmoles de cada uno de los primers, 2.5 U de Taq polimerasa y 20 µl de la muestra. La mezcla se somete a 35 ciclos repetitivos: desnaturalización a 95°C durante 1 min, apareamiento de los primers a 55°C durante 1 min, extensión de la cadena de ADN con la Taq polimerasa a 72°C seguido por un enfriamiemto rápido a 4°C. Esto se realiza en un termociclador de ADN Perkin-Elmer/Cetus. Los productos de PCR se visualizan en geles de poliacrilamida al 10%, previa hibridización con la sonda correspondiente y en el caso del fragmento amplificado correspondiente al HLA-DQ se utilizan geles de agarosa 1.2%.

2.7.3. Marcación de oligonucleótidos por fosforilación

Las sondas para la detección del ADN del HIV constituyen oligonucleótidos cuyas secuencias sean internas al segmento de ADN del provirus amplificado por PCR. La marcación de la sonda se realiza utilizando γ-ATP ^{32}P en presencia de la polinucleótido quinasa T4 con ditiotreitol (DTT) y el buffer adecuado para la quinasa incubándolo a 37°C entre 60 y 120 min. El radioisótopo libre se elimina a través de una columna G-50 y luego se calcula la concentración de la sonda marcada.

2.7.4. Técnica de hibridización líquida

La sonda marcada se incuba con una alícuota del producto amplificado por PCR a 94°C por 4 min seguido por una incubación a 55°C durante 15 min. Las sondas utilizadas fueron: SK19 (*gag*), SK70 (*env*) y SK102 (HIV-1/HIV-2). La reacción se interrumpe agregando 10 µl de una mezcla 4:6 de EDTA 0.1 M y buffer de corrida 10x. Se toman alícuotas de los productos hibridizados para analizarlas en geles de poliacrilamida al 10%.

2.7.5. Electroforesis en geles de agarosa

Para la identificación del fragmento amplificado correspondiente al HLA-DQ se realiza una electroforesis en gel de agarosa 1.2% con 0.5 μg/ml de bromuro de etidio. Los productos de PCR fueron sembrados con buffer de siembra azul de bromofenol 0.042%, glicerol 5%. Para verificar el tamaño del fragmento amplificado, se incluyó un marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó a 55 mAmp, en buffer TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM). La visualización de los fragmentos se hizo sobre un transiluminador UV.

2.7.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los productos amplificados correspondientes a secuencias específicas del ADN viral se identifican en geles de poliacrilamida al 10%. Los productos de PCR se siembran con buffer azul de bromofenol 0.042%, xileno cianol 0.042%, glicerol 5%. La electroforesis se realiza a 20 mAmp en una minicuba vertical, con buffer TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 2 mM). Los resultados se visualizan por autorradiografía luego de exponer los geles a una placa radiográfica a -70 °C durante toda la noche.

2.8. Cultivo de linfocitos para aislamiento viral

Las células mononucleares totales de sujetos normales se cultivan en medio RPMI 1640 con 10% SBFy 1% fitohemoaglutinina (PHA) durante 48-72 hs a 37°C. Al segundo o tercer día de cultivo se las cocultiva con células mononucleares totales de sujetos supuestamente infectados en presencia de IL-2 (concentración final 10 U/ml). Los cocultivos se mantienen por un período de 2 a 3 semanas agregando medio

condicionado con IL-2 y linfocitos de sangre periférica de sujetos normales estimulados con PHA dos veces por semana. Para controlar la replicación viral se extraen alícuotas del sobrenadante del cocultivo celular y se determina la concentración de antígeno viral p24 (Burgard et al, 1992).

2.9. Determinación de la concentración de antígeno viral p24

La presencia de antígeno p24 se determinó en muestras de plasma o en sobrenadantes de cultivos para aislamiento viral mediante la técnica de ELISA, utilizando un kit comercial.

2.10. Tratamiento con la glicoproteína de envoltura recombinante gp120 del HIV-1

Las células adherentes se incubaron durante 24 hs a 37°C con diferentes concentraciones de gp120 recombinante en RPMI 1640, desde 0.1-1000 ng/ml. Luego los cultivos se lavaron y se determinó el porcentaje de fusión fagolisosomal.

2.11. Tratamiento con la proteína regulatoria recombinante Tat del HIV-1

Los monocitos adheridos se incubaron durante durante 24 hs a 37°C con diferentes concentraciones de Tat recombinante en RPMI 1640, desde 1 ng/ml hasta 1 μg/ml. Luego los cultivos se lavaron y se determinó el porcentaje de fusión fagolisosomal. Para verificar que el efecto de la proteína Tat fuera específico, se preincubaron 100 ng/ml de Tat con 1 μg/ml de anticuerpo monoclonal anti-Tat durante 2 hs a 37°C y luego se agregó a los cultivos de monocitos.

2.12. Tratamiento de los monocitos periféricos con hierro

Las células adherentes normales se incubaron durante 2 hs a 37°C con diferentes concentraciones de sulfato ferroso: 0.2 y 2 μM. Luego los cultivos se lavaron y se determinó el porcentaje de fusión fagolisosomal.

2.13. Tratamiento de los monocitos periféricos con deferoxamina

Las células mononucleares totales se incubaron durante 24 hs a 37°C con diferentes concentraciones de deferoxamina: 1, 5, 10 y 50 μM. Luego los cultivos se lavaron y se determinó el porcentaje de fusión fagolisosomal.

2.14. Determinación de los niveles séricos de ferritina

La ferritina sérica se determinó por la técnica de ELISA utilizando un kit comercial. Los valores normales de ferritina se encuentran entre 15 y 300 ng/ml.

2.15. Determinación de los niveles séricos de vitamina E

Las muestras de sangre fueron extraídas luego de un ayuno de 12 hs y colocadas en tubos de vidrio protegidos de la luz, dejándose exudar el suero a 37°C durante 60 min. El suero fue separado del coágulo por centrifugación e inmediatamente utilizado para su análisis.

La determinación de vitamina E se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida HPLC, utilizando una columna de fase reversa según lo descripto por Bieri et al (1979). Se utilizaron sueros estándar del Standar Reference Materials.

2.16. Determinación de malondialdehído

La determinación de malondialdehído (MDA) se realizó siguiendo la técnica modificada de Esterbauer & Cheeseman (1990). El dosaje de MDA en suero se basa en su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA), generando un pigmento cristalino rosado con máxima absorción entre 532 y 535 nm. La reacción se lleva a cabo a un pH 2-3, dado que la acidez es esencial para la formación del complejo MDA-TBA.

Brevemente, 0.4 ml del suero se precipita con 0.6 ml de ácido tricloroacético 60% durante 15 min y se centrifuga. Luego se toma 0.6 ml del sobrenadante, se le agrega 0.6 ml de TBA 0.67% p/v y se incuba a 60 °C durante 90 min. Se deja enfriar a tempratura ambiente y la lectura se realiza en un espectrofotómetro a 535 nm. Para preparar la curva estándar se utiliza 1.1.3.3.tetrahetoxipropano.

2.17. Tratamiento de los monocitos periféricos con un medio generador de radicales libres de oxígeno

Luego de 24 hs de adherencia, los monocitos normales se incubaron durante 90 min a 37°C en medio RPMI suplementado con diferentes concentraciones de xantina (1-10 μM) y xantina oxidasa (0.075 U/ml). Para bloquear completamente la formación de radicales libres de oxígeno, se agregaron simultáneamente 100 U/ml de superóxido dismutasa (SOD) que elimina al anión superóxido y 100 U/ml de catalasa para eliminar el peróxido de hidrógeno producido por la reacción catalizada por la SOD. Luego los cultivos se lavaron con HBSS y se determinó el porcentaje de fusión fagolisosomal.

3. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

Para analizar la significación estadística entre dos medias se aplicó la pueba "t" de Student para muestras no apareadas. En aquellos casos en que se analizaron en forma conjunta tres o más medias se realizó primero un análisis de la varianza, ANOVA, seguido de un procedimiento de comparaciones múltiples entre medias a través de la prueba de contraste de Bonferroni.

Para el análisis del grado de asociación entre dos variables se utilizaron las pruebas de regresión lineal y correlación.

En todos los casos, los resultados se consideraron estadísticamente significativos con $p<0.05$.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Stat Primer (Glantz, 1987).

RESULTADOS

CAPITULO III

1. FUSION FAGOLISOSOMAL EN LA INFECCION POR HIV

1.1.Estudio de la fusión fagolisosomal en pacientes adultos infectados con el HIV

Los individuos infectados con el HIV se caracterizan por un deterioro progresivo del sistema inmune, que conlleva a un estado de inmunosupresión y a la manifestación de infecciones por patógenos oportunistas. El sistema monocito-macrófago cumple un rol fundamental en la defensa del huésped y hasta el presente existen diversos estudios que demuestran alteraciones funcionales de estas células en los individuos HIV positivos. Anteriormente demostramos una reducción en los capacidad de destruir microorganismos mediada por mecanismos oxígeno dependientes en los monocitos periféricos de pacientes con SIDA (Estevez et al, 1986). Con el fin entonces de evaluar los mecanismos oxígeno independientes, estudiamos la fusión fagolisosomal de monocitos periféricos de individuos adultos infectados con el HIV. Los porcentajes de fusión, expresados como la media ± DS, luego de 30 y 60 min de la ingestión de las partículas blanco, fueron de 57.2 ± 17 y 63.2 ± 18.6, respectivamente, y para los controles normales 72.4 ± 7.8 y 77 ± 8.1 (Figura 1). Los resultados de la evaluación microscópica de la fusión fagolisosomal en monocitos circulantes normales se observa en la Figura 2. Dado que no observamos diferencias significativas entre los porcentajes de fusión fagolisosomal obtenidos luego de 30 y 60 min de incubación con las levaduras, elegimos 30 min como el tiempo conveniente para las próximas experiencias. La diferencia observada en la fusión fagolisosomal entre los individuos infectados y los controles normales no resultó estadísticamente significativa.

Sin embargo, observamos una amplia dispersión de los datos dentro del grupo de pacientes infectados (Tabla 1). Quisimos entonces investigar si la variación en la función de los monocitos podría estar o no asociada al estado inmunológico de los pacientes estudiados. Para ello analizamos el grado de correlación entre el porcentaje de fusión fagolisosomal y el número absoluto de linfocitos T CD4+ o la relación de linfocitos T

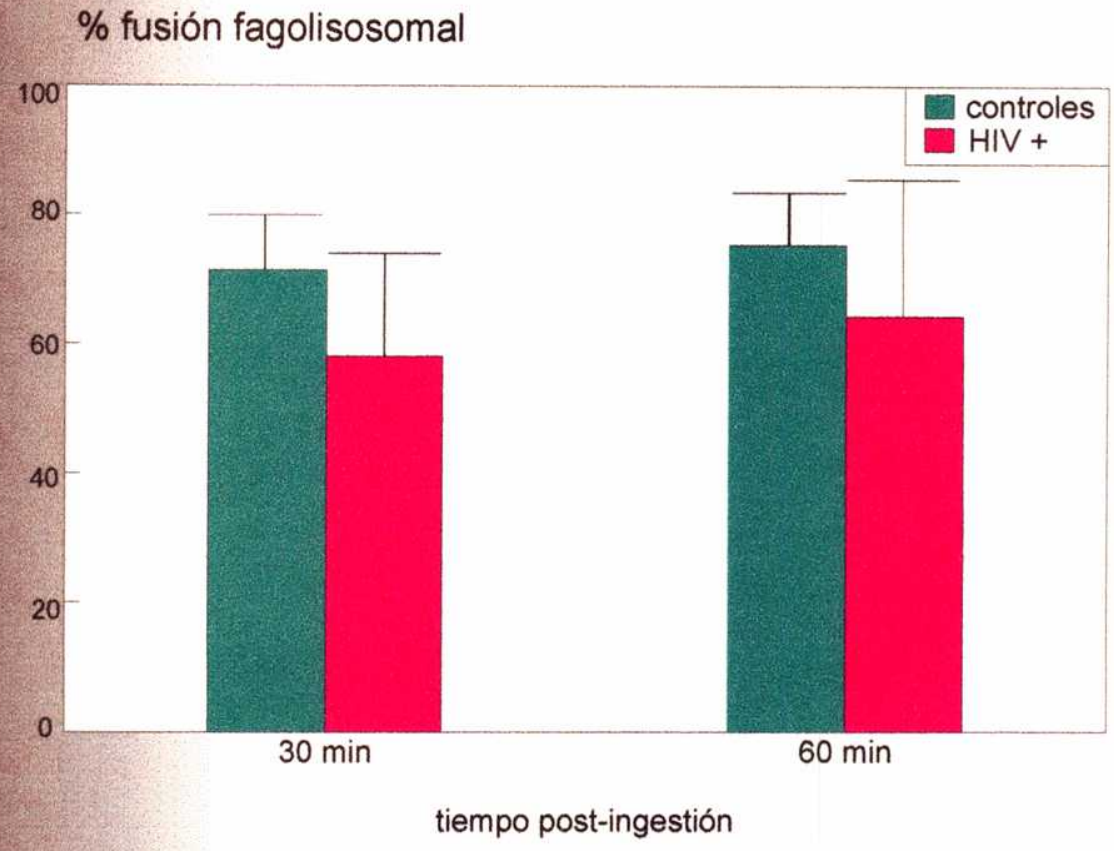

FIGURA III.1. Fusión fagolisosomal en sujetos adultos infectados con el HIV (n=20). Los datos se expresan como la media ± DS. Las diferencias observadas no son estadísticamente significativas.

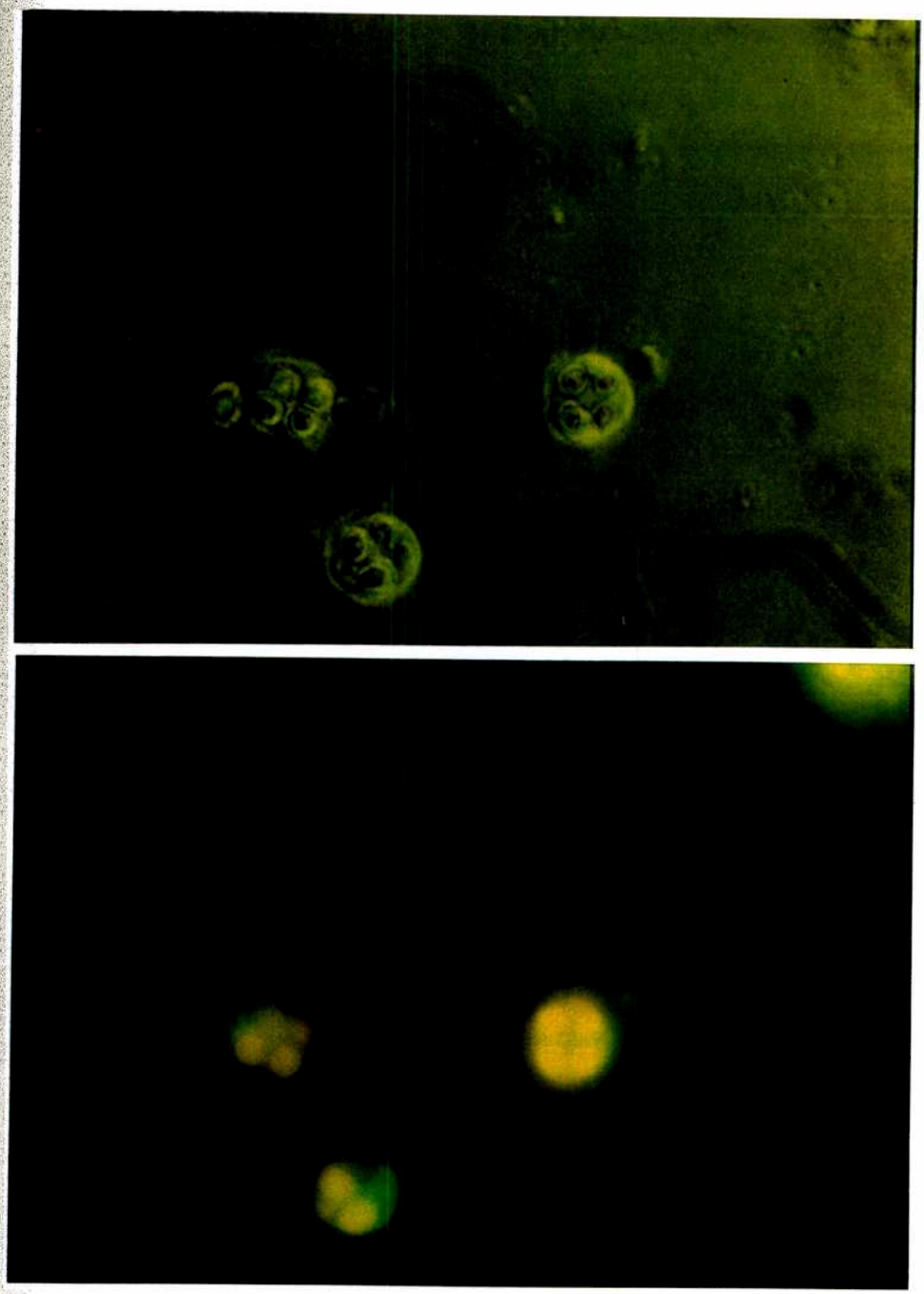

FIGURA III.2. Evaluación de la fusión fagolisosomal de monocitos normales de sangre periférica por contraste de fase*(arriba)* y por fluorescencia*(abajo)*. Las partículas naranjas se consideran positivas para la fusión y las partícuclas verdes negativas. Aumento 1000X.

TABLA III.1. Fusión fagolisosomal y poblaciones linfocitarias de los pacientes adultos infectados con el HIV.

PACIENTE	EDAD	% FUSION FAGOLISOSOMAL		CD4+/mm^3	CD8+/m^3	CD4+/CD8+
		30 min	60 min			
1	48	21.0	30. 8	263	728	0.36
2	37	45.5	ND	906	1498	0.60
3	44	38.5	40.9	120	250	0.47
4	34	74.4	85.0	1046	554	1.88
5	19	74.7	79.5	1051	472	2.22
6	30	36.3	38.6	462	498	0.92
7	25	61.7	68.9	1259	673	1.87
8	30	69.4	74.7	882	683	1.30
9	23	53.3	73.4	938	503	1.86
10	39	69.1	ND	1311	997	1.31
11	27	73.6	86.6	1231	1296	0.95
12	48	88.3	87.6	1855	905	2.04
13	43	69.6	73.5	325	866	0.37
14	34	31.4	30.5	180	548	0.32
15	26	63.6	73.8	992	483	2.05
16	40	66.8	70.1	822	548	1.50
17	40	78.9	86.9	2225	770	2.88
18	26	62.5	67.2	1813	882	2.05
19	23	45.6	50.2	556	2341	0.23
20	32	58.3	64.7	1360	646	2.10

CD4+/CD8+. Tanto el número absoluto de linfocitos T CD4+ como la relación CD4+/CD8+ son considerados parámetros útiles para evaluar la progresión de la inmunodeficiencia. La Tabla 1 muestra los resultados individuales de cada paciente estudiado. Encontramos una correlación lineal directa entre el porcentaje de fusión fagolisosomal, luego de 30 min de incubación, y el número absoluto de linfocitos T CD4+, con un $r = 0.72688$, $p<0.001$ (Figura 3). Asimismo, el porcentaje de fusión fagolisosomal, luego de 30 min de incubación, se correlaciona en forma directa con la relación linfocitaria CD4+/CD8+ con un $r=0.6756$, $p<0.01$ (Figura 4). Estos datos sugieren que la alteración de la fusión fagolisosomal de los monocitos periféricos se evidencia en estadíos tardíos de la infección por HIV y progresa a medida que disminuye la población de linfocitos T CD4+ y se invierte la relación CD4+/CD8+.

En 3 individuos del grupo de pacientes infectados con el HIV, se evaluó simultáneamente la capacidad fagocítica y lítica de monocitos periféricos frente a *Candida tropicalis* (Figura 5). En todos los casos se observó una actividad fagocítica normal, mientras que la actividad lítica se encuentra disminuída en los 2 pacientes que también presentan una alteración de la fusión fagolisosomal (Tabla 2). Estos datos están de acuerdo con nuestros hallazgos previos acerca de la incapacidad de los monocitos periféricos de pacientes infectados con HIV de destruir las cándidas (Estevez et al, 1986).

1.2. Evaluación de la fusión fagolisosomal en niños infectados con el HIV

Teniendo en cuenta la alteración de la fusión fagolisosomal monocítica en los individuos adultos infectados con el HIV, investigamos si los monocitos de niños infectados también estaban afectados y si esa alteración seguía el mismo comportamiento que en la población adulta. Para ello estudiamos la fusión fagolisosomal en los monocitos de sangre periférica de 45 niños verticalmente infectados, 38 niños no infectados nacidos de madres HIV positivas y 14 niños nacidos de madres serológicamente negativas como grupo control. Los porcentajes de fusión fagolisosomal,

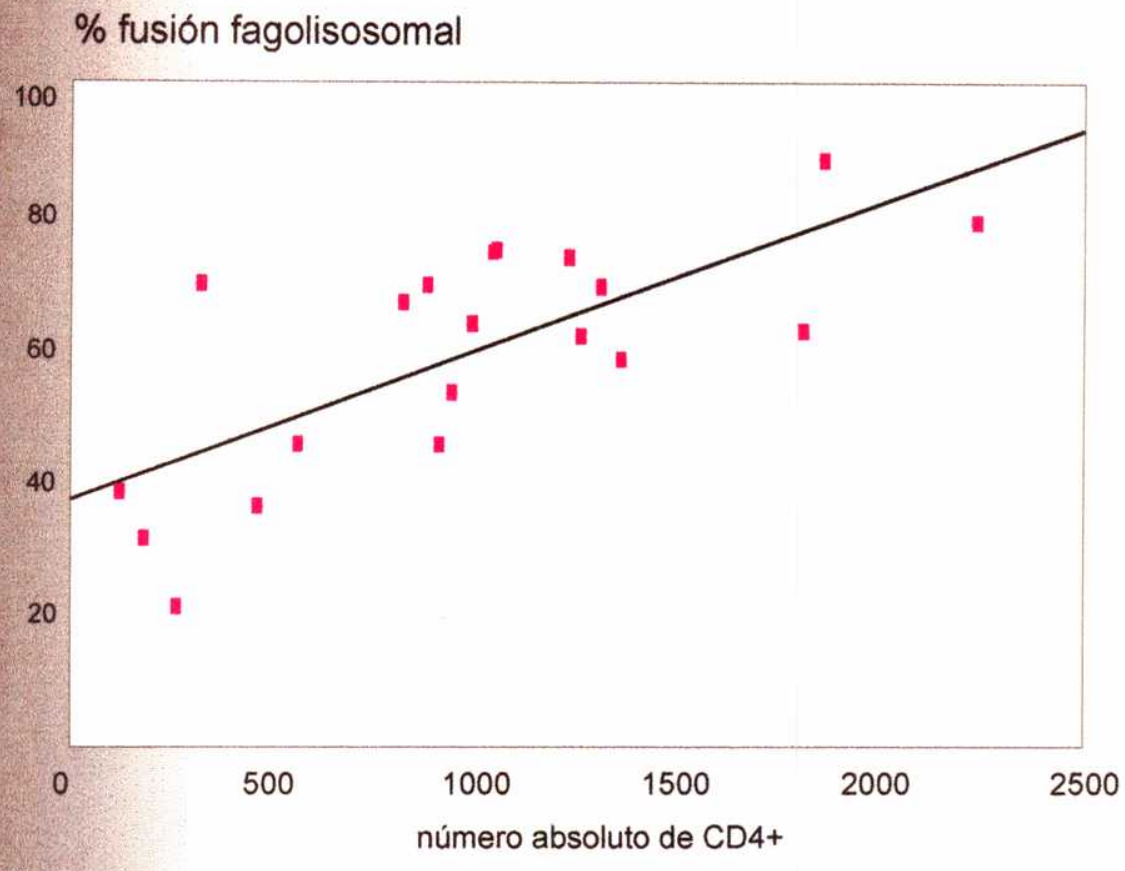

FIGURA III.3. Asociación entre el porcentaje de fusión fagolisosomal y el número absoluto de linfocitos T CD4+ en sujetos adultos infectados con el HIV (n=20). Ambas variables correlacionan en forma lineal con un $r=0.727$, $p<0.001$.

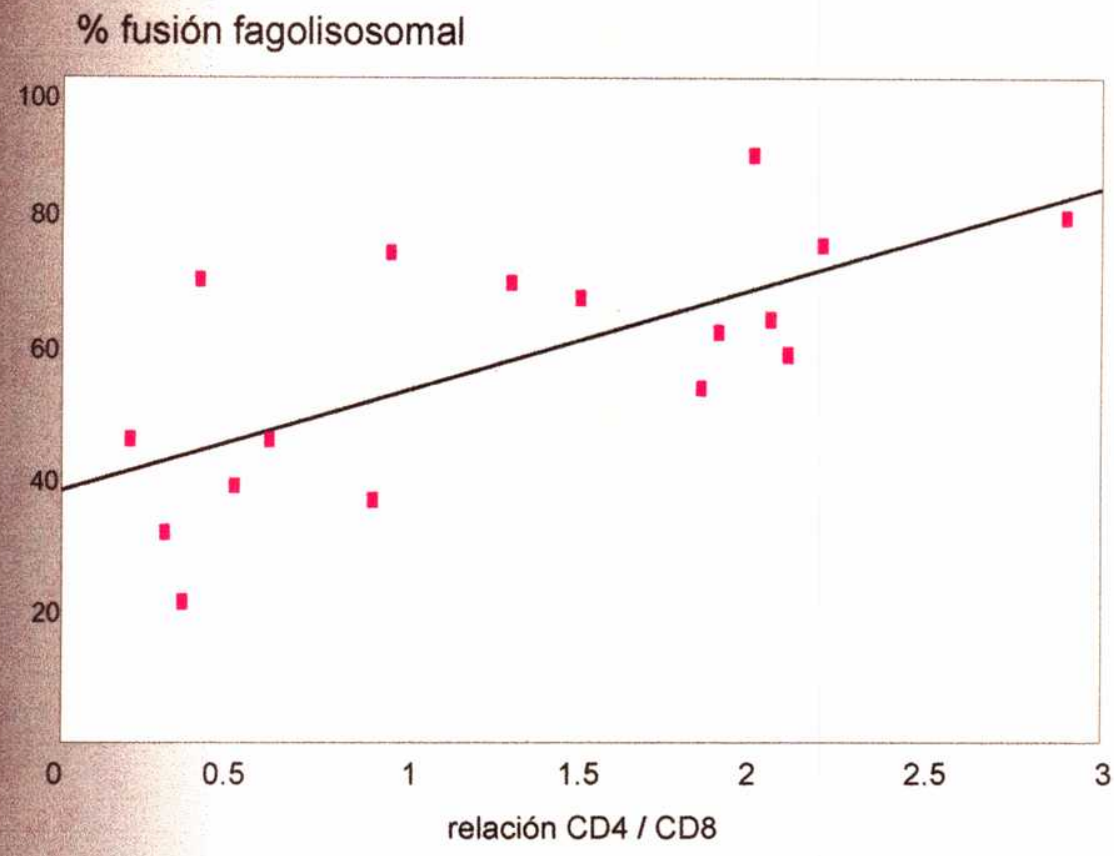

FIGURA III.4. Asociación entre el porcentaje de fusión fagolisosomal y la relación CD4+/CD8+ en sujetos adultos infectados con el HIV (n=17). Ambas variables correlacionan en forma lineal con un r=0.676, p<0.01.

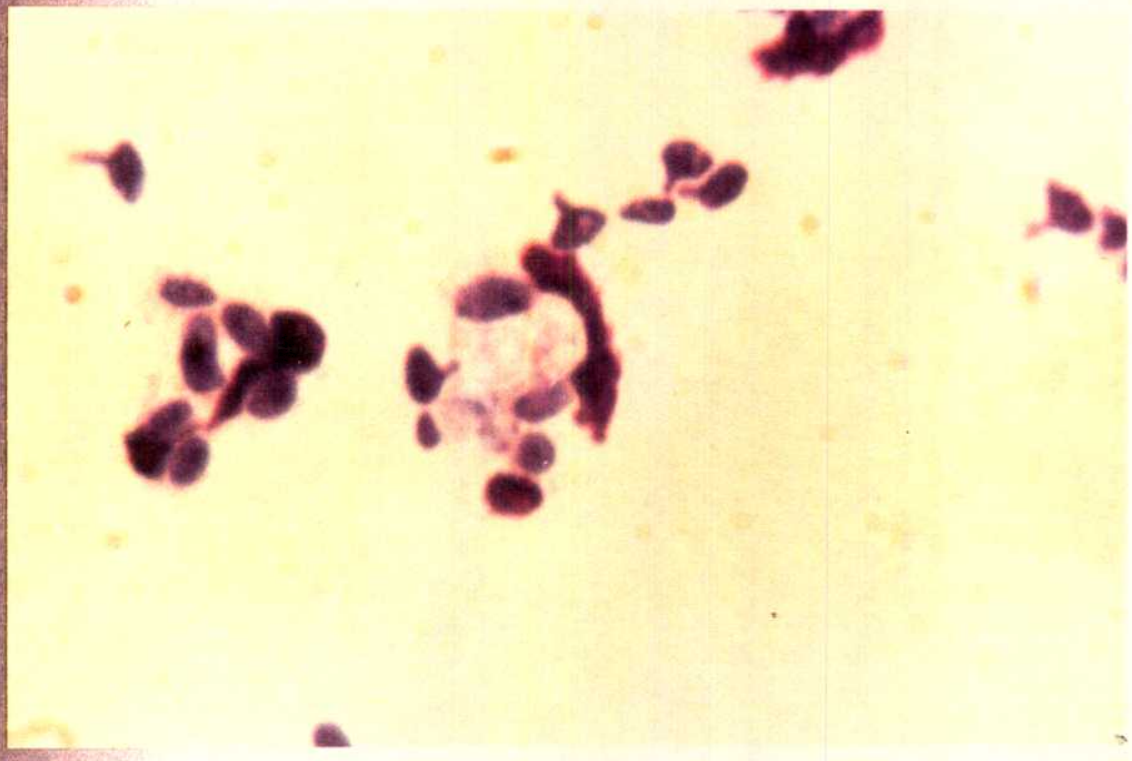

FIGURA III.5. Evaluación de la capacidad fagocítica y lítica de monocitos de sangre periférica por microscopía óptica. Las imágenes fantasma representan las cándidas lisadas. Aumento 1000X.

TABLA III.2. Actividad fagocítica y lítica de monocitos periféricos de tres pacientes HIV positivos.

PACIENTE	% FUSION FAGOLISOSOMAL		ACTIVIDAD FAGOCITICA	% LISIS
	30 min	60 min		
17	78.9	86.9	380	14.7
18	62.2	67.2	610	6.3
19	45.6	50.2	589	4.2

expresados como la media ± DS, fueron 42 ± 16.1 para los niños infectados, 55.3 ± 15.5 para los niños HIV negativos y 58.2 ± 12.7 para los controles normales (Figura 6). La fusión fagolisosomal monocítica de los niños infectados resultó significativamente menor en comparación con los niños no infectados y los controles normales ($p<0.001$), mientras que los últimos dos grupos no difirieron entre sí. Estos resultados sugieren que la infección con el HIV es capaz de alterar la fusión fagolisosomal de los monocitos circulantes.

Basados en estos resultados y dado que todos los niños HIV positivos incluídos en este estudio adquirieron la infección por transmisión vertical, consideramos la edad de los pacientes como el período de infección. Luego evaluamos si la alteración de la fusión fagolisosomal podría estar o no relacionada con la edad de los pacientes. Para ello dividimos el grupo de niños infectados con el HIV, en menores de 18 meses de edad y de 18 meses o mayores. Como se observa en la Figura 7, dentro del grupo de niños no infectados no se observan diferencias con la edad. Nuevamente se puede ver que la fusión fagolisosomal en los niños infectados con el HIV es significativamente menor que en los niños no infectados para ambos grupos etarios. Mas aún, los niños infectados de 18 meses de edad o mayores presentan una fusión fagolisosomal significativamente disminuída respecto de los niños infectados menores de 18 meses ($p=0.001$). Estos resultados sugieren que la fusión fagolisosomal en los niños infectados con el HIV se encuentra disminuída y progresivamente deteriorada con el tiempo de infección crónica.

Asimismo quisimos evaluar si la variación de la fusión fagolisosomal podría estar asociada al estado clínico de los pacientes al momento del estudio. Para ello los niños infectados con el HIV se clasificaron en cuatro categorías siguiendo las indicaciones del CDC: N (asintomático), A (con sintomatología leve), B (con sintomatología moderada) y C (con sintomatología grave). Los resultados se ilustran en la Figura 8. La fusión fagolisosomal monocítica de los niños infectados que presentaban al momento del estudio síntomas moderados o graves resultó significativamente menor que la de aquellos niños que se mantuvieron asintomáticos o expresaban síntomas clínicos leves ($p<0.05$), sin que se observara diferencias entre estos dos últimos grupos. La Tabla 3

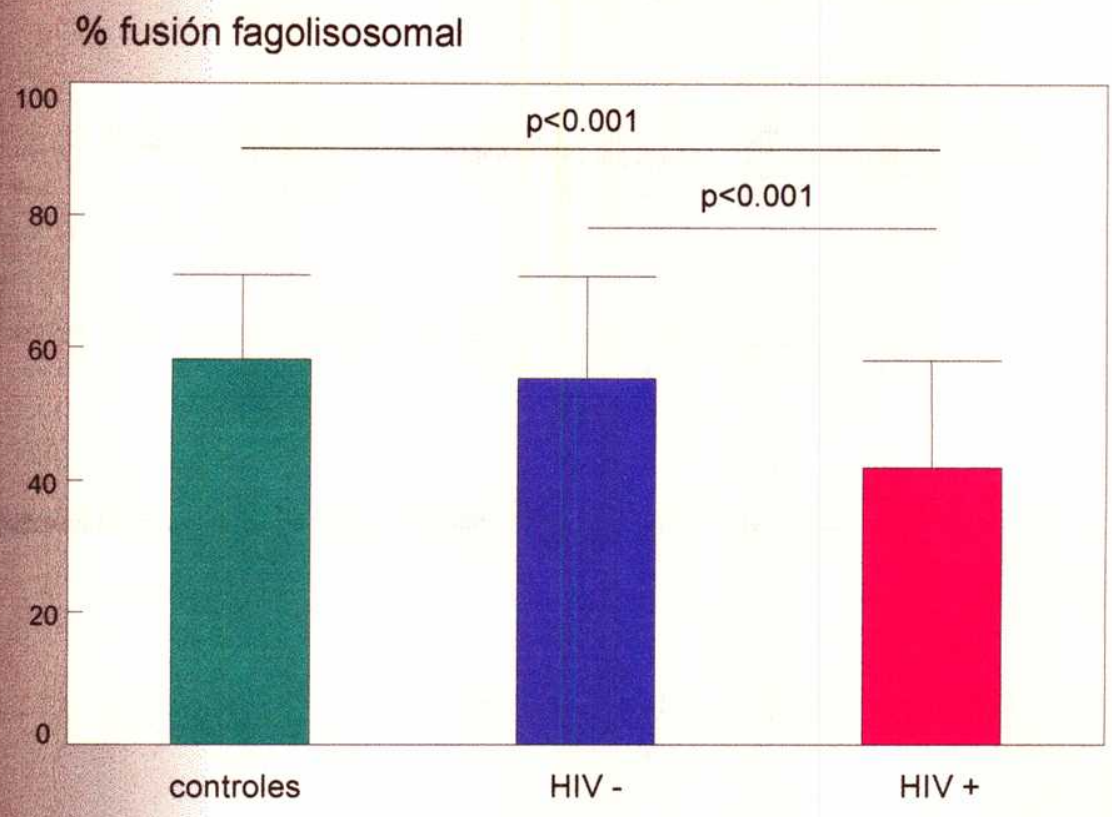

FIGURA III.6. Fusión fagolisosomal en 45 niños infectados y 38 no infectados nacidos de madres HIV positivas y 14 controles sanos. Los datos se expresan como la media ± DS.

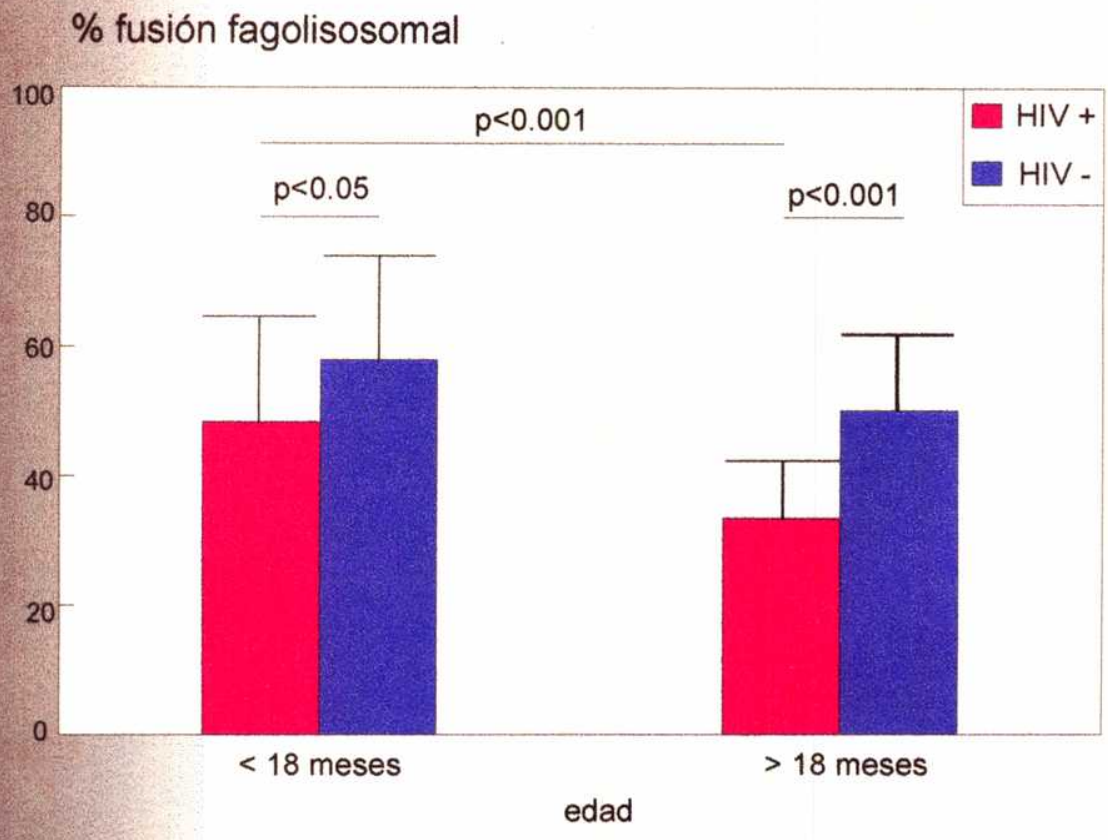

FIGURA III.7. Relación entre la fusión fagolisosomal de los niños nacidos de madres HIV positivas y la edad. Los datos se expresan como la media ± DS.

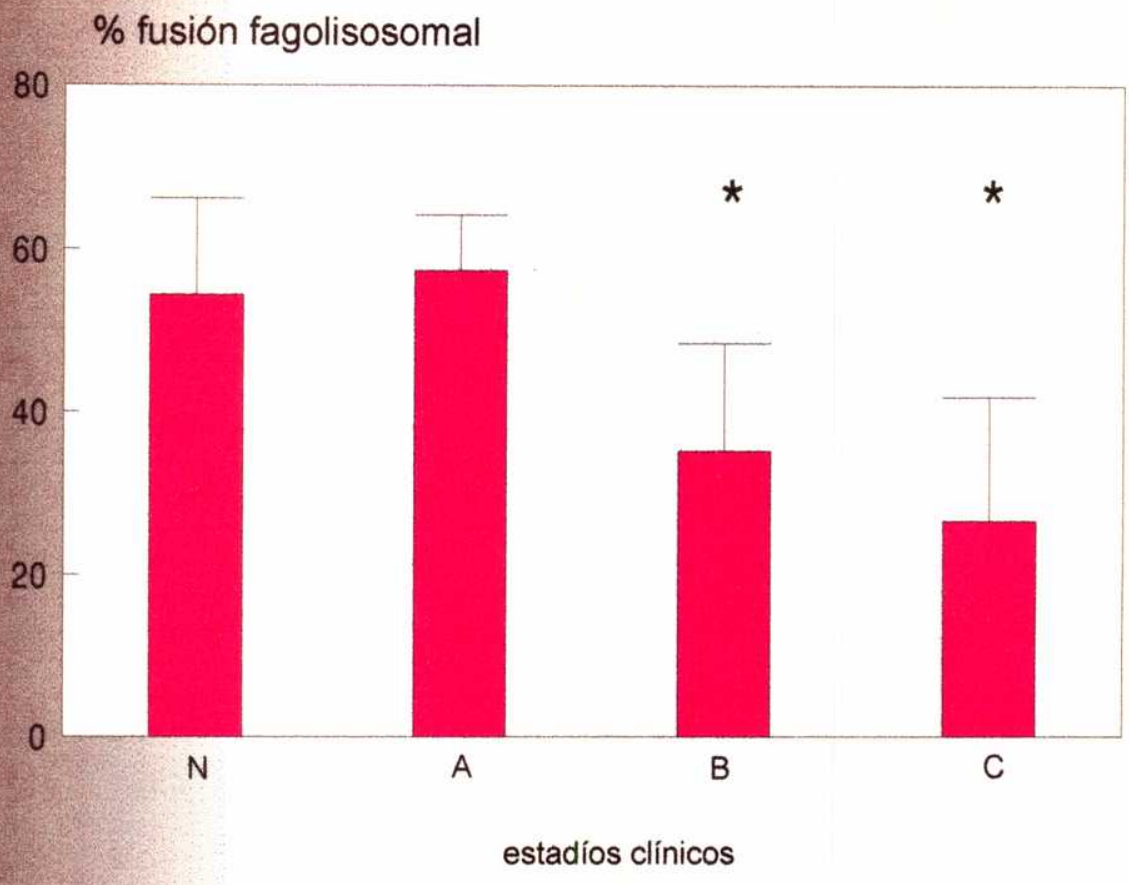

FIGURA III.8. Variación de la fusión fagolisosomal de los niños infectados con el HIV de acuerdo al estadío clínico, clasificados en cuatro categorías: N (asintomático), A (con síntomatología leve), B (con síntomas moderados) y C (con síntomas graves). Los datos se expresan como la media ± DS. * $p<0.05$.

TABLA III.3. Relación entre la fusión fagolisosomal monocítica de los niños infectados con el HIV, la edad y el estadío clínico de los pacientes.

EDAD	ESTADIO CLINICO	
	N+A	B+C
< 18 meses	58.4 ± 7.7 (n= 13)	38.4 ± 17.2 (n= 13)
> 18 meses	49.0 ± 4.4 (n= 3)	30.5 ± 9.0 (n= 16)

muestra la relación de la función monocítica con la edad y el estado clínico de los pacientes. Dentro del grupo de niños menores de 18 meses de edad, aproximadamente la mitad se ha mantenido asintomáticos o con síntomas leves y la otra mitad presentan síntomas de moderados a graves. Por otra parte, más del 80 % de los niños mayores de 18 meses presentan síntomas clínicos moderados o graves. Estos resultados sugieren que la disminución de la fusión fagolisosomal observada en los niños infectados con el HIV se encuentra estrechamente relacionada con la severidad del estado clínico de los pacientes.

1.3. Efecto de la glicoproteína recombinante de envoltura del HIV-1 sobre la fusión fagolisosomal de monocitos periféricos normales

En base a nuestros resultados, quisimos identificar las posibles causas involucradas en la disfunción fagolisosomal. La interacción entre la glicoproteína gp120 y la molécula CD4 expresada en la membrana de los linfocitos T es una de las responsables de las disfunciones celulares observadas en los pacientes HIV positivos. Dado que los monocitos también expresan la molécula CD4, y que se ha demostrado que la interacción gp120-CD4 modifica la funcionalidad de dichas células, investigamos si la gp120 era capaz de alterar la fusión fagolisosomal de monocitos normales. Para ello incubamos las células adherentes de 10 dadores normales con diferentes concentraciones de gp120 recombinante, en un rango de 0.1 a 1000 ng/ml, y luego de 24 hs evaluamos la fusión fagolisosomal. Los resultados se ilustran en la Figura 9. La glicoproteína gp120 provocó una disminución significativa de la fusión fagolisosomal normal entre 1 y 1000 ng/ml ($p<0.05$), siendo máxima entre 10 y 100 ng/ml. En la mayor concentración se observó un efecto citotóxico. Nuestros resultados sugieren que la gp120 provoca una alteración de la fusión fagolisosomal, probablemente a través de la molécula CD4 expresada en la superficie celular.

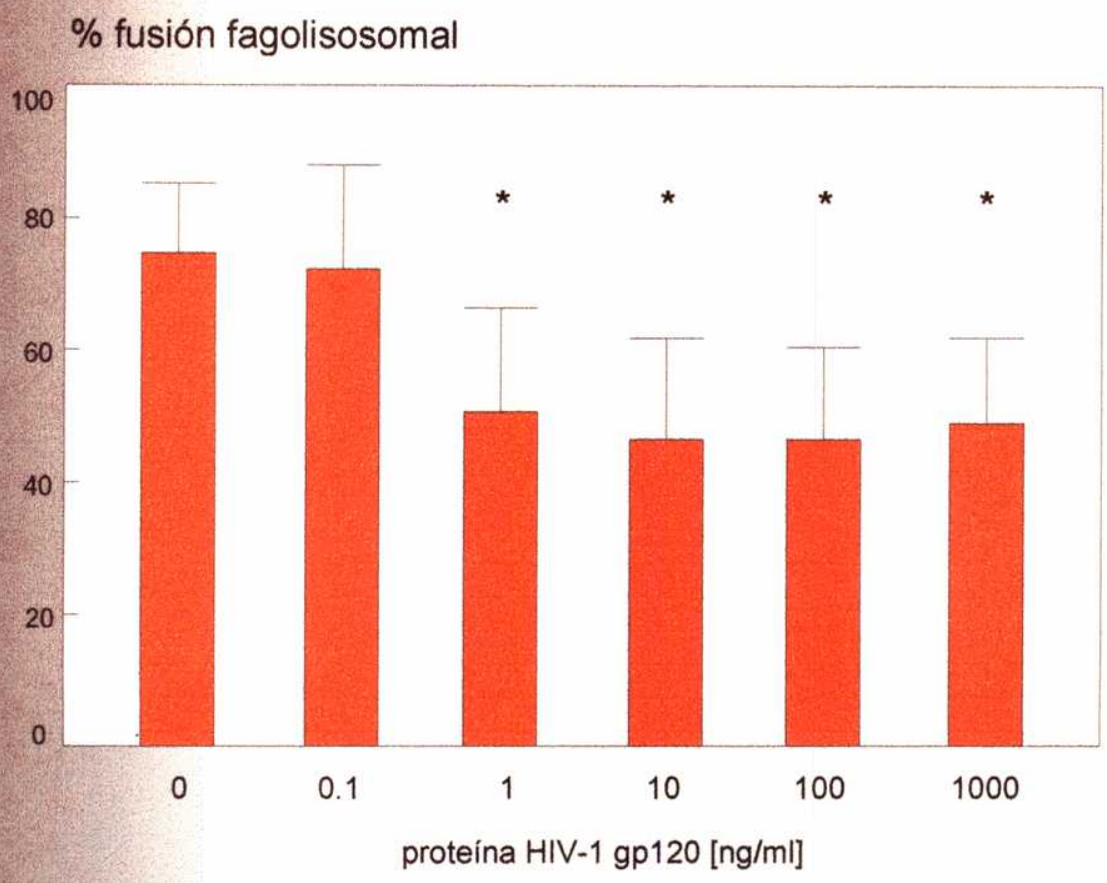

FIGURA III.9. Efecto inhibitorio de la glicoproteína recombinante gp120 sobre la fusión fagolisosomal de monocitos periféricos normales. Los datos se expresan como la media ± DS. * $p<0.05$.

Evaluamos también el efecto de la gp120 sobre la actividad candidacida de los monocitos periféricos. Para ello incubamos las células mononucleares de 3 dadores normales con dos concentraciones de gp120 recombinante: 100 y 1000 ng/ml. Como se ilustra en la Tabla 4, en todos los casos los porcentajes de lisis fueron levemente menores en los monocitos pretratados con gp120, sin alcanzar significación estadística. Estos resultados indican que, al menos en las mismas condiciones experimentales, la glicoproteína de envoltura gp120 no tiene efecto sobre la capacidad de destruir cándidas de los monocitos periféricos.

1.4. Efecto de la proteína regulatoria del HIV-1 Tat sobre la fusión fagolisosomal de monocitos circulantes normales

Dado que la gp120 inhibió la fusión fagolisosomal monocítica, investigamos si otros productos virales eran capaces de provocar la misma disfunción. Estudiamos entonces el efecto de la proteína del HIV-1 Tat sobre la fusión fagolisosomal de monocitos periféricos normales. Las células adherentes de 12 dadores normales fueron pretratadas durante 24 hs con diferentes concentraciones de Tat recombinante, entre 1 y 100 ng/ml, y luego se determinó el porcentaje de fusión. Los resultados de la evaluación microscópica se observan en la Figura 10. La proteína Tat causó una disminución de la fusión fagolisosomal entre 10 y 100 ng/ml ($p=0.005$ y $p<0.001$, respectivamente), con un efecto máximo a 100 ng/ml (Figura 11). En esta concentración, la fusión fagolisosomal disminuyó en 11 de los 12 experimentos realizados, con un porcentaje de inhibición (media ± DS) de 42.9 ± 27.2. En la concentración de 10ng/ml, la proteína Tat disminuyó la fusión fagolisosomal en 5 de 7 experiencias. En cambio, no se observó ningún efecto con la mínima concentración utilizada (1 ng/ml). Para determinar si el efecto de la proteína Tat era específico, 100 ng/ml de Tat se preincubaron con 1 μg/ml de anticuerpo monoclonal anti-Tat antes de agregarla a los cultivos de monocitos periféricos. Como se muestra en la Figura 12, el efecto inhibitorio de la proteína regulatoria Tat fue

TABLA III.4. Efecto de la glicoproteína del HIV-1 gp120 sobre la actividad candidacida de los monocitos periféricos normales.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	% LISIS (media ± DS)
medio	12.4 ± 4.3 (n=3)
0.1 μg/ml gp120	9.6 ± 5.1 (n=3)
1 μg/ml gp120	7.8 ± 6.9 (n=3)

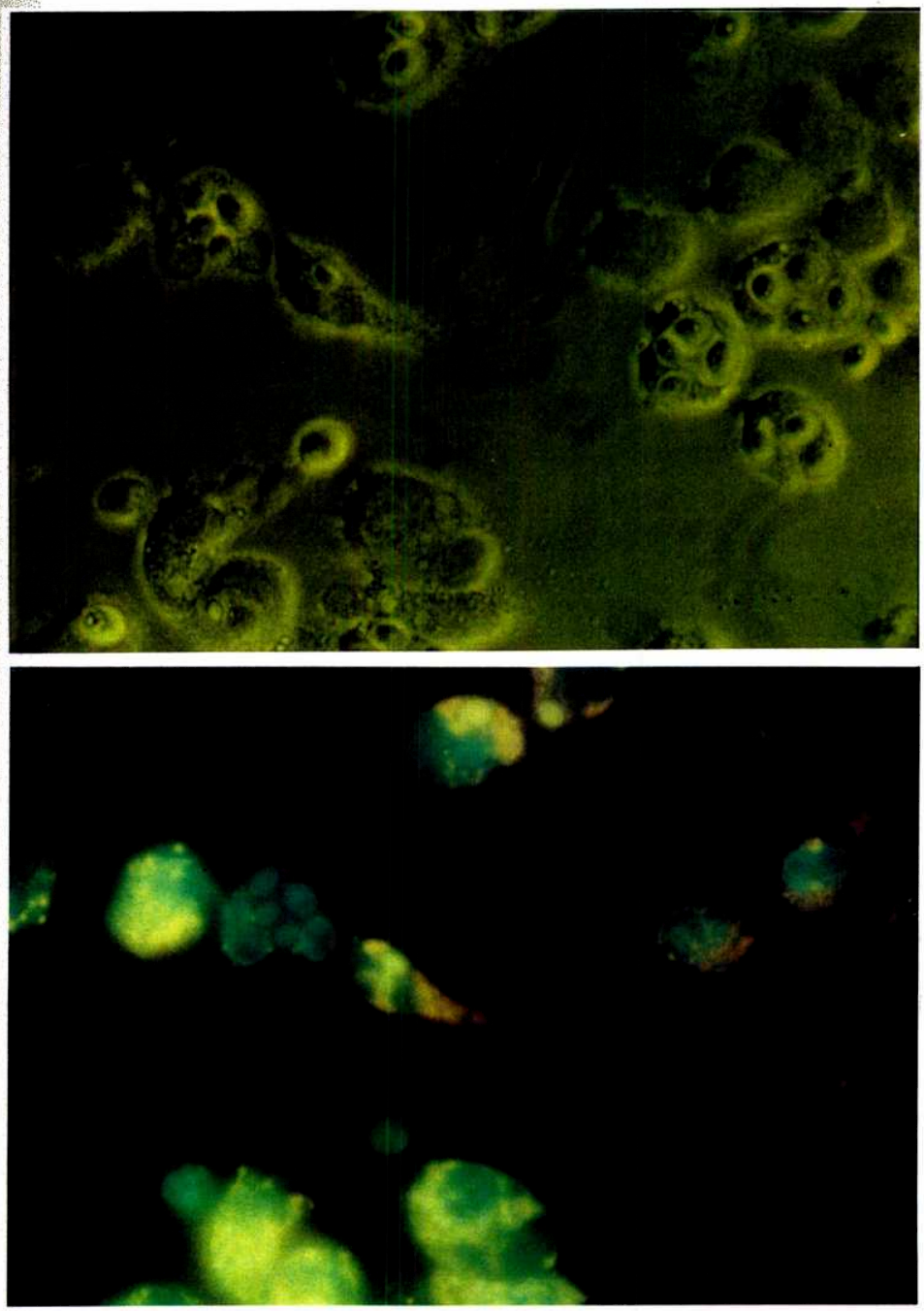

FIGURA III.10. Inhibición de la fusión fagolisosomal de monocitos normales de sangre periférica por contraste de fase *(arriba)* y por fluorescencia *(abajo)*. Aumento 1000X.

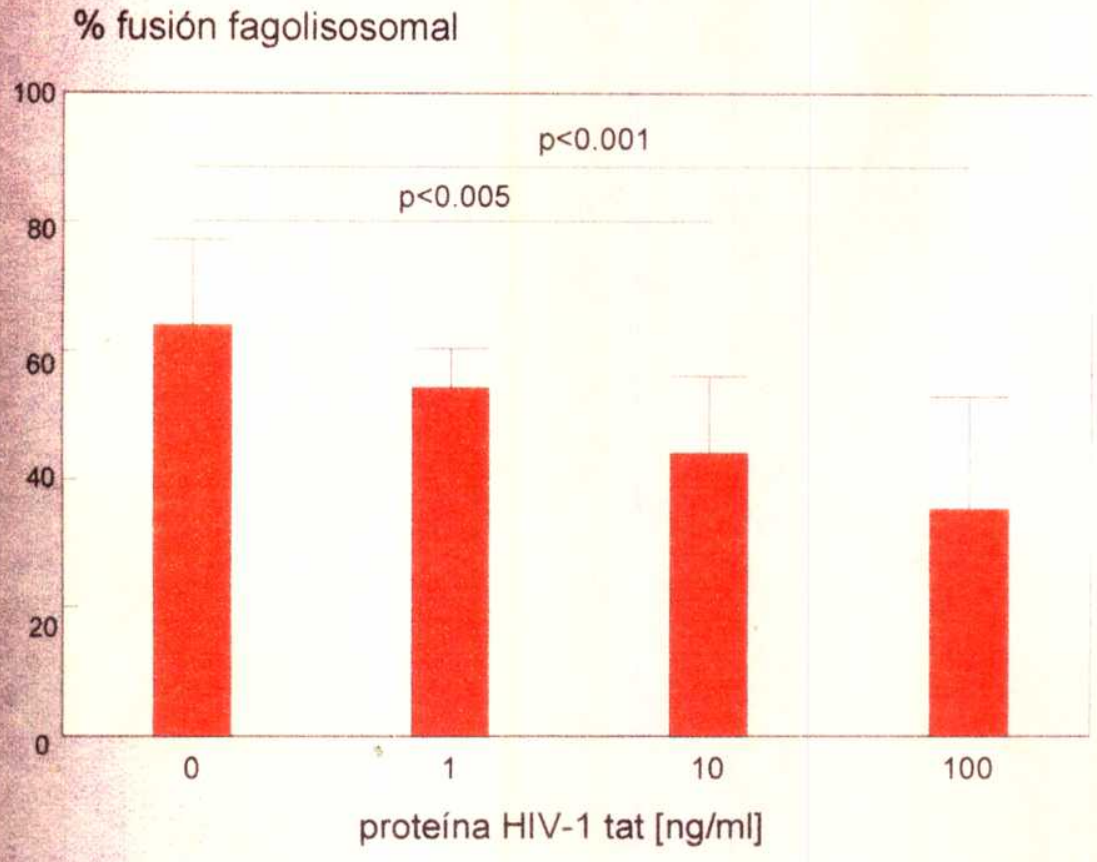

FIGURA III.11. Inhibición de la fusión fagolisosomal de monocitos periféricos normales por la proteína regulatoria recombinante tat. El efecto inhibitorio máximo se observa a 100 ng/ml. Los datos se expresan como la media ± DS.

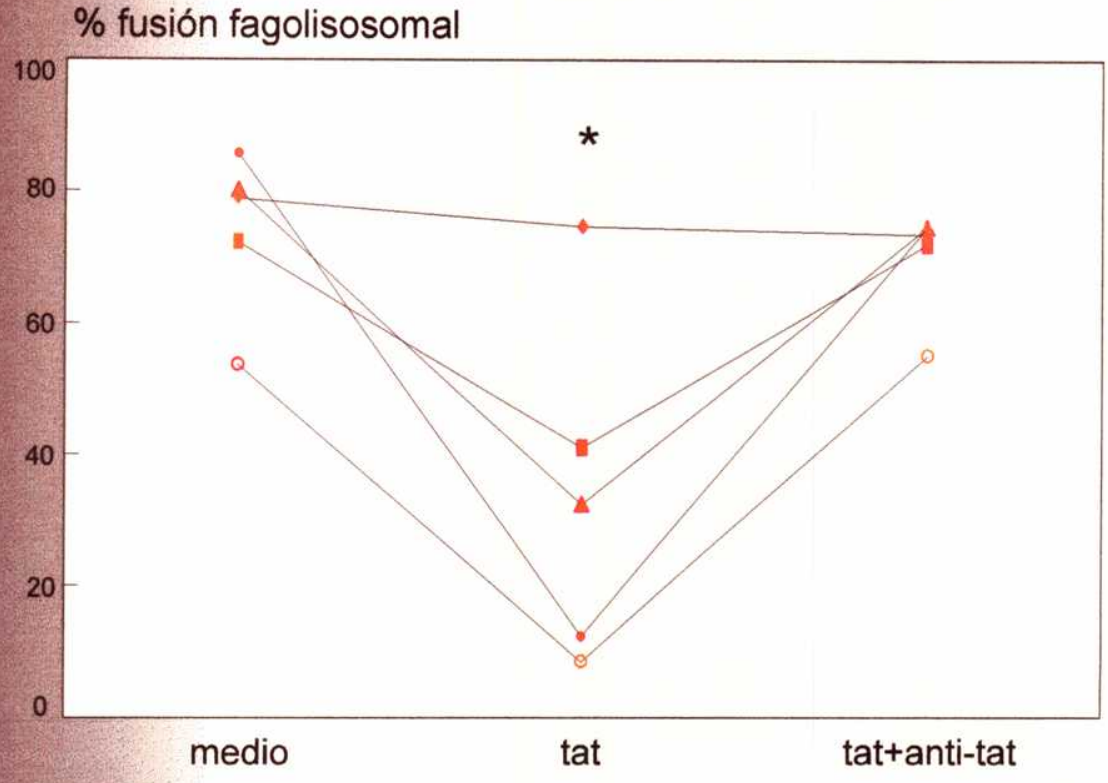

FIGURA III.12. El efecto inhibitorio de la proteína regulatoria recombinante tat sobre la fusión fagolisosomal normal es totalemente revertido por el agregado de anticuerpo monoclonal anti-tat. *p<0.001.

completamente revertido por el agregado de anticuerpo anti-Tat en 4 de los 5 experimentos realizados ($p<0.001$). El restante corresponde al único del total estudiado que no respondió al Tat, por lo tanto no se observó un efecto neutralizante de anticuerpo monoclonal.

Evaluamos también el efecto de la proteína Tat sobre la actividad candidacida de los monocitos periféricos. Las células adherentes de 6 dadores normales se incubaron con diferentes concentraciones de Tat recombinante, entre 100 y 1000 ng/ml. Como se ilustra en la Tabla 5, la actividad candidacida no fue modificada de manera significativa por la adición de Tat, a pesar de que en la máxima concentración utilizada, en todos los casos los porcentajes de lisis fueron levemente menores en los monocitos pretratados con Tat que en los controles no tratados. Estos resultados indican que, al menos en las mismas condiciones experimentales, la proteína regulatoria Tat no tiene efecto sobre la capacidad de destruir cándidas de los monocitos periféricos.

Por lo tanto, la alteración de la fusión fagolisosomal en los pacientes infectados con el HIV podría deberse a la presencia de productos virales como la glicoproteína de envoltura gp120 y la proteína regulatoria Tat.

2. FUSION FAGOLISOSOMAL MONOCITICA EN TALASEMIA MAYOR

2.1. Estudio de la fusión fagolisosomal en pacientes con talasemia mayor

Los pacientes con β-talasemia presentan severos defectos inmunológicos secundarios. Anteriormente demostramos que los mecanismos microbicidas oxígeno dependientes en los monocitos de estos pacientes se encuentran alterados en correlación con los niveles de ferritina sérica (Ballart et al, 1986). Quisimos evaluar el estado de los mecanismos oxígeno independientes y para ello en una primera etapa

TABLA III.5. Efecto de la proteína reguladora del HIV-1 Tat sobre la actividad candidacida de los monocitos periféricos normales.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	% LISIS (media ± DS)
medio	12.5 ± 7.8 (n=6)
0.1 μg/ml Tat	11.4 ± 5.7 (n=6)
1 μg/ml Tat	9.8 ± 5.7 (n=6)

estudiamos la fusión fagolisosomal de los monocitos periféricos de 15 pacientes con talasemia mayor, 10 padres de pacientes con talasemia mayor (portadores de un alelo talasémico), 12 controles normales adultos y 2 muestras de sangre de cordón. Los porcentajes de fusión fagolisosomal, expresados como la media ± DS, fueron de 49.6 ± 8.6 para los pacientes talasémicos, 65.7 ± 11.4 para los portadores y 74.6 ± 5.7 para los controles normales (Figura 13). La fusión fagolisosomal de los monocitos de los pacientes con talasemia mayor se encuentra significativamente reducida en comparación con los portadores y los controles normales ($p<0.05$). En el grupo de los portadores se observa una amplia dispersión de los datos, con una leve tendencia a disminuir. Sin embargo este grupo no difiere significativamente del grupo control. En los controles normales incluímos los resultados del análisis de 2 muestras de sangre de cordón, cuyos valores se encontraban dentro del rango normal (72 y 73.1%).

Por otra parte, comparamos los valores de fusión fagolisosomal obtenidos en los pacientes talasémicos con los parámetros clínicos que se resumen en la Tabla 6, como edad, niveles de ferritina sérica y esplenectomía. No se observó correlación entre la disfunción monocítica y los parámetros analizados. En base a observaciones previas, esperábamos que los pacientes más jóvenes expresaran los valores de fusión fagolisosomal más bajos. Sin embargo, los porcentajes de fusión en algunos de estos pacientes resultaron aún menores que en los de mayor edad, quienes presentan valores más altos de ferritina sérica y reciben tratamiento crónico con transfusiones sanguíneas. Más aún, todos los valores de fusión fagolisosomal fueron bajos independientemente de la edad. Asimismo, 3 de los pacientes estudiados (paciente 3, 6 y 14) recibían tratamiento con deferoxamina, de los cuales solo uno (paciente 6) presentó una fusión fagolisosomal dentro del rango normal. Coincidentemente, este niño comenzó la terapia quelante en forma temprana y sin interrupciones hasta el momento del estudio. Nuestros resultados sugieren que la fusión fagolisosomal de los monocitos periféricos en los pacientes con talasemia mayor se encuentra alterada y que probablemente la sobrecarga de hierro esté involucrada en dicha disfunción.

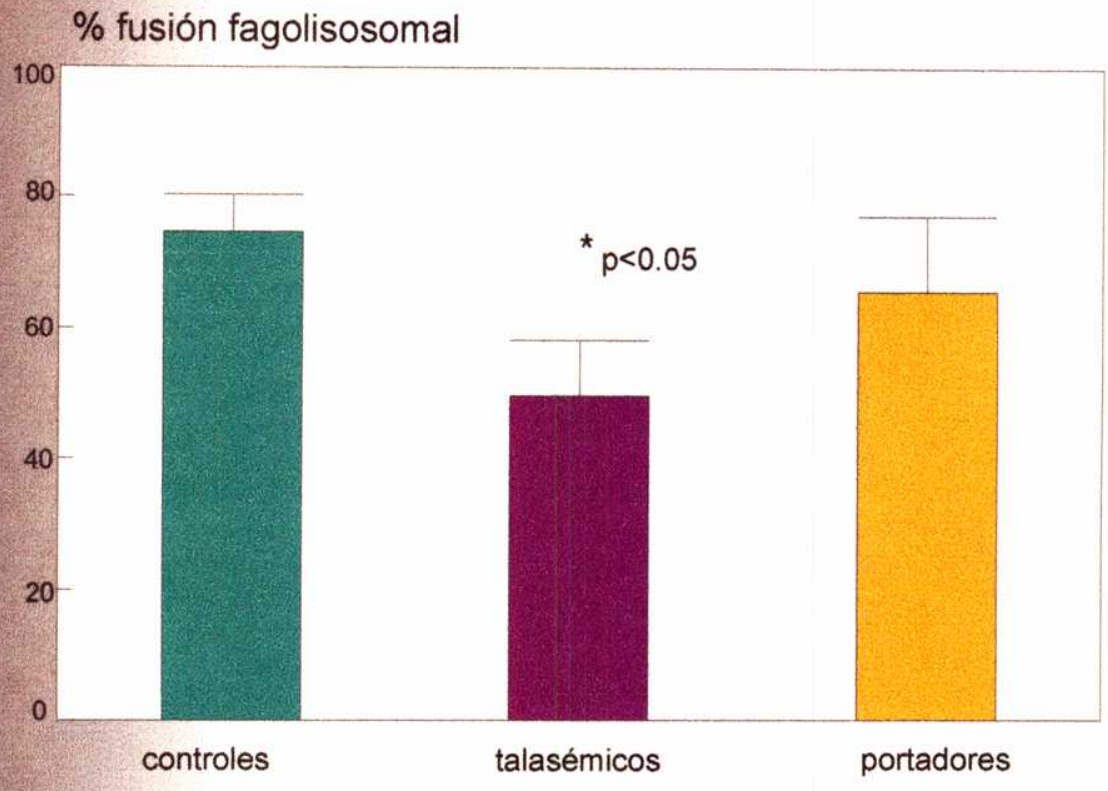

FIGURA III.13. Fusión fagolisosomal en pacientes con talasemia mayor (n=15), portadores del alelo talasémico (n=10) e individuos normales (12). Los datos se expresan como la media ± DS.

TABLA III.6. Características clínicas de los pacientes con talasemia mayor.

PACIENTE	EDAD	FERRITINA SERICA (ng/ml)	ESPLENEC-TOMIA	TERAPIA DEFEROXAMINA	% FUSION FAGOLISOSOMAL
1	19	>8000	SI	NO	36.5
2	8	2250	SI	NO	56.8
3	10	2400	NO	SI	48.2
4	20	>8000	NO	NO	54.3
5	20	ND	SI	NO	49.7
6	10	4650	NO	SI	74
7	23	>8000	SI	NO	52.5
8	18	>8000	SI	NO	55.6
9	19	>8000	SI	NO	44
10	20	>8000	SI	NO	50.3
11	3	5100	NO	NO	45.6
12	2	4000	NO	NO	47.7
13	2	5500	NO	NO	39.8
14	13	4750	SI	SI	48.9
15	2	1000	NO	NO	48.3

2.2. Efecto *in vitro* del hierro sobre la fusión fagolisosomal normal

En los pacientes talasémicos, el deterioro inmunológico se ha atribuído generalmente a la sobrecarga de hierro por las múltiples tranfusiones sanguíneas que reciben. Para investigar el efecto *in vitro* del hierro sobre la fusión fagolisosomal normal, las células adherentes de 6 dadores normales fueron incubadas en presencia de dos concentraciones diferentes de sulfato ferroso, 0.2 y 2 μM. Como se muestra en la Tabla 7, la fusión fagolisosomal de los monocitos circulantes normales fue inhibida significativamente en forma dosis dependiente, con $p<0.05$ para 0.2 μM de $FeSO_4$ y $p<0.001$ para 2 μM de $FeSO_4$. Estos resultados sugieren que el hierro podría ser uno de los responsables de la alteración de la fusión fagolisosomal observada en los pacientes con talasemia mayor.

2.3. Efecto *in vitro* de la deferoxamina sobre la fusión fagolisosomal

Dado que el único paciente talasémico que presentó un valor de fusión fagolisosomal dentro del rango normal se encontraba bajo tratamiento continuo con deferoxamina, investigamos si la deferoxamina *in vitro* podría modificar la fusión fagolisosomal monocítica. Para ello incubamos las células mononucleares de 5 pacientes con talasemia mayor, 6 portadores y 7 sujetos sanos con cuatro concentraciones diferentes de deferoxamina, entre 1 y 50 μM. Como se muestra en la Figura 14, la deferoxamina provocó un aumento de la fusión fagolisosomal en todos los individuos talasémicos, si bien no alcanzaron valores normales. El efecto máximo se observó en la concentración de 10 μM. En cambio, la deferoxamina no modificó la fusión fagolisosomal en los portadores y en los controles normales. En la mayor concentración utilizada (50 μM), la deferoxamina resultó citotóxica. Nuevamente nuestros resultados sugieren que la alteración de la fusión fagolisosomal en los pacientes talasémicos podría deberse a la sobrecarga de hierro.

TABLA III.7. Efecto del hierro sobre la fusión fagolisosomal normal.

TRATAMIENTO	%FUSION FAGOLISOSOMAL (media ± DS)
HBSS	80.3 ± 2.5
HBSS + 0.2 μM $FeSO_4$	56.1 ± 9.7 ($p<0.05$)
HBSS + 2.0 μM $FeSO_4$	30.8 ± 9.5 ($p<0.001$)

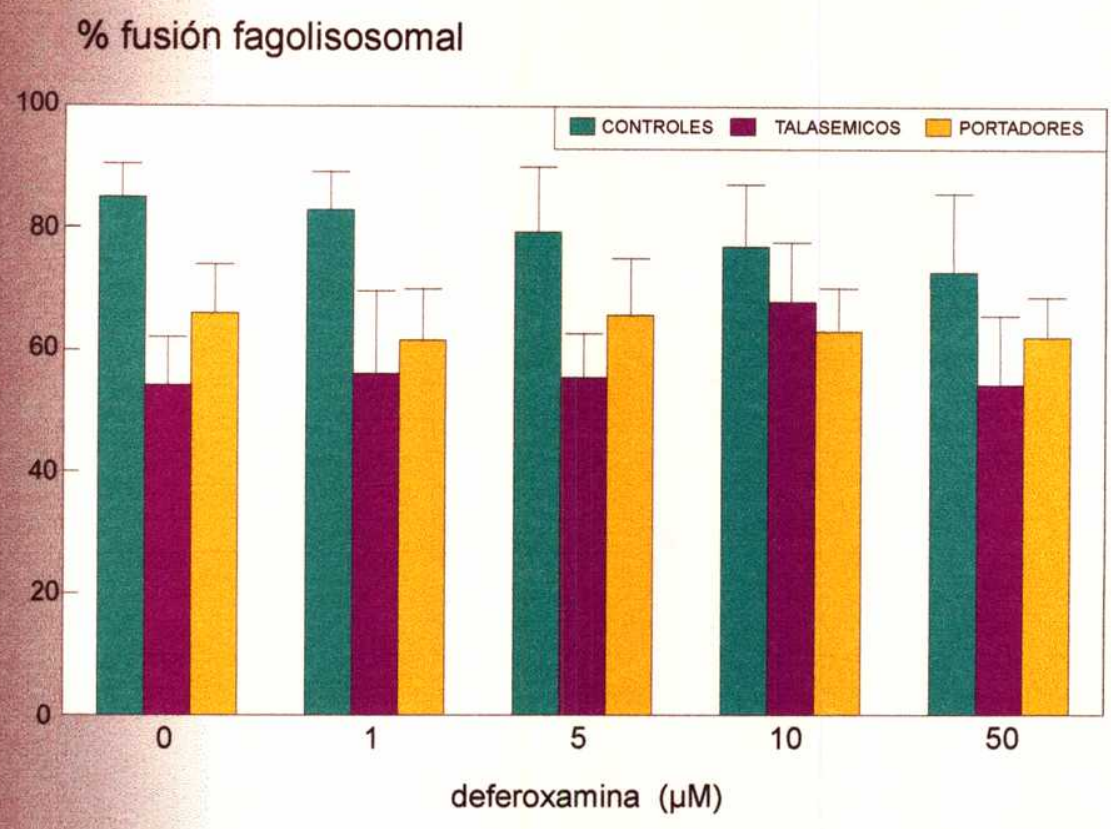

FIGURA III.14. Efecto *in vitro* de la deferoxamina sobre la fusión fagolisosomal de individuos normales (n=7), pacientes talasémicos (n=5) y portadores (n=6). Los datos se expresan como la media ± DS.

2.4. Evaluación de la fusión fagolisosomal en pacientes con talasemia mayor que reciben tratamiento quelante

En base a los resultados obtenidos, en una segunda etapa evaluamos la fusión fagolisosomal de los monocitos periféricos de un grupo de pacientes talasémicos que reciben terapia quelante con deferoxamina (n=10). El criterio ulitizado para indicar el comienzo de dicho tratamiento fue que el valor de ferritina sérica supere los 1000 ng/ml y la dosis de deferoxamina suministrada varió entre 25-55 mg/kg/día. Las características clínicas de este grupo se resumen en la Tabla 8. Como grupos controles se estudiaron 24 dadores normales adultos y 16 niños. Los porcentajes de fusión fagolisosomal (media ± DS) fueron: 46.4 ± 9.4 para los pacientes talasémicos, 63.3 ± 12.5 para los controles adultos y 58.2 ± 12.7 para los controles pediátricos (Figura 15). La fusión fagolisosomal en el grupo talasémico resultó significativamente menor que en los grupos controles ($p<0.05$), mientras que no existió diferencias entre los controles adultos y los controles pediátricos.

Habiendo estudiado pacientes con talasemia mayor con tratamiento quelante (n=10) y sin tratamiento (n=12), quisimos comparar el efecto *in vivo* de la deferoxamina sobre la fusión fagolisosomal monocítica. Para ello referimos los valores de fusión fagolisosomal como porcentajes respecto de los controles normales estudiados simultáneamente con cada grupo. Como se ilustra en la Figura 16, la fusión fagolisosomal en los pacientes talasémicos tratados con deferoxamina fue significativamente mayor que en aquellos pacientes que no reciben tratamiento ($p=0.008$)). Nuestros resultados sugieren que la deferoxamina *in vivo* puede mejorar parcialmente la fusión fagolisosomal de los monocitos periféricos de los pacientes talasémicos.

TABLA III.8. Características clínicas de un grupo de pacientes que reciben terapia quelante con deferoxamina en forma contínua desde estadíos tempranos.

PACIENTE	EDAD	ESPLENECTOMIA	FERRITINA SERICA [ng/ml]	DEFEROXAMINA [mg/día}
16	11	NO	5672	2000
17	10	NO	4000	2250
18	3	NO	1896	500
19	5	NO	1846	750
20	16	SI	2455	2000
21	18	SI	2523	2500
22	4	NO	1322	500
23	12	NO	3002	1500
24	5	NO	2273	750
25	10	NO	3337	1500

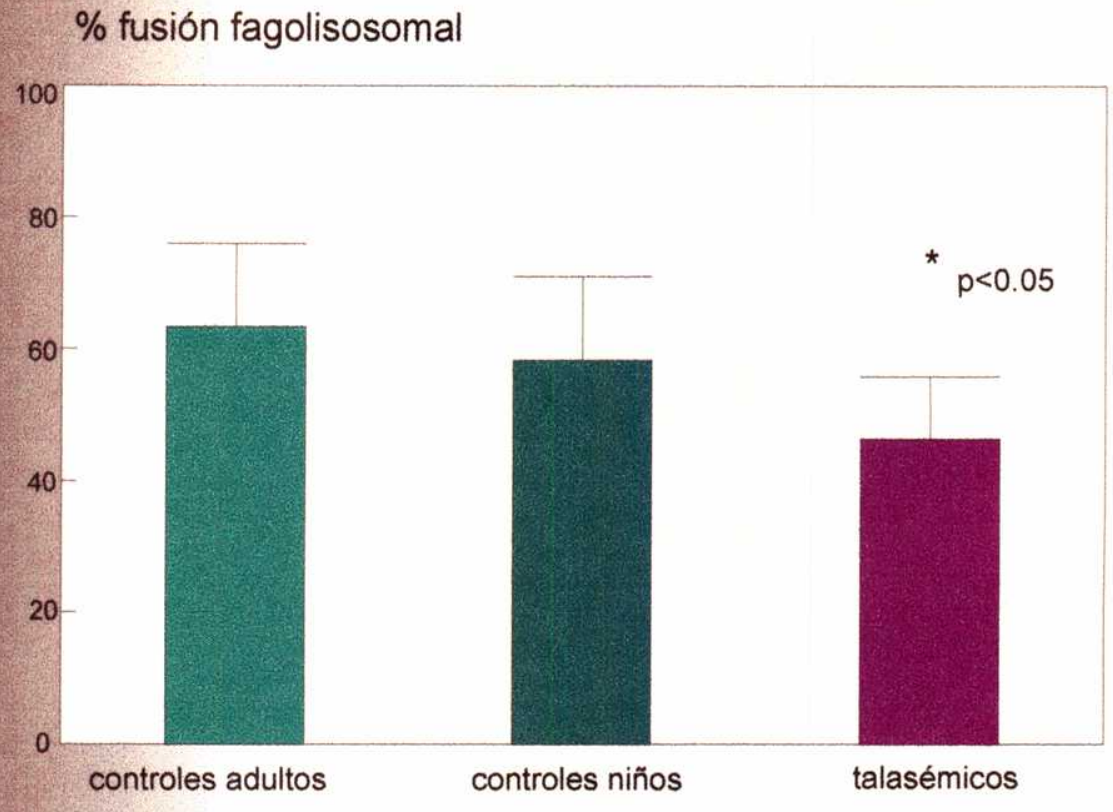

FIGURA III.15. Evaluación de la fusión fagolisosomal en un grupo de pacientes talasémicos que reciben terapia quelante con deferoxamina (n=10), respecto de dos grupos controles constituídos por adultos (n=24) y niños (n=16). Los datos se expresan como la media ± DS.

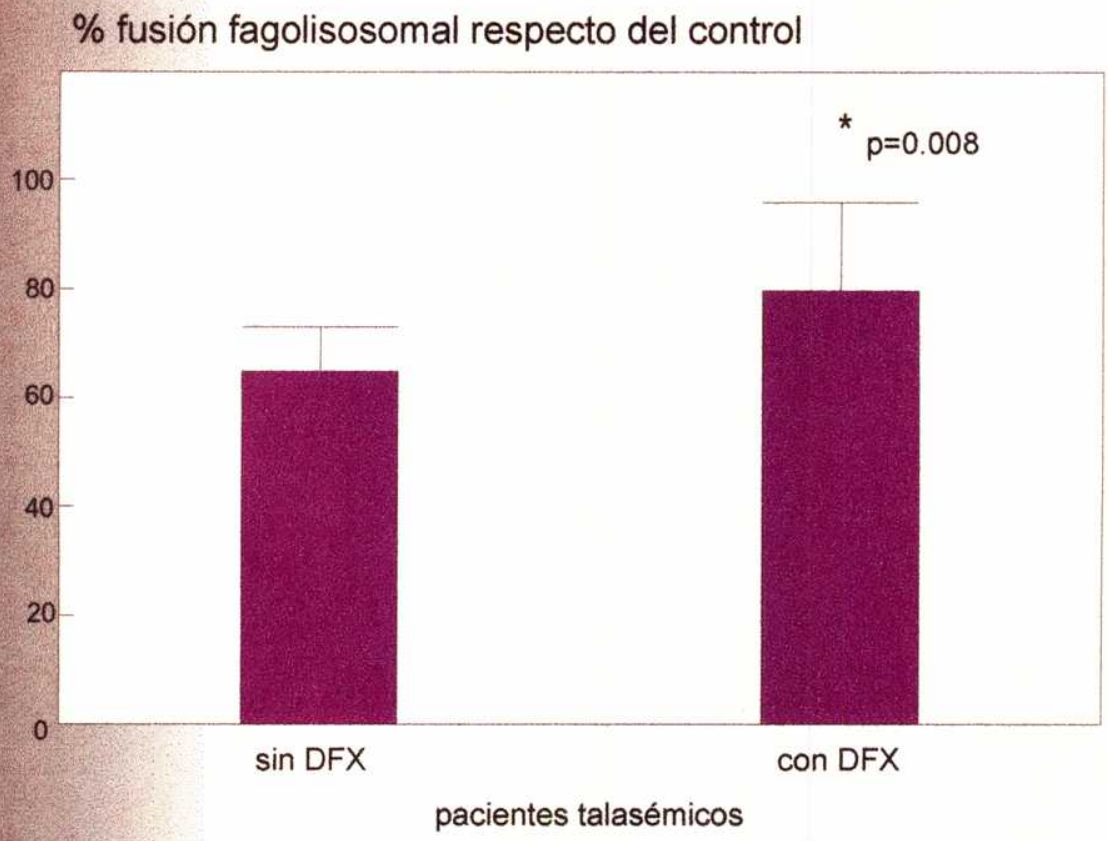

FIGURA III.16. Comparación de la fusión fagolisosomal entre pacientes talasémicos que reciben tratamiento con deferoxamina (n=10) y sin tratamiento (n=12). Los datos se expresan como porcentaje del control (media ± DS).

2.5. Evaluación del estrés oxidativo en pacientes talasémicos

El aumento del estrés oxidativo está reflejado por un desbalance entre la generación de radicales libres y la acción de los mecanismos antioxidantes. Se ha postulado que en los pacientes talasémicos la injuria a nivel de diferentes tejidos estaría mediada por daño oxidativo. Considerando que la determinación de malonaldehído (MDA) es un indicador de los niveles de lípidos peroxidados, mientras que la vitamina E, en cambio, es un potente antioxidante, evaluamos ambos parámetros en el suero de 3 pacientes talasémicos que no reciben tratamiento quelante, 11 pacientes talasémicos tratados con deferoxamina y 7 portadores y 8 dadores normales. Los resultados se ilustran en la Tabla 9. Los niveles de MDA en el grupo de pacientes talasémicos sin terapia quelante fueron los más elevados. Las diferencias observadas entre este grupo y los controles normales fueron estadísticamente significativas ($p<0.05$), sin alcanzar significación estadística cuando se los compara con los talasémicos que reciben deferoxamina y los portadores. Los valores de MDA en los talasémicos con deferoxamina también resultaron significativamente mayores que los valores normales ($p<0.01$). No se observaron diferencias significativas ente los portadores y los controles, ni entre los dos grupos de pacientes con β-talasemia. Nuestros resultados sugieren un aumento en la generación de radicales libres del oxígeno en los pacientes con talasemia mayor.

Los valores de vitamina E en ambos grupos de pacientes con talasemia resultaron menores que en los portadores y en los normales, alcanzando significación estadística al comparar los talasémicos con deferoxamina respecto de los normales ($p<0.05$).

Estos resultados indicarían que las alteraciones funcionales observadas en los pacientes talasémicos podrían estar relacionadas a un desbalance entre los procesos oxidativos y los mecanismos antioxidantes, que se acentúa en aquellos pacientes politransfundidos que no reciben terapia quelante de hierro.

TABLA III.9. Evaluación del daño oxidativo y de los niveles de antioxidantes en pacientes con talasemia mayor, portadores y normales.

GRUPO	VITAMINA E [μg/dl]	TBA [μM]
talasémicos sin DFX (n=3)	794.7 ± 130.3	1.91 ± 0.92* (p<0.05)
talasémicos con DFX (n=11)	855.6 ± 263.3* (p<0.05)	1.77 ± 0.48* (p<0.01)
portadores (n=7)	1074.7 ± 133.3	1.24 ± 0.49
normales (n=8)	1150.8 ± 305.6	1.17 ± 0.22

*estadísticamente significativo respecto de los controles normales

2.6. Efecto de los radicales libres de oxigeno sobre la fusion fagolisosomal normal

Teniendo en cuenta que el hierro es un excelente catalizador de la generación de radicales libres de oxígeno, postulamos la hipótesis de que la disminución de la fusión fagolisosomal podría deberse a la alteración de la estructura general de la membrana celular mediada por radicales libres.

Los células adherentes obtenidas de 5 dadores normales se incubaron en un medio generador de radicales libres de oxígeno, xantina-xantina oxidasa, variando las concentraciones de xantina. Los resultados se ilustran en la Figura 17. La fusión fagolisosomal se inhibió significativamente con todas las concentraciones de xantina utilizadas ($p<0.001$). La máxima inhibición se alcanzó con 10 μM de xantina. El agregado simultáneo de superóxido dismutasa y catalasa, que bloquean la producción de radicales libres, revirtió completamente la inhibición ($p<0.001$). Nuestros resultados indican que los radicales libres de oxígeno están involucrados en la alteración de la fusión fagolisosomal de los monocitos periféricos.

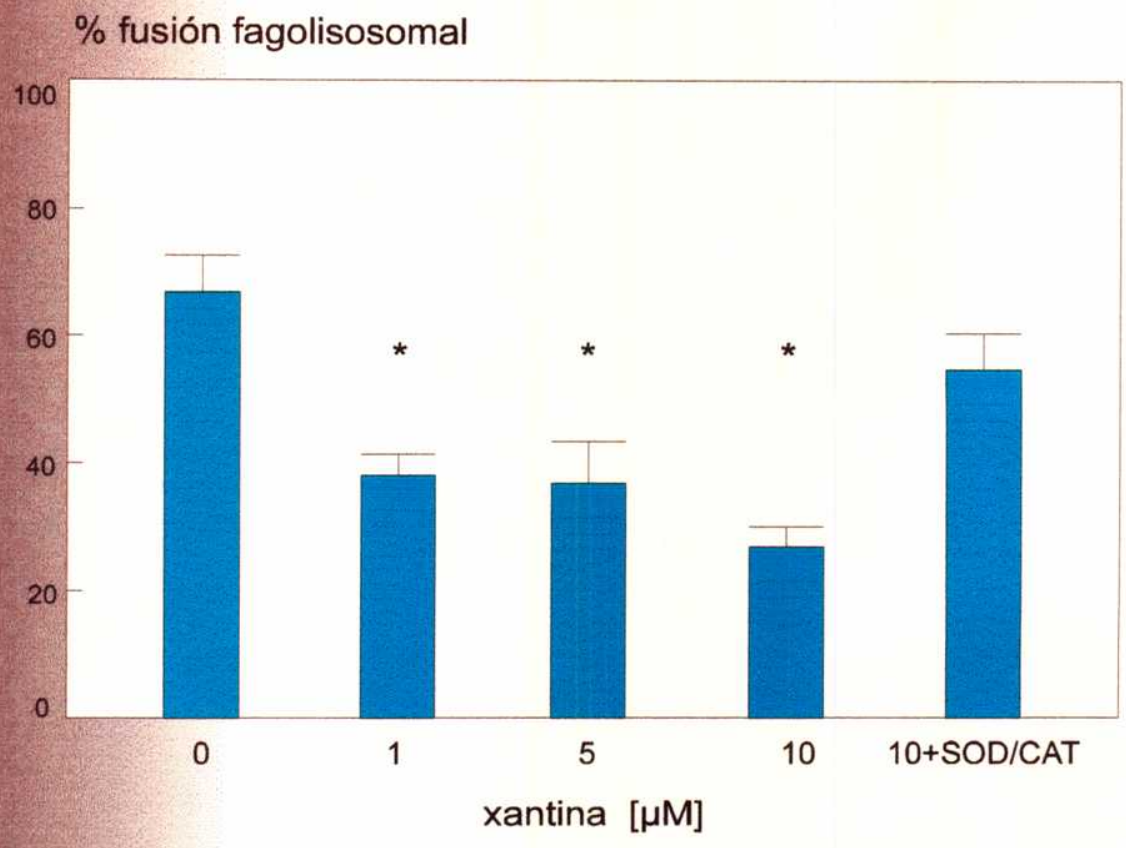

FIGURA III.17 Efecto inhibitorio del medio generador de radicales libres de oxígeno (xantina-xantina oxidasa) sobre la fusión fagolisosomal normal. Los datos se expresan como la media ± DS. * $p<0.001$ respecto de los controles sin tratamiento y de los tratados simultáneamente con superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

CAPITULO IV

DISCUSION

1. FUSION FAGOLISOSOMAL MONOCITICA EN PACIENTES INFECTADOS CON EL HIV

En una primera etapa de este estudio demostramos que la fusión fagolisosomal de los monocitos periféricos de individuos adultos infectados con el HIV se encuentra disminuída respecto de los controles normales con serología negativa, y se correlaciona en forma directa con la depleción de linfocitos T CD4+.

Hasta el presente el descenso en el número absoluto de las células T CD4+ es el parámetro más utilizado como marcador de la progresión de la inmunodeficiencia en individuos adultos (de Wolf *et al*, 1988; Fahey *et al*, 1990). Por lo tanto, podemos decir que la disfunción fagolisosomal observada en los pacientes infectados con el HIV adultos se hace más evidente a medida que la infección progresa a SIDA. Estos hallazgos concuerdan con otros defectos funcionales de los monocitos descriptos anteriormente por otros autores en la infección por HIV que abarcan la quimiotaxis, la fagocitosis, la capacidad de destruir ciertos patógenos, expresión de moléculas de adhesión y de receptores para la porción Fc de las Igs, y la presentación antigénica (Pinching *et al*, 1983; Smith *et al*, 1984; Poli *et al*, 1985; Nielsen *et al*, 1986; Eales *et al*, 1987; Pos *et al*, 1992; Capsoni *et al*, 1994; Stent *et al*, 1994; Blauvelt *et al*, 1995). Asimismo, en nuestro laboratorio observamos que la capacidad de destruir *C. pseudotropicalis* está disminuída, acentuándose en estadíos tardíos de la inmunodeficiencia (Estevez *et al*, 1986). La alteración lítica se correlaciona con una disminución en la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, que llega a valores extremadamente bajos en sujetos con SIDA, demostrando en estos pacientes una alteración de los mecanismos microbicidas oxígeno dependientes. El defecto de la fusión fagolisosomal monocítica indica que en individuos infectados con el HIV los mecanismos microbicidas oxígeno independientes también se encuentran alterados. En ambos casos, la disfunción monocítica se acentúa con la evolución de la enfermedad.

En una segunda etapa evaluamos la fusión fagolisosomal de monocitos periféricos obtenidos de niños nacidos de madres HIV positivas, con el objetivo de comparar su comportamiento con el patrón observado en la población adulta infectada con el HIV. Coincidentemente con nuestras observaciones previas en adultos, demostramos que la fusión fagolisosomal en los niños verticalmente infectados es significativamente menor respecto de los niños no infectados de madres HIV positivas y de los controles. Al estudiar la fusión fagolisosomal normal hemos abarcado todos los grupos etarios, incluída la sangre de cordón, sin encontrar diferencias entre ellos. Este hecho sumado a que no observamos diferencias entre los niños no infectados nacidos de madres positivas y los controles, indica que la alteración de la fusión fagolisosomal está relacionada con la infección por HIV.

Más aún, teniendo en cuenta que todos los niños incorporados en este estudio adquirieron la infección por transmisión vertical y que en la mayoría de los niños verticalmente infectados la transmisión ocurre durante el parto, consideramos la edad de los pacientes como marcador del tiempo de infección. Al dividir entonces los pacientes en menores y mayores de 18 meses, observamos que la alteración de la fusión fagolisosomal monocítica de los niños HIV positivos se acentúa con el tiempo de infección, mientras que en los niños no infectados, la fusión fagolisosomal es independiente de la edad. Estos hallazgos demuestran que la alteración funcional de los monocitos se debe a la infección crónica con el HIV.

En los adultos infectados, el riesgo de desarrollar infecciones oportunistas está estrechamente relacionado con el número absoluto de linfocitos T CD4+. Sin embargo, en los niños HIV positivos, la manifestación de infecciones oportunistas u otros síntomas clínicos asociados al síndrome de inmunodeficiencia pueden presentarse aún con recuentos de linfocitos T CD4+ superiores a 500 células/mm^3 (Fahey *et al*, 1990). En este trabajo investigamos si la variación de la fusión fagolisosomal monocítica en los niños infectados podría estar vinculada al estado clínico presentado en el momento del estudio, y para ello clasificamos a los pacientes en diferentes categorías clínicas siguiendo las pautas del CDC (1994). Los cuadros asociados a síntomas moderados o severos se

presentaron especialmente en los niños mayores de 18 meses que corresponden a un período de infección más prolongado. Demostramos que la alteración de la fusión fagolisosomal en los monocitos circulantes de los niños verticalmente infectados con el HIV se encuentra estrechamente asociada a la severidad de las manifestaciones clínicas y a la progresión de la enfermedad.

Podemos concluir entonces que los pacientes infectados con el HIV, tanto niños como adultos, presentan una alteración funcional de los monocitos circulantes, que se evidencia particularmente en los estadíos más tardíos de la inmunodeficiencia.

Los mecanismos intrínsecos involucrados en la alteración de la fusión fagolisosomal monocítica en la infección por HIV permanecen aún sin resolver. Hipotéticamente, la disfunción fagolisosomal podría ser el resultado de un efecto directo del virus sobre los monocitos. Diferentes autores han demostrado que los monocitos periféricos obtenidos de individuos seronegativos pueden ser infectados *in vitro* por el HIV (Ho *et al*, 1986; Nicholson *et al*, 1986). Más aún, la infección *in vitro* de los monocitos con diferentes cepas de HIV provoca severos defectos en su funcionalidad que incluyen una reducción en la capacidad de fagocitar y destruir diferentes patógenos como *C. albicans* y *T. gondii* (Crowe *et al*, 1994; Biggs *et al*, 1995) y en la expresión de receptores para la porción Fc de las Igs y productos derivados del complemento (Kent *et al*, 1994). Bukrinsky *et al* (1995) también han demostrado que la infección de monocitos con el HIV aumenta la producción de óxido nítrico (NO) modificando la expresión de la NO sintetasa. Dado que el número de células infectadas en los pacientes HIV positivos aumenta con la progresión de la inmunodeficiencia, ésto explicaría que la alteración de la fusión fagolisosomal se evidencie en estadíos tardíos. Sin embargo, la proporción de linfocitos T CD4+ periféricos infectados en sujetos asintomáticos es de 1:1000 y en pacientes con SIDA puede llegar a 1:100 (Schnitman *et al*, 1989; Brinchmann *et al*, 1991). La proporción de monocitos circulantes infectados es similar o aún menor que en los linfocitos (Spear *et al*, 1990; McElrath *et al*, 1991). Teniendo en cuenta estos hechos, la hipótesis de un efecto directo del virus no parece ser la principal causa del deterioro progresivo de la fusión fagolisosomal monocítica en los pacientes infectados con el HIV.

Otra posible explicación sería que, como consecuencia de la depleción de linfocitos T CD4+, existe una menor producción por parte de esta población celular de factores activadores que indirectamente podría influir sobre la alteración de la fusión. Esto estaría avalado por el hecho de que la disfunción fagolisosomal en los individuos adultos infectados se correlaciona en forma directa con la disminución de linfocitos T CD4+ y con la inversión del cociente CD4/CD8. Por otra parte, Clerici & Shearer (1993) han propuesto que durante el curso de la infección por HIV se produce un cambio progresivo en el fenotipo funcional Th1 a Th2. Como consecuencia se observa una disminución en la inmunidad celular debido a la reducción en la producción de IL-2 e IFN-γ y un aumento de la inmunidad humoral a través de la producción de IL-4 e IL-10. Este hecho ha sido recientemente observado también en la población pediátrica infectada con el HIV (Viganó *et al*, 1995). Asimismo, la deficiencia en la síntesis de IL-12 por parte de los macrófagos infectados, provoca una disminución en los niveles de IFN-γ (Chehimi *et al*, 1994). Clerici *et al* (1993) observaron que la respuesta inmune mediada por células, específica contra el HIV, puede ser restaurada por el agregado *in vitro* de IL-12. Por lo tanto, la desregulación en la producción de citoquinas, en especial de factores activadores del sistema monocito-macrófago como el IFN-γ, podrían contribuir a la alteración paulatina de la funcionalidad de los monocitos circulantes observada en la infección por HIV.

En la actualidad, existe suficiente evidencia que demuestra que ciertos productos virales solubles son capaces de inducir alteraciones funcionales en las diferentes células inmunocompetentes. En este estudio demostramos que tanto la glicoproteína de envoltura gp120 como la proteína regulatoria Tat, inhiben la fusión fagolisosomal en monocitos periféricos normales sin alterar, bajo las mismas condiciones experimentales, la función candidacida.

La gp120, a través de su interacción con la molécula CD4, inhibe la linfoproliferación antígeno dependiente (Shalaby *et al*, 1987; Manca *et al*, 1990) e inducida por PHA (Mann *et al*, 1987; Diamond *et al*, 1988) y el crecimiento de células progenitoras hematopoyéticas (Zauli *et al*, 1992b). Diferentes autores han demostrado que la gp120, en concentraciones similares a las empleadas en este estudio, es capaz de

disminuir la quimiotaxis e inducir la producción de metabolitos del ácido araquidónico y citoquinas inflamatorias en los monocitos circulantes (Wahl *et al*, 1989a y 1989b; Clouse *et al*, 1991). Recientemente se ha postulado que la gp120 también participaría en la apoptosis celular (Ameisen, 1992). Dawson *et al* (1993) observaron que la gp120 gatillaba la destrucción de neuronas mediada por NO en cultivos corticales primarios.

La proteína regulatoria Tat es un factor fundamental en la replicación viral, que puede ser rápidamente captado por células en cultivo (Frankel *et al*, 1988; Ruben *et al*, 1989). Diferentes autores han demostrado que de acuerdo a las células blanco y a las concentraciones utilizadas, la proteína Tat recombinante puede tener efectos opuestos. Bajas dosis de Tat (0.1-10 ng/ml) estimulan el crecimiento de células de sarcoma de Kaposi y células progenitoras endoteliales (Ensoli *et al*, 1990; Ensoli *et al*, 1993). Altas concentraciones de proteína Tat inhiben la proliferación de los linfocitos T antígeno-dependiente e inducida por PHA (Viscidi *et al*, 1989; Benjouad *et al*, 1993; Subramanyam *et al*, 1993) y estimulan la producción de citoquinas como la IL-6 y TGF-β en monocitos de sangre periférica (Zauli *et al*, 1993; Gibellini *et al*, 1994) y macrófagos tisulares (Zauli *et al*, 1992). Si bien la presencia de proteína Tat soluble en el suero de pacientes HIV positivos no ha sido reportada, la detección de anticuerpos séricos anti-Tat y de linfocitos T citotóxicos Tat-específicos, avalan la existencia de Tat soluble en el suero de pacientes infectados con el HIV (Blazevic *et al*, 1993; Rodman *et al*, 1993).

El hecho de que tanto la gp120 como la Tat provoquen una disminución de la fusión fagolisosomal en monocitos normales sin modificar su capacidad de destruir *C. tropicalis*, indicaría que si bien las vías de interacción con la célula blanco son diferentes, ambas proteínas virales comparten un mecanismo de disfunción común. Diferentes autores han demostrado que bajo condiciones experimentales similares a las nuestras, los monocitos periféricos sintetizan diferentes citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF (Wahl *et al*, 1989b; Clouse *et al*, 1991; Buonaguro *et al*, 1992). Más aún, los niveles séricos de estas citoquinas se encuentran aumentados en los pacientes infectados con el HIV (Weis *et al*, 1989). Actualmente se acepta que las interleuquinas inflamatorias son buenas inductoras de la generación de intermediarios reactivos del oxígeno. Por lo tanto,

las proteínas virales *in vitro* podrían inducir indirectamente un aumento en la producción de radicales libres que tendría un doble efecto sobre la funcionalidad de los monocitos: por un lado el aumento del daño oxidativo dificultaría la formación de los fagolisosomas, y por el otro contribuiría en la destrucción de *C.tropicalis* mediada por mecanismos oxígeno dependientes, explicando porque no se evidencia una alteración de la actividad candidacida. Asimismo, el efecto de las proteínas virales sobre la generación de intermediarios reactivos podría ser directo. Existen evidencias recientes que demuestran que la proteína Tat *in vitro* disminuye la expresión de la superóxido dismutasa, una potente enzima antioxidante, aumentando el estrés oxidativo en células HeLa (Flores *et al*, 1993). Más aún, Pietraforte *et al* (1994) demostraron que la gp120 induce la síntesis de intermediarios reactivos del nitrógeno, en particular del óxido nítrico en cultivos de monocitos humanos.

Por lo tanto, podemos concluir que la presencia crónica de proteínas virales solubles sumada a la disminución de factores activadores en el suero y otros fluídos biológicos, contribuyen a la alteración de la funcionalidad del sistema monocito-macrófago en los individuos infectados con el HIV, en especial en los estadíos más avanzados de la inmunodeficiencia.

2. FUSION FAGOLISOSOMAL MONOCITICA EN PACIENTES CON TALASEMIA MAYOR

En este trabajo demostramos que la fusión fagolisosomal de los monocitos de sangre periférica de pacientes con talasemia mayor se encuentra disminuída, mientras que los portadores del alelo talasémico presentan valores de fusión similares a los controles normales.

La alteración encontrada en la fusión fagolisosomal monocítica de los pacientes talasémicos coincide con otras modificaciones funcionales descriptas anteriormente en las células fagocíticas que afectan la quimiotaxis (Khan *et al*, 1977; Testoni *et al*, 1990; Palacios *et al*, 1993). En nuestro laboratorio observamos que los monocitos de pacientes talasémicos presentan una disminución en la capacidad de destruir *C.pseudotropicalis*, que se correlaciona con una reducción en la generación de metabolitos tóxicos del oxígeno, demostrando una deficiencia de los mecanismos microbicidas oxígeno dependientes en los monocitos de estos pacientes (Ballart *et al*, 1986). En este estudio demostramos que los mecanismos oxígeno independientes, evaluados a través de la fusión fagolisosomal, también se encuentran alterados en los individuos con talasemia mayor.

Los defectos inmunes secundarios presentes en los pacientes talasémicos han sido generalmente atribuídos a la estimulación antigénica y en especial, a la sobrecarga de hierro que resultan de su contínuo tratamiento con transfusiones sanguíneas; este deterioro inmunológico es progresivo con la evolución de la enfermedad y se acentúa con la esplenectomía (Ballart *et al*, 1988; De Sousa, 1989).

El mantenimiento de la homeostasis del hierro en el organismo es un requisito fundamental para muchos procesos biológicos esenciales y es un elemento central en la regulación de la función inmune. Tanto la sobrecarga como la deficiencia de hierro provocan diferentes alteraciones del sistema inmune, afectando por ejemplo, la proliferación de los linfocitos T y B. Más aún, la disponibilidad de hierro celular puede influir en forma diferente sobre la proliferación de las subpoblaciones de linfocitos T colaboradores, Th1 y Th2, modulando sus actividades y mecanismos efectores (Weiss *et al*, 1995). En los individuos con sobrecarga de hierro, ya sea por un aumento de la absorción intestinal o por las transfusiones sanguíneas, la proteína transportadora de hierro, la transferrina, se encuentra saturada en un 90% o más. Hershko *et al* (1978) demostraron en el suero de pacientes con β-talasemia la presencia inusual de una fracción de hierro libre, no unida a transferrina, potencialmente tóxico.

Los mecanismos involucrados en la disfunción fagolisosomal en los pacientes talasémicos podrían estar relacionados con la sobrecarga de hierro. En este estudio demostramos que el agregado *in vitro* de hierro es capaz de inhibir la fusión fagolisosomal normal. El efecto del hierro *in vitro* sobre la capacidad funcional de las células fagocíticas ha sido previamente descripto. Diferentes autores observaron que la fagocitosis de neutrófilos disminuye cuando las células se incuban en presencia de hierro (III) o hierro (II) (Van Asbeck *et al*, 1984a; Hoepelman *et al*, 1988a). Más aún, Hoepelman *et al* (1988b) demostraron que la alteración funcional de los neutrófilos mediada por hierro se debe a la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y a una acción directa del hierro con la membrana celular.

La activación de las células fagocíticas está acompañada de un aumento en la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, que requiere estrictamente la presencia de un metal de transición como el hierro (Halliwell, 1987; Gutteridge, 1989). El hierro, que se encuentra unido a la ferritina, al ser liberado es capaz de catalizar estas reacciones (Reif, 1992). En los pacientes talasémicos politransfundidos, un aumento del hierro reactivo podría inducir un aumento en la generación de radicales libre oxigenados. De Martino *et al* (1984) observaron una mayor producción de anión superóxido en neutrófilos de pacientes con β-talasemia, tanto al ser estimulados con PHA como en ausencia de estímulo. En este último caso, la generación de anión superóxido se correlaciona en forma directa con los niveles de ferritina sérica. Por el contrario, cuando los mismos neutrófilos se estimulan con zymosan opsonizado, los niveles de anión superóxido son inferiores a los controles normales. Este hecho indicaría una deficiencia en el gatillado del estallido respiratorio mediado por el proceso de fagocitosis. La disminución de la fusión fagolisosomal de los monocitos de pacientes con talasemia mayor podría deberse a la alteración de los componentes estructurales de las membranas mediada por una excesiva producción de radicales libres de oxígeno. Los niveles de ferritina sérica de los pacientes talasémicos incorporados en este estudio se encuentran unas 100 veces por encima del rango normal. Creemos que estos niveles de ferritina son suficientemente elevados como para provocar una alteración de la fusión

fagolisosomal, explicando el hecho de que no observamos correlación entre la disfunción celular y los valores de ferritina en el suero de estos pacientes.

La incubación de los monocitos circulantes normales en un medio generador de radicales libres (xantina-xantina oxidasa) inhibió marcadamente la fusión fagolisosomal. La reversión por el agregado de SOD y catalasa indican que la alteración de la fusión fagolisosomal está mediada por la acción de radicales libres de oxígeno. Nuestros hallazgos coinciden con los realizados por otros autores (Rachmilewitz *et al*, 1976; Miniero *et al*, 1983) y avalan la hipótesis de que la disfunción fagolisosomal en los pacientes talasémicos podría deberse a la alteración de las membranas celulares causada por un aumento en la oxidación de sus componentes estructurales. Más aún, Fong *et al* (1973) demostraron que los radicales libres inducen la peroxidación lipídica en las membranas lisosomales. Por su parte, Selden *et al* (1980) observaron en muestras de biopsias hepáticas de pacientes con sobrecarga de hierro, un aumento de la fragilidad de los lisosomas. Mak *et al* (1985) observaron que los lisosomas aislados de tejido hepático son extremadamente susceptibles al daño peroxidativo mediado por hierro. Estos autores postularon que la degradación de la membrana lisosomal y la liberación de las hidrolasas ácidas podrían ser responsables del daño hepático que presentan los pacientes con sobrecarga de hierro. El aumento del daño oxidativo está reflejado por un desbalance entre la generación de radicales libres de oxígeno y la acción de los mecanismos antioxidantes. En este estudio observamos un aumento de los productos de peroxidación lipídica que se corresponde con una disminución de los niveles de vitamina E en el suero de los pacientes con talasemia mayor respecto de los portadores. Tomando en cuenta estos hechos, postulamos que en los pacientes talasémicos el exceso de hierro cataliza un aumento en la generación de radicales libres de oxígeno, que afecta directamente los componentes de las membranas, dificultando la maduración de los fagosomas y la formación de los fagolisosomas.

La fusión fagolisosomal de los portadores no difiere significativamente de los controles normales. Sin embargo, este grupo presenta una amplia dispersión de los datos, indicando que en algunos casos la fusión puede estar disminuída. Si bien estos

individuos no presentan alteraciones severas como los pacientes β-talasémicos, su anemia crónica compensada podría modificar levemente la homeostasis normal del hierro, influyendo sobre la funcionalidad de los monocitos. Sin embargo, desde el punto de vista del estrés oxidativo, estos sujetos se comportan en forma similar a los normales.

La deferoxamina es un inhibidor de la generación de radicales libres mediada por hierro. Los quelantes exógenos como la deferoxamina pueden impedir el daño celular secuestrando el hierro en una forma catalíticamente inactiva (Halliwell, 1989). En este estudio observamos que el agregado de deferoxamina a los cultivos de monocitos obtenidos de pacientes con talasemia mayor mejora la fusión fagolisosomal, sin alterar dicha función en los portadores y en los controles normales. Coincidentemente con nuestros hallazgos, Cantinieaux *et al* (1990) demostraron que el tratamiento *in vitro* con deferoxamina mejora la función fagocítica en neutrófilos de pacientes talasémicos y revierte el defecto fagocítico inducido en neutrófilos de individuos normales preincubados con sueros talasémicos. Asimismo, Van Asbeck *et al* (1984b) observaron una mayor capacidad de fagocitar y destruir *S. aureus* opsonizadas, que se corresponde con un aumento en la emisión de quimioluminiscencia y generación de anión superóxido en neutrófilos tratados con deferoxamina respecto de las células sin tratamiento o preincubadas con deferoxamina saturada de hierro. Tomando en cuenta la recuperación de las funciones en los neutrófilos y el mejoramiento de la función monocítica en los pacientes talasémicos, podemos concluir que la deferoxamina *in vitro* confiere a las células protección contra la injuria mediada por procesos dependientes de hierro.

Por otra parte, Speer *et al* (1990) analizaron el estado inmunológico de un grupo de pacientes con β-talasemia que reciben terapia quelante con deferoxamina. En los pacientes, las funciones de los fagocitos incluídas la adherencia, la migración espontánea, la quimiotaxis, la destrucción de *E. coli* y la producción de anión superóxido no difieren de los controles normales. La proliferación de los linfocitos T en respuesta a diferentes estímulos como PHA, concanavalina A o pokeweed mitogen (PWM) es similar en los pacientes y en los controles. En cambio, el número de linfocitos T y B está elevado en algunos casos. Cantinieaux *et al* (1990) demostraron que la infusión subcutánea de

deferoxamina mejora la fagocitosis y reduce la acumulación de hierro intracelular en los individuos talasémicos. En nuestro caso, la fusión fagolisosomal monocítica se encuentra disminuída en todos los pacientes talasémicos independientemente de que reciban o no terapia quelante. Sin embargo, al comparar el grado de alteración de la fusión fagolisosomal en el grupo de pacientes con deferoxamina respecto del grupo de pacientes sin tratamiento quelante, observamos que el defecto funcional se acentúa significativamente en aquellos individuos talasémicos sin deferoxamina. Más aún, el análisis comparativo del estrés oxidativo en ambos grupos de pacientes revela que el mayor índice de peroxidación lipídica conjuntamente con los niveles más bajos de vitamina E corresponden a los pacientes talasémicos que no reciben tratamiento quelante, aunque estas diferencias no alcanzan significación estadística. Nuestros resultados sugieren que el tratamiento *in vivo* con deferoxamina también mejora el proceso de fusión de los fagosomas con los lisosomas en los monocitos de pacientes con talasemia mayor, probablemente asociado a una disminución del daño oxidativo.

En conclusión, la fusión fagolisosomal en los pacientes con β-talasemia se encuentra disminuída. Este defecto se debe a la alteración de la estructura del sistema de membranas ocasionada por un aumento en la oxidación de sus componentes por la generación de radicales libres mediada por la sobrecarga de hierro. El tratamiento con deferoxamina tanto *in vitro* como *in vivo* es capaz de mejorar la fusión fagolisosomal monocítica en los pacientes talasémicos asociado a una disminución del estrés oxidativo, brindando así mayor protección contra los agentes patógenos.

3. CONCLUSION FINAL

En este trabajo demostramos un defecto progresivo en los monocitos periféricos a nivel de los mecanismos oxígeno independientes, evaluados a través de la fusión fagolisosomal, en dos modelos claramente diferentes de patologías asociadas a inmunodeficiencias secundarias como son la infección por HIV y la talasemia mayor.

En cada uno de los dos modelos estudiados intentamos identificar los posibles factores responsables de la alteración funcional, estableciendo similitudes y diferencias entre ambas patologías.

En el caso de la infección por el HIV, la disfunción fagolisosomal monocítica en niños y adultos HIV positivos es progresiva y está estrechamente relacionada con la clínica, evidenciándose especialmente en los estadíos más avanzados de la enfermedad. Las proteínas virales gp120 y Tat estarían vinculadas a la alteración de la formación de los fagolisosomas, probablemente a través de la inducción del daño oxidativo. La presencia crónica de productos virales en el suero y en otros fluídos biológicos de pacientes HIV positivos, podría ser una de las principales causas de la disfunción monocítica en la infección por HIV.

En el caso de la talasemia mayor, la disminución de la fusión fagolisosomal de los monocitos de sangre periférica se debería fundamentalmente a la sobrecarga de hierro por las múltiples transfusiones de sangre que reciben. Dado que el hierro es un excelente catalizador de las reacciones de generación de radicales libres de oxígeno, éste induciría un aumento de la oxidación de los componentes estructurales de las membranas plasmática y lisosomal, dificultando el proceso de formación de los fagolisosomas. El aumento del daño oxidativo *in vivo* está reflejado por un aumento en los niveles séricos de lípidos peroxidados y un descenso en los niveles de vitamina E. Por otra parte, el análisis comparativo de la fusión fagolisosomal monocítica entre pacientes talasémicos que reciben tratamiento con deferoxamina y pacientes sin terapia quelante, reveló que el defecto en dicha función se acentúa en los pacientes sin deferoxamina, quienes

coincidentemente presentan los índices más elevados de daño oxidativo. Tomando en cuenta estos hallazgos, concluímos que la sobrecarga de hierro es la causa principal de la disfunción fagolisosomal en los pacientes β-talasémicos.

Si bien las causas involucradas en la alteración de la fusión fagolisosomal en ambos modelos de inmunodeficiencias secundarias son diferentes, el mecanismo a través del cual provocan dicha alteración podría ser común. La estimulación crónica por productos virales, aloantígenos y la sobrecarga de hierro provocaría un aumento en los niveles basales de radicales libres de oxígeno. La persistencia de estos compuestos en el entorno celular causaría a su vez la alteración oxidativa de diversos componentes estructurales y funcionales de las membranas plasmática y vesicular, impidiendo la correcta maduración de los fagosomas y la formación de los fagolisosomas.

DISCUSION

CAPITULO IV

- Adams LB, Hibbs JB, Taintor RR, *et al.* Microbiostatic effect of murine macrophages for *Toxoplasma gondii*: role of synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. J Immunol 1990, 144:2725.
- Akbar AN, Giardina PJ, Hilgartner MW, *et al.* Immunological abnormalities in thalassemia major. A transfusion-related increase in circulating cytoplasmic immunoglobulin-positive cells. Clin Exp Immunol 1985, 62:397.
- Allen R, Traynor A, Omann G, *et al.* The chemotactic peptide receptor: a model for future understanding of chemotactic disorders. Hematol/Oncol Clin NA 1988, 2:33.
- Amadori A, De Silvestro G, Zamarchi R, *et al.* CD4 epitope masking by CD4+ cell function down-regulation in AIDS patients. J Immunol 1992, 148:2709.
- Ameisen JC & Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. Immunol Today 1991, 12:102.
- Antonen J & Krohn K. Interleukin 2 production in HTLV-III/LAV infection: evidence of defective antigen-induced, but normal mitogen-induced IL-2 production. Clin Exp Immunol 1986, 65:489.
- Armstrong JA & D'Arcy Hart P. Phagosome lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercule bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. J Exp Med 1975, 142:1.
- Asjo B, Albert J, Karlsson A, *et al.* Replicative properties of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection. Lancet 1986, 2:660.
- Auger MJ & Ross JA. The biology of the macrophage. En: The macrophage (ed. CE Lewis & JO'D McGee), Oxford University Press, Nueva York, 1992.
- Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifacetted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. Experientia 1991, 47:22.
- Babgy GC, Dinarello CA, Wallace P, *et al.* Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. J Clin Invest 1986, 78:1316.
- Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. N Engl J Med 1978, 298:659.

- Babior BM. The respiratory burst oxidase. Hematol/Oncol Clin NA 1988, 2:201.
- Bacon BR, Tavill AS, Brittenham GM, *et al.* Hepatic lipid peroxidation *in vivo* in rats with chronic iron overload. J Clin Invest 1983, 71:429.
- Ballart IJ, Diez RA, Estevez ME, *et al.* Efecto de la esplenectomía sobre las poblaciones linfocitarias en talasemia mayor. Sangre 1985, 30:137.
- Ballart IJ, Estevez ME, Sen L, *et al.* Progressive dysfunction of monocytes associated with iron overload and age in patients with thalassaemia major. Blood 1986, 67:105.
- Ballart IJ, Estevez ME, Diez RA, *et al.* Comparison of *Candida* killing activity measured by chemiluminescence and cytomorphological methods in human phagocytes. J Immunol Meth 1987, 97:263.
- Ballart IJ, Estevez ME, Muchinik G, *et al.* Immune status in thalassaemia major. Haematologica 1988, 73:153.
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome. Science 1983, 220:868.
- Bastian NR & Hibbs JB. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. Curr Op Immunol 1994, 6:131.
- Beaman L, Benjamini E, Pappagianis D. Activation of macrophages by lymphokines: enhancement of phagosome-lysosome fusion and killing of Coccidioides immitis. Infect Immun 1983, 39:1201.
- Benjouad A, Mabrouk K, Moulard M, *et al.* Cytotoxic effect on lymphocytes of Tat from human immunodeficiency virus (HIV-1). FEBS Lett 1993, 319:119.
- Bieri JG, Tolliver TJ, Catignani GL. Simultaneous determination of a-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography. Am J Clin Nutr 1979, 32:2143.
- Biggs BA, Hewish M, Stephen K, *et al.* HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *T. gondii.* J Immunol 1995, 154:6132.
- Blanche S, Tardieu M, Deliege AM, *et al.* Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatal acquired human immunodeficiency virus infection: evidence of a

bimodal expression of clinical and biological symptoms. Am J Dis Child 1990, 144:1210.

- Blauvelt A, Clerici M, Lucey DR *et al.* Functional studies of epidermal Langerhans cells and blood monocytes in HIV- infected persons. J Immunol 1995, 154:3506.
- Blazevic V, Ranki A, Mattinen S, *et al.* Helper T-cell recognition of HIV -1 Tat synthetic peptides. J AIDS 1993, 6:881.
- Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, *et al.* Virus-specific CD8+ cytotoxic T-Lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol 1994, 68:6103.
- Boxer L & Smolen J. Neutrophil granule constituents and their release in health and disease. Hematol/Oncol Clin NA 1988, 2:101.
- Brinchmann JE, Albert J, Vartdal F. Few infected CD4+ T cells but a high proportion of replication-competent provirus copies in asymptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection. J Virol 1991, 65:2019.
- Broliden K, Sievers E, Tovo PA, *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity with neutralizing activity sera of HIV-1 infected mothers and their children. Clin Exp Immunol 1993, 93:56.
- Broudy VC, Kaushansky K, Segal GM, *et al.* Tumor necrosis factor type alpha stimulates human endothelial cells to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:7467.
- Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, *et al.* Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells *in vivo*. J Exp Med 1985, 161:40.
- Bukrinsky MI, Stanwick TL Dempsey MP, *et al.* Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. Science 1991, 254:423.
- Bukrinsky MI, Nottet SLM, Schmidtmayerova H, *et al.* Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. J Exp Med 1995, 181:735.

- Buonaguro L, Barillari G, Chang HK, *et al.* Effects of the human immunodeficiency virus type 1 tat protein on the expression of inflammatory cytokines. J Virol 1992, 66:7159.
- Burgard M, Mayaux MJ, Blanche S, *et al.* The use of virus culture and p24 antigen testing to diagnose human immunodeficiency virus infection in neonates. New Engl J Med 1992, 327:1192.
- Cantinieaux B, Hariga C, Ferster A, *et al.* Neutrophil dysfunctions in thalassaemia major: the role of iron overload. Eur J Hematol 1987, 39:28.
- Cantinieaux B, Chantal H, Ferster A, *et al.* Desferrioxamine improves neutrophil phagocytosis in thalassaemia major. Am J Hematol 1990, 35:13.
- Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Genotype-phenotype correlations in β-thalassemias. Blood Rev 1994, 8:1.
- Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, *et al.* Fc receptors expression and function in mononuclear phagocytes from AIDS patients: modulation by IFN-γ. Scand J Immunol 1994, 39:45.
- Carotenuto P, Pontesilli O, Cambier J, *et al.* Desferoxamine blocks IL-2 receptor expression on human T lymphocytes. J Immunol 1986, 136:2342.
- Center for Disease Control. Classification system for HTLV-III/LAV infections. MMWR 1986, 35:334.
- Center for Disease Control. Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. MMWR 1987, 36(suppl):3.
- Center for Disease Control. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. MMWR 1992,41:1.
- Center for Disease Control. Revised classification system for HIV infection in children less than 13 years of age. MMRW 1994, 43:1.
- Chanock SJ, El Benna J, Smith RM, *et al.* The respiratory burst oxidase. J Biol Chem 1994, 269:24519.

- Chehimi J, Starr SE, Frank I, *et al.* Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. J Exp Med 1994, 179:1361.
- Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, *et al.* Biologic features of HIV-1 that correlate with virulence in the host. Science 1988, 240:80.
- Clavel F, Guetad D, Brun-Bezinet F, *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 1986, 223:343.
- Clemente MG, Congia M, Lai ME, *et al.* Effect of iron overload on the response to recombinant interferon-alfa treatment in transfusion-dependent patients with thalassemia major and chronic hepatitis C. J Pediatr 1994, 125:123.
- Clerici M & Shearer G. A Th1--> Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. Immunol Today 1993, 14:107.
- Clerici M, Lucey DR, Berzofsky JA, *et al.* Restoration of HIV-specific cell-mediated immune reponses by interleukin-12 *in vitro*. Science 1993, 262:1721.
- Clerici M, Wynn TA, Berzofky JA, *et al.* Role of interleukin 10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. J Clin Invest 1994, 93:768.
- Clouse KA, Cosentino LM, Weih KA, *et al.* The HIV gp120 envelope glycoprotein has the intrinsic capacity to stimulate monokine secretion. J Immunol 1991, 147:2892.
- Cohen A. Current status of iron chelation therapy with deferoxamine. Semin Hematol 1990, 27:86.
- Crowe S, Mills J, McGrath MS. Quantitative immunocytofluorographic analysis of CD4 surface antigen expression and HIV infection of human peripheral blood monocyte/macrophages. AIDS Res Hum Retroviruses 1987, 3:135.
- Crowe SM, Vardaxis NJ, Kent SJ, *et al.* HIV infection of monocyte-derived macrophages *in vitro* reduces phagocytosis of *Candida albicans*. J Leuk Biol 1994, 56:318.
- Cullen BR. Regulation of HIV-1 gene expression. FASEB J 1991, 5:236.
- D'Arcy Hart P & Young M. Interference with normal phagosome-lysosome fusion in macrophages using ingested yeasts cells and suramin. Nature 1975, 256:47.

- D'Arcy Hart P & Young M. The effect of inhibitors and enhancers of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages on the phagosome membrane of ingested yeasts. Exp Cell Res 1979, 118:305.
- D'Arcy Hart P, Young M, Geisow M. Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. J Exp Med 1983, 158:477.
- D'Arcy Hart P, Young M, Sullivan K. Inhibition of phagosome-lysosome fusion in macrophages by certain mycobacteria can be explained by inhibition of lysosomal movements observed after phagocytosis. J Exp Med 1987, 166:933.
- 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.
- Dawson VL, Dawson TM, Uhl GR, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 coat protein neurotoxicity mediated by nitric oxide in primary cortical cultures. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:3256.
- De Chatelet L, Shirley P, Johnston R. Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leukocytes. Blood 1976, 47:545.
- De Martino M, Rossi ME, Resti M, *et al.* Changes in superoxide anion production in neutrophils from multitransfused beta-thalassaemia patients: correlation with ferritin levels and liver damage. Acta Haemat 1984, 71:289.
- De Martino M, Tovo PA, Galli L, *et al.* Prognostic significance of immunologic changes in 675 infants perinatally exposed to human immunodeficiency virus. J Pediatr 1991, 5:702.
- De Sousa M. Immune cell functions in iron overload. Clin Exp Immunol 1989, 75:1.
- De Virgiliis, Fiorelli G, Fargion S, *et al.* Chronic liver disease in transfusion-dependent thalassemia: hepatitis B virus marker studies. J Clin Pathol 1980, 33:949.
- De Wolf F, Lange, JMA, Houwleling JTM, *et al.* Numbers of CD4+ cells and the levels of core antigens and antibodies to human immunodeficiency virus as predictors of AIDS among seropositive homosexual men. J Inf Dis 1988, 158:615.

- Denicola A, Rubbo H, Rodríguez D, *et al.* Peroxynitrite-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi.* Arch Biochem Biophys 1993, 304:279.
- Denis M. Human monocytes/macrophages: NO or no NO? J Leuk Biol 1994, 55:682.
- Desjardins M, Huber LA, Parton RG, *et al.* Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. J Cell Biol 1994, 124:677.
- Diamond DC, Sleckman BP, Gregory, *et al.* Inhibition of CD4+ T-cell function by the HIV envelope protein gp120. J Immunol 1988, 141:3715.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. J Immunol 1988, 141:2407.
- Docherty K, Maguire G, Hales N. Permeability properties of lysosomal membranes. Biosc Reports 1983, 3:207.
- Douglas SD & Hassan NF. Morphology of monocytes and macrophages. En: Haematology, 4th edn. (ed. WJ Williams *et al*), McGraw-Hill, Nueva York, 1990.
- Dwyer J, Wood C, McNamara J, *et al.* Abnormalities in the immune system of children with beta-thalassemia. Clin Exp Immunol 1987, 68:621.
- Eales LJ, Moshtael O, Pinching AJ. Microbicidad activity of monocyte derived macrophages in AIDS and related disorders. Clin Exp Immunol 1987, 67:227.
- Embretson J, Inpancic M, Ribas JL, *et al.* Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. Nature 1993, 362:359.
- Ensoli B, Barillari G, Zaki-Salahuddin S, *et al.* Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. Nature 1990, 345:84.
- Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, *et al.* Release, uptake and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. J Virol 1993, 67:277.

- Español T, Caragol I, Bertran JM. Evolution of immunological abnormalities in HIV infection by vertical transmission. Acta Pædiatr Suppl 1994, 400:35.
- Esterbauer H & Cheeseman KH. Determination of aldehidic lipid peroxidation products: malonaldehide and 4-hydroxynonenal. Meth Enzymol 1990, 186:407.
- Estevez ME, Sen L, Valdez R, *et al.* Defective blood mononuclear phagocyte function in patients with leprosy. Int J Lepr 1979, 47:575.
- Estevez ME, Sen L, Bachmann AE, *et al.* Defective function of peripheral blood monocytes in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. Cancer 1980, 46:299.
- Estevez ME, Ballart IJ, Diez RA, *et al.* Early defect of phagocytic cell function in subjects at risk for acquired immunodeficiency syndrome. Scand J Immunol 1986, 24:215.
- Estevez ME & Sen L. Defects in phagocytic cell function and risk of progression to AIDS. En: Cofactors in HIV infection and AIDS, (de. RR Watson), CRC Press, Florida, 1989.
- European Collaborative Study. Risk factors in mother-to-child transmission of HIV-1. Lancet 1992, 339:1007.
- European Collaborative Study. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus-1 infection. Pediatrics 1994, 94:815.
- Evans LA, McHugh TM, Stites DP, *et al.* Differential ability of HIV isolates to productively infect human cells. J Immunol 1987, 138:3415.
- Evans TG, Rasmussen K, Wiebke G, *et al.* Nitric oxide synthesis in patients with advanced HIV infection. Clin Exp Immunol 1994, 97:83.
- Fahey JL, Taylor JMG, Detels R, *et al.* The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. N Engl J Med 1990, 322:166.
- Fainbom L & Satz L. Presentación antigénica y activación linfocitaria. En: Introducción a la inmunología humana, Buenos Aires, 1992.

- Finbloom DS, Hoover DL, Meltzer MS. Binding of recombinant HIV coat protein gp120 to human monocytes. J Immunol 1991, 146:1316.
- Flint J, Harding RM, Boyce AJ, *et al.* The population genetics of the haemoglobinopathies. Balliere's Clin Haematol 1993, 6:1.
- Flores SC, Marecki JC, Harper KP, *et al.* Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of manganese superoxide dismutase in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:7632.
- Fong KL, McCay PB, Peyer JL, *et al.* Evidence that peroxidation of lysosomial membranes is initiated by free radicals produced during flavin enzyme activity. J Biol Chem 1973, 249:7792.
- Forget BG. The pathophysiology amd molecular genetics of beta thalassemia. Mount Sinai J Med 1993, 60:95.
- Frank M & Fries L. The role of complement in inflammation and phagocytosis. Immunol Today 1991, 12:322.
- Frankel AD & Pabo CO. Cellular uptake of the Tat protein from human immunodeficiency virus. Cell 1988, 55:1189.
- Frigerio R, Mela Q, Passiu G, *et al.* Iron overload and lysosomal stability in β-thalassaemia intermedia and trait: correlation between serum ferritin and serum N-acetyl-β-D-glucosaminidase levels. Scand J Haematol 1984, 33:252.
- Furth R & Sluiter W. Distribution of blood monocytes between a marginating and a circulating pool. J Exp Med 1986, 163:474.
- Gallo RC, Zalahuddin SZ, Popovic M, *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retrovirus (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. Science 1984, 224:500.
- Ganz T, Selsted Me, Lehrer R. Antimicrobial activity of phagocyte granule proteins. Sem Resp Infect 1986, 1:107.
- Gartner S, Markovits P, Markovits DM, *et al.* The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. Science 1986, 233:215, (a).

- Gartner S, Markovits P, Markovitz DM, *et al.* Virus isolation from and identification of HTLV-III/LAV-producing cells in brain tissue from a patient with AIDS. JAMA 1986, 256:2365, (b).
- Gascon P, Zoumbos NC, Young NS. Immunologic abnormalities in patients receiving multiple blood transfusions. Ann Int Med 1984, 100:173.
- Geisow M, D'Arcy Hart P, Young M. Site of action of a polyanion inhibitor of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. Exp Cell Res 1980, 126:159.
- Gibellini D, Zauli G, Re MC, *et al.* Recombinant human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein specifically up-regulates IL-6 and TGF-ß1 mRNA expression and protein synthesis in peripheral blood monocytes. Br J Haematol 1994, 88:261.
- Giorgi JV, Fahey JL, Smith DC, *et al.* Early effects of HIV on CD4 lymphocytes *in vivo*. J Immunol 1987, 138:3725.
- Giuntoli JMT, Estevez ME, Sen L, *et al.* Defective function of the peripheral blood neutrophils in thalassaemia major. Am J Pediatr Hematol/Oncol 1984, 6:215.
- Glantz SA. Primer of biostatistics. Mac Graw Hill Books Co., Nueva York, 1987.
- Goedert JJ, Mendez H, Drummond JE, *et al.* Mother-to-infant transmission of human immunodeficiency virus type I: Association with prematurity or low anti-gp120. Lancet 1989, ii:1351.
- Goicoa MA, Estevez ME, Ballart IJ, *et al.* Impairment of natural killer (NK) function in carriers and patients with thalassaemia major. Nouv Rev Fr Hematol 1986, 28:75.
- Goicoa MA, Ballart IJ, Palacios MF, *et al.* Effect of indomethacin and thymostimulin on natural killer activity of thalassemic patients and normal subjects. Int J Immunopathol Pharmacol 1992, 1:23.
- Goldstein I & Weissmann G. Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J Clin Invest 1975, 56:1155.
- Gordon A, D'Arcy Hart P, Young M. Ammonia inhibit phagosome-lysosome fusion in macrophages. Nature 1980, 286:79.

- Gordts B, Rummens E, Demeirleir L, *et al. Yersinia pseudotuberculosis* septicaemia in thalassaemia major. Lancet 1984, 1:41.
- Goren M, D'Arcy Hart P, Young M, *et al.* Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 1976, 73:2510.
- Goren M. Phagocyte lysosomes: interactions with infectious agents, phagosomes and experimental perturbations in function. Annu Rev Microbiol 1977, 31:507.
- Goren M, Vatter A, Fiscus J. Polyanionic agents as inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages: evolution of an alternative interpretation. J Leuk Biol 1987, 41:111, (a).
- Goren M, Vatter A, Fiscus J. Polyanionic agents do not inhibit phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages. J Leuk Biol 1987, 41:122, (b).
- Goren M & Mor N. Influence of phagosomal contents on the apparent inhibiton of phagosome-lysosome fusion mediated by polyanionic substances in mouse peritoneal macrophages. Biochem Cell Biol 1990, 68:24.
- Grady RW, Arkabar A, Giardina PJ, *et al.* Disproportionate lymphoid cell subsets in thalassemia major; the relative contributions of transfusion and splenectomy. Br J Haematol 1985, 72:361.
- Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, *et al.* Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of macrophages. J Clin Invest 1990, 85:264.
- Graziosi C, Pantaleo G, Butini L, *et al.* Kinetics of HIV DNA RNA synthesis during primary HIV-1 infection. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:6505.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, *et al.* Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. J Immunol 1990, 144:278.
- Groux H, Torpier G, Monte D, *et al.* Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. J Exp Med 1992, 175:331.

- Guglielmo P, Cunsolo F, Lombardo T, *et al.* T subset abnormalities in thalassemia intermedia: possible evidence of a thymus functional deficiency. Acta Haematol 1984, 72:361.
- Gupta S & Safai B. Deficient autologous mixed lymphocyte reaction in Kaposi's sarcoma associated with deficiency of Leu-3+ responder T cells. J Clin Invest 1983, 71:296.
- Gurtler LG, Hauser PH, Eberle J, *et al.* A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. J Virol 1994, 68:1581.
- Gutteridge JMC. Iron and oxygen: a biologically damaging mixture. Acta Pediatr Scand. Suppl. 1989, 361:78.
- Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. FASEB J 1987, 1:358.
- Halliwell B. Protection against tissue damage *in vivo* by desferrioxamine: what is its mechanism of action? Free Rad Biol Med 1989, 7:645.
- Heys AD & Dormandy TL. Lipid peroxidation in iron-overloaded spleens. Clin Sci 1981, 60:295.
- Hershko C, Graham G, Bates GW, *et al.* Non-specific serum iron in thalassaemia: an abnormal serum iron fraction of potential toxicity. Br J Haematol 1978, 40:255.
- Hershko C, Link G, *et al.* Modification of iron uptake and lipid peroxidation by hipoxia, ascorbic acid, and alpha-tocopherol in iron loaded rat myocardial cell cultures. J Lab Clin Med 1987, 110:355.
- Hershko C, Pinson A, Link G. Iron chelation. Blood Rev 1990, 4:1.
- Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of monocyte/macrophages by human T lymphotropic virus type III. J Clin Invest 1986, 77:1712.
- Hoepelman IM, Jaarsma EY, Verhoef J, *et al.* Effect of iron on polymorphonuclear granulocyte phagocytic capacity: role of oxidation state and effect of ascorbic acid. Br J Haematol 1988, 70:495, (a).
- Hoepelman IM, Jaarsma EY, Verhoef J, *et al.* Polynuclear iron complexes impair the function of polymorphonuclear granulocytes. Br J Haematol 1988, 68:385, (b).

- Hoffbrand AV & Wonke B. Results of long-term subcutaneous desferrioxamine therapy. Bailliere's Clin Haematol 1989, 2:345.
- Horwitz M. The legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. J Exp Med 1983, 158:2108.
- Hu R, Oyaizu N, Kalyanaraman VS, *et al.* HIV-1 gp 160 as a modifier of Th1 and Th2 cytokine response: gp 160 suppresses interferon-γ and interleukin-2 production concomitantly with enhanced interleukin-4 production *in vitro*. Clin Immunol Immunopathol 1994, 73:245.
- Johnston R. Monocytes and macrophages. N Engl J Med 1988, 318:747.
- Kapadia A, de Sousa M, Markenson A, *et al.* Lymphoid cell sets and serum immunoglobulins in patients with primary idiopathic haemochromatosis. Br J Haematol 1980, 45:405.
- Kent SJ, Stent G, Sonza SD, *et al.* HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages reduces Fc and complement receptor expression. Clin Exp Immunol 1994, 95:450.
- Khalifa AS, Fattah SA, Maged Z, *et al.* Immunoglobulin levels, opsonic activity and phagocytic power in Egyptian thalassemic children. Acta Haematol 1983, 69:136.
- Khalifa AS, Maged Z, Khalil R, *et al.* T cell functions in infants and children with β-thalassaemia. Acta Haematol 1988, 79:153.
- Khan AJ, Lee CK, Wolff JA, *et al.* Defects of neutrophil chemotaxis and random migration in thalassaemia major. Pediatrics 1977, 60:349.
- Kielian M & Cohn Z. Phagosome-lysosome fusion. Characterization of intracellular membrane fusion in mouse macrophages. J Cell Biol 1980, 85:754.
- Kielian M & Cohn Z. Modulation of phagosome-lysosome fusion in mouse macrophages. J Exp Med 1981, 153:1015, (a).
- Kielian M & Cohn Z. Phorbol myristate acetate stimulates phagosome-lysosome fusion in mouse macrophages. J Exp Med 1981, 154:101, (b).
- Kielian M & Cohn Z. Lysosomal accumulation of polyanions II. Polyanion internalization and its influence on lysosomal pH and membrane fluidity. J Cell Biol 1982, 93:875, (a).

- Kielian M, Steinman R,Cohn Z. Intralysosomal accumulation of polyanions I. Fusion of pinocytic and phagocytic vacuoles with secondary lysosomes. J Cell Biol 1982, 93:866, (b).
- Kielian M. Assay of phagosome-lysosome fusion. Meth Enzymol 1986, 132:257.
- Kitahara M, Eyre HJ, Simonian Y, *et al.* Hereditary myeloperoxidase deficiency. Blood 1981, 57:888.
- Kleinerman ES, Ceccorulli LM, Zwelling LA, *et al.* Activation of monocyte-mediated tumoricidal activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Oncol 1985,3:1005.
- Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, *et al.* Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissue from AIDS patients with encephalopathy. Science 1986, 233:1089.
- Kontoghiorghes GJ & Weinberg DE. Iron mammalian defense systems, mechanisms of disease, and chelation therapy approaches. Blood Rev 1995, 9:33.
- Kornfeld H, Cruikshank WW, Pyle SW, *et al.* Lymphocyte activation by HIV-1 envelope glycoprotein. Nature 1988, 335:445.
- Kumar RM, Uduman S, Hamo IM, *et al.* Incidence and clinical manifestations of HIV-1 infection in multitrasnsfused thalassaemic Indian children. Trop Geo Med 1994, 46:163.
- Lachmann PJ & Hobart MJ. Complement technology. En: Handbook of experimental immunology, 3rd edn (ed. DM Weir), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1978.
- Lane HC, Masur H, Edgar LC, *et al.* Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodefidiency syndrome. N Engl J Med 1983, 309:453.
- Lane HC, Depper JM, Green WC, *et al.* Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. N Engl J Med 1985, 313:79.
- Lehrer R, Ganz T, Selsted M. Oxygen-independent bactericidal systems: mechanisms and disorders. Hematol/Oncol Clin NA 1988, 2:159.

- Lehrer R, Barton A, Daher KA, *et al.* Interaction of human defensins with *Escherichia coli*: mechanism of bactericidal activity. J Clin Invest 1989, 84:553.
- Leung K & Goren M. Uptake and utilization of human polymorphonuclear leukocyte granule mieloperoxidase by mouse peritoneal macrophages. Cell Tissue Res 1989, 257:653.
- Levy JA, Shimabukuro J, McHug T, *et al.* AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. Virology 1985, 147:441.
- Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. Microbiol Rev 1993, 57:183.
- Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S. Phagolsomal acidification is mediated by a vacuolar -type proton-ATPase in murine macrophages. J Biol Chem 1990, 265:21099.
- Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S. Determinants of the phagosomal pH in macrophages. J Biol Chem 1991, 266:24540.
- Lund-Johansen F, Olweus J, Horejsi V, *et al.* Activation of human phagocytes through carbohydrate antigens (CD15, sialyl-CD15, CDw17 and CDw65). J Immunol 1992, 148:3221.
- Mak IT & WB Weglicki. Characterization of iron-mediated peroxidative injury in isolated hepatic lysosomes. J Clin Invest 1985, 75:58.
- Manca F, Habesshaw JA, Dalgleish AG. HIV envelope glycoprotein, antigen specific T-cell responses, and soluble CD4. Lancet 1990, 335:811.
- Mandalenaki-Lambrou K, Vrachnou E, Calogeropoulou C, *et al.* Immunological profile after splenectomy in children with beta-thalassaemia major. Acta Haematol 1987, 78:243.
- Mann DL, Lasane F, Popovic M, *et al.* HTLV-III large envelope protein (gp120) supresses PHA-induced lymphocyte blastogenesis. J Immunol 1987, 138:2640.
- Mann DL, Gartner S, Le Sane F, *et al.* HIV-1 transmission and function of virus infected monocytes and macrophages. J Immunol 1990, 144:2152.

- Maüel J, Ransijn A, Buchmuller-Rouiler Y. Killing of leishmania parasites in activated murine macrophages is based on a L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. J Leuk Biol 1991, 49:73.
- Mayorga LS, Bertini F, Stahl PD. Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in cell-free systems. J Biol Chem 1991, 266:6511.
- Mc Elrath MJ, Steinman RM, Cohn ZA. Latent HIV-I in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients. J Clin Invest 1991, 87:27.
- McDonagh KT & Nienhuis AW. The thalassemias. En: Hematology of infancy and childhood, 4th edn (ed. DG Nathan & FA Oski), WB Saunders Co, Filadelfia, 1987.
- Melby K, Slordahl S, Gutteberg TJ, *et al.* Septicemia due to *Yersinia enterocolitica* after oral overdoses of iron. Br Med J 1982, 285:467.
- Metcalf, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. J Cell Physiol 1971, 77:277.
- Meuret G & Hoffmann G. Monocyte kinetic studies in normal and disease states. Br J Haematol 1973, 24:275.
- Mikovits JA, Raziuddin, Gonda M, *et al.* Negative regulation of human immune deficiency virus replication in monocytes. Distinctions between restricted and latent expression in cells. J Exp Med 1990, 171:1705.
- Miles SA, Balden E, Magpantay L, *et al.* Rapid serologic testing with immune-complex-dissociated HIV p24 antigen for early detection of HIV infection in neonates. New Engl J Med 1993, 328:297.
- Miniero R, Piga A, Luzzato L, *et al.* Vitamin E and β-thalassaemia. Haematologica 1983, 68:562.
- Ministerio de Salud y Acción Social. Programa Nacional de Lucha contra los retrovirus del humano y SIDA. Boletín sobre el SIDA en la República Argentina, 1995.
- Mofeson LM and the National Institute of Child Health and human development intravenous immunoglobulin study group. Intravenous immune globulin for the

prevention of bacterial infections in children with symptomatic immunodeficiency virus infection. New Engl J Med 1991, 325:73.

- Mohri h, Shingh MK, Ching WTW, *et al.* Quantitation of zidovudine-resistant human immunodeficiency virus type 1 in the blood of treated and untreated patients. Proc Natl Acad Sci USA 1993, 90:25.
- Moncada S. The L-arginine:nitric oxide pathway. Acta Physiol Scand 1992, 145:201.
- Monte M & Lustig ES. Radicales libres de oxígeno y las superóxido dismutasas: aspectos biológicos y clínicos. Medicina 1994, 54:61.
- Muller F, Rollag H, Froland SS. Reduced oxidative burst responses in monocytes macrophages from HIV- infected subjects. Clin Exp Immunol 1990, 82:10.
- Mülsch A. NO synthases: mechanism of activation, identity of NOx and expression in human cells. Res Immunol 1991, 142:561.
- Munker R, Gasson J, Ogawa M *et al.* Recombinant human tumor necrosis factor induces production of granulocyte-monocyte colony stimulating factor. Nature 1986, 323:79.
- Murray HW, Scavuzzo D, Jacobs JL, *et al.In vitro* and *in vivo* activation of human mononuclear phagocytes by interferon-γ. J Immunol 1987, 138:2457.
- Murray HW & Teitelbaum RF. L-arginine dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. J Inf Dis 1992, 165:513.
- Nájera I, Richman DD, Olivares I, *et al.* Natural occurence of drug resistance mutations in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 isolates. AIDS Res Hum Retrov 1994, 10:1475.
- Nájera I, Holguín A, Quiñones-Mateu M *et al.* The pol gene quasispecies of human immunodeficiency virus. Mutations associated with drug resistance in virus from patients undergoing no drug therapy. J Virol 1995, 69:23, (a).
- Nájera R, Nájera I, de Andrés R, *et al.* Epidemiología molecular del VIH. Pub Of SEISIDA 1995, 6:1, (b).

- Nathan CF, Murray HW, Cohn ZA. The macrophage as an effector cell. N Engl J Med 1980, 303:622.
- Nathan C & Xie Q. Regulation of the biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994, 269:13725.
- Nathan DG & Piomelli S. Oral iron chelators. Sem Hematol 1990, 27:83.
- Nauseef W. Mieloperoxidase deficiency. Hematol/Oncol Clin NA 1988, 2:135.
- Neri A, Brugiatelli M, Iacopino P, *et al.* Natural killer cell activity and T cell subpopulations in thalassemia major. Acta Haematol 1984, 71:263.
- Newell ML & Peckham CS. Risk factors for vertical transmission and early markers of HIV-1 infection in children. AIDS 1993, 7:S591.
- Newell ML & Peckham CS. Vertical transmission of HIV infection. Acta Pædiatr Suppl 1994, 400:43.
- Nichols BA & Bainton DF. Differentiation of human monocytes in bone marrow and blood: sequential formation of two granule populations. Lab Invest 1973, 29:27.
- Nicholson JK, Cross GD, Callaway CS, *et al. In vitro* infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV). J Immunol 1986, 137:323.
- Nielsen H, Kharazmi A, Faber V. Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome. Scand J Immunol 1986, 24:291.
- Nualart P, Estevez ME, Ballart IJ, *et al.* Effect of alpha interferon on the altered T-B cell immunoregulation in patients with thalassemia major. Am J Hematol 1987, 24:151.
- O'Brien PJ. Superoxide production. Meth Enzymol 1984, 105:370.
- Orenstein JM, Meltzer MS, Phipps T, *et al.* Cytoplasmic assembly and accumulation of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in recombinant human colony-stimulating factor-1-treated human monocytes: an ultrastructural study. J Virol 1988, 62:2578.
- Organización Mundial de la Salud. Wkly Epidem Rec 1995, 70:5.

- Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, *et al.* DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells . Science 1988, 239:295.
- Palacios MF, Testoni RA, Ballart IJ, *et al.* Disfunción quimiotáctica de los neutrófilos en pacientes talasémicos politransfundidos. Sangre 1993, 38:295.
- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, *et al.* Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88:9838.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. N Eng J Med 1993, 328:327.
- Pantaleo G & Fauci AS. Tracking HIV during disease progression. Curr Opin Immunol 1994, 6:600.
- Pardalos G, Kanakoudi-Tsakalidis F, Malaka-Zafiriu M, *et al.* Iron-related disturbances of cell-mediated immunity in multitransfused children with thalassaemia major. Clin Exp Immunol 1987, 68:138.
- Pedersen C, Lindhardt BO, Jensen BL, *et al.* Clinical course of primary HIV infection: Consequences for subsequent course of infection. Br J Med 1989, 299:154.
- Piatak M, Saag MS, Ynag LC, *et al.* High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. Science 1993, 259:1749.
- Pietraforte D, Tritarelli E, Testa U, *et al.* Gp120 HIV envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. J Leuk Biol 1994, 55:175.
- Pinching AJ, Jeffries DJ, Donaghy M, *et al.* Studies of cellular immunity in male homosexuals in London. Lancet 1983, 2:126.
- Pitt A, Mayorga LS, Schwartz AL, *et al.* Transport of phagosomal components to an endosomal compartment. J Biol Chem 1992, 267:126.
- Pittis MG, Sen L, Diez RA, *et al.* Study of phagolysosomal fusion of human monocytes by a cytomorphological method. Com Biol 1993, 11:55.
- Poli G, Bottazzi B, Acero R, *et al.* Monocyte function in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome and in patients with acquired immune deficiency syndrome: selective impairment of chemotaxis. Clin Exp Immunol 1985, 62:136.

- Polson R, Jenkins R, Lombard M, *et al.* Mechanisms of inhibition of mononuclear cell activation by the iron chelating agent desferrioxamine. Immunology 1990, 71:176.
- Pos O, Stevenhagen A, Meenhorst PL *et al.* Impaired phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by granulocytes and monocytes of AIDS patients. Clin Exp Immunol 1992, 88:23.
- Poste G & Allison A. Membrane fusion. Biochim Biophys Acta 1973, 300:421.
- Prada F, Pittis MG, Bologna R, *et al.* Actividad citotóxica natural killer en niños nacidos de madres infectadas con el HIV. XL Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Medicina 1995, 55:579.
- Prince AM, Reesnick H, Pascual D, *et al.* Prevention of HIV infection by passive immunization with HIV immunoglobulin. AIDS Res Hum Retrovirus 1991, 7:971.
- Rachmilewitz EA, Lubin BH, Shohet SB. Lipid membrane peroxidation in β-thalassemia major. Blood 1976, 47:495.
- Rand R. Mimicry and mechanism in phospholipid models of membrane fusion. Annu Rev Physiol 1986, 48:201.
- Redfield R, Wright D, Tramont E. The Walter Reed staging classification for HTLV-III/LAV infection. N Engl J Med 1986,314:131.
- Reif DW: Ferritin as a source of iron for oxidative damage. Free Rad Biol Med 1992, 12:417.
- Reiner NE. Altered cell signaling and mononuclear phagocyte deactivation during intracellular infection. Immunol Today 1994, 8:374.
- Rieckmann P, Poli G, Fox CH, *et al.* Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alfa production and Ig secretion in B lymphocytes from HIV-infected individuals but not seronegative donors. J Immunol 1991, 147:2922.
- Rodman TC, To SE, Hashish H, *et al.* Epitopes for natural antibodies of human immunodeficiency virus (HIV)-negative (normal) and HIV-positive sera are coincident with two key functional sequences of HIV Tat protein. Proc Natl Acad Sci 1993, 90:7719.

- Rogers MF, Ou C, Kilbourne B, *et al.* Advances and problems in the diagnosis of human immunodeficiency virus infection in infants. J Pediatr Infect Dis 1991, 10:523.
- Roilides E, Black Ch, reimer Ch, *et al.* Serum immunoglobulin G subclasses in childrens infected with human immunodeficiency virus type 1. J Pediatr Infect Dis 1991, 10:134, (a).
- Roilides E, Clerici M, DePalma L, *et al.* Helper T-cell responses in children infected with human immunodeficiency virus type 1. J Pediatr 1991, 118:724, (b).
- Roitt I. Essential Immunology, 7th edn, Blackwell Scientific Publications, 1991.
- Rosenberg ZF & Fauci AS. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection: Cytokine induction of HIV expression. Immunol Today 1990, 11:176.
- Rosenberg ZF & Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. En: Advances in host defense mechanisms, vol 8, (de. JI Gallin & AS Fauci), Raven Press, Nueva York, 1992.
- Ruben S, Perkins A, Purcell R, *et al.* Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. J Virol 1989,63:1.
- Safrit JT & Koup RA. The immunology of primary HIV infection: which immune responses control HIV replication? Curr Op Immunol 1995, 4:456.
- Salahuddin SZ, Rose RM , Groopman JE, *et al.* Human T lymphotropic virus type III infection of human alveolar macrophages. Blood 1986, 68:281.
- Sattentau OJ & Weiss RA. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. Cell 1988, 52:631.
- Sawyer JG, Martin NI, Hancock R. Interaction of macrophage cationic proteins with the outer membrane of *Pseudomona aeruginosa*. Infect Immun 1988, 56:693.
- Scarlatti G, Lombardi V, Plebani A, *et al.* Polymerase chain reaction virus isolation, and antigen assay in HIV-1 possitive mothers and their children. AIDS 1991, 5:1173.
- Scarlatti G, Albert J, Rossi P. Mother to child transmission of the HIV-1: correlation with neutralizing antibodies against primary isolates. J Inf Dis 1993, 168:207.
- Schmalzl F & Braunsteiner H. The cytochemistry of monocytes and macrophages. Ser Haemat 1970, 3:93.

- Schnitman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC, *et al.* The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that mantains expression of CD4. Science 1989, 245:305.
- Schreiber AD, Rossman MD, Levinson AI. The immunobiology of human Fc-γ receptors on hematopoietic cells and tissue macrophages. Clin Immunol Immunopathol 1992, 62:S66.
- Schrier RD, McCutchan JA, Venable JC, *et al.* T-cell-induced expression of human immunodeficiency virus in macrophages. J Virol 1990, 64:3280.
- Selden C, Owen M, Hopkins JMP, *et al.* Studies on the concentration and intracellular localization of iron proteins in liver biopsy specimens from patients with iron overload with special reference to their rate in disruption. Br J Haematol 1980, 44:593.
- Sen L, Goicoa MA, Nualart PJ, *et al.* Estudios inmunológicos en talasemia mayor. Medicina 1989, 49:131.
- Shalaby MR, Krowka JF, Gregory TJ, *et al.* The effects of human immunodeficiency virus recombinant envelope glycoprotein on immune cell functions *in vitro*. Cell Immunol 1987, 110:140.
- Shearer GM, Bernstein DC, Tung KS, *et al.* A model for the selective loss of major histocompatibility complex self-restricted T cell immune responses during the development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). J Immunol 1986, 137:2514.
- Shearer GM & Clerici M. Early T-helper cell defects in HIV infection. AIDS 1991, 5:245.
- Shioda T, Levy JA, Cheng-Mayer C. Macrophage and T cell-line tropism of HIV-1 are determined by specific regions of the envelope gp120 gene. Nature 1991, 34:167.
- Shuitemaker H, Kootstra NA, De Goede REY, *et al.* Monocytotropic human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. J Virol 1991, 65:356.
- Shuitemaker H. Macrophage-tropic HIV-1 variants: initiators of infection and AIDS pathogenesis? J Leuk Biol 1994, 56:218.

- Sieff CA. Hematopoietic growth factors. J Clin Invest 1987, 79:1549.
- Silverstein SC, Greenberg S, Di Virgilio F, *et al.* Phagocytosis. En: Fundamental Immunology, 2nd edn. (ed. WE Paul), Raven Press, Nueva York, 1989.
- Smith PD, Ohura K, Masur H, *et al.* Monocyte function in the acquired immune deficiency syndrome: defective chemotaxis. J Clin Invest 1984, 74:2121.
- Snyderman R & Pife MC. Chemoattractant receptors on phagocytic cells. Ann Rev Immunol 1984, 2:257.
- Sonza S, Kiernan RE, Maerz LA, *et al.* Accumulation of unintegrated circular viral DNA in monocytes and growth-arrested T cells following infection with HIV-1. J Leuk Biol 1994, 56:289.
- Spear GT, Ou CY, Kessler HA, *et al.* Analysis of lymphocytes, monocytes, and neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons for HIV DNA. J Inf Dis 1990, 162:1239.
- Speer CP, Gahr M, Schuf-Werner P, *et al.* Immunologic evaluation of children with homozygous beta thalassaemia treated with desferrioxamine. Acta Haematol 1990, 83:76.
- Spiegel H, Herbst H, Niedobitek G, *et al.* Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cell. Am J Pathol 1992, 140:15.
- Stamatoyannopoulos G. Human hemoglobin switching. Science 1991, 252:383.
- Stent G, Cameron PU, Crowe SM. Expression of CD11/CD18 and ICAM-1 on monocytes and lymphocytes of HIV-1 infected individuals. J Leuk Biol 1994, 56:304.
- Stewart SJ, Fujimoto J, Levy R. Human T lymphocytes and monocytes bear the same Leu-3(T4) antigen. J Immunol 1986, 136:3773.
- Subramanyam M, Gutheil WG, Bachovchin WW, *et al.* Mechanism of HIV-1 tat induced inhibition of antigen-specific T cell responsiveness. J Immunol 1993, 150:2544.
- Talle MA, Rao PE, Westberg E, *et al.* Patterns of antigenic expression of human monocytes as defined by monoclonal antibodies. Cell Immunol 1983, 78:83.

- Taylor L, Espinosa M, Iturbe R, *et al.* Evaluation of phagolysosome fusion in acridine orange stained macrophages infected with *Histoplasma capsulatum*. Clin Exp Immunol 1989, 75:466.
- Tersmette M, de Goede REY, Al BJM, *et al.* Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. J Virol 1988, 62:2026.
- Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, *et al.* Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. J Virol 1989, 63:2118.
- Testoni R, de Miani S, Peñalver J, *et al.* Alteración de la quimiotaxis de polimorfonucleares de pacientes con talasemia mayor. Medicina 1990, 50:474.
- Thorens B, Mermod JJ, Vassalli P. Phagocytosis and inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in macrophages through post transcriptional regulation. Cell 1987, 48:671.
- Tovo PA, de Martino M, Gabiano C, *et al.* Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. Lancet 1992, 339:1249.
- Van Asbeck BS, Verbrugh HA, Van Oost BA, *et al. Listeria monocytogenes* meningitis and decreased phagocytosis associated with iron overload. Br Med J 1982, 284:542.
- Van Asbeck B, Marx JJM, Struyvenberg A, *et al.* Effect of iron (III) in the presence of various ligands on the phagocytic capacity and metabolic activity of human polymorphonuclear leukocytes. J Immunol 1984, 132:851, (a).
- Van Asbeck BS, Marx JJM, Struyvenberg A, *et al.* Deferoxamine enhances phagocytic function of human polymorphonuclear leukocytes. Blood 1984, 63:714, (b).

- Viganó A, Principi N, Villa ML, *et al.* Immunologic characterization of children vertically infected with human immunodeficiency virus, with slow or rapid disease progression. J Pediatr 1995, 126:368.
- Viscidi RP, Mayur K, Lederman HM, *et al.* Inhibition of antigen-induced lymphocyte proliferation by Tat protein from HIV-1. Science 1989, 246:1606.
- Wahl SM, Allen JB, Gartner S, *et al.* HIV-1 and its envelope glycoprotein down-regulate chemotactic ligand receptors and chemotactic function of peripheral blood monocytes. J Immunol 1989, 142:3553, (a).
- Wahl LM, Corcoran ML, Pyle SW, *et al.* Human immunodeficiency virus glycoprotein (gp120) induction of monocyte arachidonic acid metabolites and interleukin 1. Proc Natl Acad Sci 1989, 86:621, (b).
- Ward PA, Warren JS, Johnson KJ. Oxygen radicals, inflammation and tissue injury. Free Rad Biol Med 1988, 5:403.
- Wasi P. Streptococcal infection leading to cardiac and renal involvement in thalassemia. Lancet 1971, 1:949.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, *et al.* Viral dynamics human immunodeficiency virus type 1 infection. Nature 1995, 373:117.
- Weinblen BJ, Lee KF, Cooper ER, *et al.* Early diagnosis of HIV infection in infants by detection of IgA antibodies. Lancet 1990, 335:988.
- Weis L, Haeffner-Cavaillon N, Laude M, *et al.* HIV infection is associated with the spontaneous production of interleukin-1 (IL-1) *in vivo* and with an abnormal release of IL-1 alfa *in vitro*. AIDS 1989, 3:695.
- Weiss G, Wachter H, Fuchs D. Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. Immunol Today 1995, 16:495.b
- Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, *et al.* Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:7089.
- Wilfert CM, Wilson C, Luzuriaga K, *et al.* Pathogenesis of pediatric human immunodeficiency virus type 1 infection. J Inf Dis 1994, 170:86.

- Xie Q & Nathan C. The high output nitric oxide pathway: role and regulation. J Leuk Biol 1994, 56:576.
- Yam LT, Li CY, Crosby WH. Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. Am J Clin Pathol 1971, 55:283.
- Yogi MJ, Joesten ME, Wallace J, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genomic sequences and distinct changes in CD8+ lymphocytes precede detectable levels of HIV-1 antibodies in high-risk homosexuals. J Inf Dis 1991, 164:183.
- Zauli G, Davis BR, Re MC, *et al.* Tat protein stimulates production of transforming growth factor-ß1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1 induced hematopoietic suppression. Blood 1992, 80:3036, (a).
- Zauli G, Re MC, Visani G, *et al.* Inhibitory effect of HIV envelope glycoproteins gp120 and gp160 on the *in vitro* growth of enriched (CD34+) hematopoietic progenitors cells. Arch Virol 1992, 122:271, (b).
- Zauli G, Furlini G, Re MC, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) tat-protein stimulates the production of interleukin-6 (IL-6) by peripheral blood monocytes. Microbiologica 1993, 16:115.