

Restauración de la inmunidad innata en pacientes con infección por VIH/SIDA después de inicio de terapia antirretroviral

Alejandro Afani S¹, Lorena Jiusán L¹, Pablo Raby A¹, Giovanni Sitia², Javier Puente P^{3a}, Cecilia Sepúlveda C¹, Dante Miranda W^{3a}, Roy Cabrera C⁴, Luca Guidotti², Paola Lanza^{5b}.

Innate immunity restoration in patients with HIV/AIDS infection associated with antiretroviral therapy

Background: Highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV/AIDS infection induces an important reduction of the viral load (VL) and an immune system reconstitution. CD4+ T lymphocyte count is the immunological measurement commonly used for the follow up of HIV/AIDS patients. **Aim:** To study prospectively the restoration of the innate immune system in patients with HIV/AIDS infection during their first year on HAART. **Patients and Methods:** 25 naive HIV/AIDS patients, from San José Hospital and University of Chile Clinical Hospital, Santiago, Chile, were studied between years 2002-2003. Every 4 months after HAART initiation, CD3+, CD4+, CD8+ T lymphocytes and CD16/56+ natural killer (NK) cells were quantified by flow cytometry. NK cell cytotoxicity was measured using radioactive chrome liberation (Cr51). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) were measured in peripheral blood mononuclear cells and viral load was determined using Amplicor HIV-1 from Roche Diagnostics Systems. **Results:** Thirteen of the 25 patients continued in the study. They were all males, average age 35 years old (23-50). At baseline average CD4+ count was 146 cells/ μ L (31-362) and average viral load was 82.000 copies/mL (4.000-290.000). A raise in CD3+, CD4+, CD8+, and CD16/56 cells was noted at months 9-12 of therapy. Viral load became undetectable in the same period. NK cell function was decreased at the beginning of the therapy (1-4 months), reaching its highest values at months 9-12. There was no significant change in IL-10. TNF- α increased in six patients during the study. **Conclusions:** In this group of patients, innate immunity was restored during HAART. These results should be confirmed in studies with a longer follow up period and also measuring cytokines such as MIP-1 α , MIP-1 β and RANTES (Rev Méd Chile 2006; 134: 689-96).

(Key words: Antiretroviral therapy, highly active; CD4-positive T-lymphocytes; HIV; immunity, natural)

Recibido el 12 de julio, 2005. Aceptado el 1 de diciembre, 2005.

Proyecto financiado por Concurso Extraordinario Departamento de Investigación y Desarrollo (DID), Universidad de Chile, 2001.

¹Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santiago, Chile. ²Instituto Científico San Raffaele, Milán, Italia. ³Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile. ⁴Hospital San José, Santiago, Chile. ⁵Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

^aBioquímico

^bBiólogo

Correspondencia a: Alejandro Afani S. Santos Dumont 999, 5° piso, sector E, Of. 517, Independencia. Fax: 7375916. E mail: aafani@vtr.net

La infección por VIH/SIDA es en la actualidad un problema de gran relevancia mundial. Las estimaciones del Programa Conjunto de Naciones Unidas para el VIH/SIDA (ONUSIDA), muestran que hasta fines de 2004, había en el mundo alrededor de 40 millones de personas viviendo con VIH/SIDA. Se calcula que, durante 2004, un total de 5 millones de personas adquirieron la infección a nivel mundial¹. En América Latina, se estiman actualmente 1,7 millones de personas viviendo con VIH/SIDA, incluidas las 240 mil que adquirieron la infección durante el año 2004. En Chile, hasta el 31 de diciembre de 2003, se habían notificado 6.060 enfermos y 6.514 personas VIH+ asintomáticas. Se estima que habría un total de 30 mil personas viviendo con VIH. La tasa nacional de incidencia acumulada de SIDA es de 43,7 por 100 mil habitantes, y las regiones con las tasas más elevadas son la Metropolitana de Santiago (70,5), la I de Tarapacá (57), la V de Valparaíso (56,6) y la II de Antofagasta (38,7)².

Es ya un hecho establecido que el VIH no sólo compromete la respuesta inmune específica; también la respuesta inmune innata se encuentra severamente alterada en los individuos infectados^{3,4}. Las células *natural killer* (NK), con marcadores de superficie CD16/56, son parte fundamental de la inmunidad innata, especialmente en la lisis de células tumorales y en infecciones virales. Se sabe que las células NK disminuyen funcionalmente, en forma precoz, en el curso de la infección por VIH, en tanto que la disminución cuantitativa es tardía⁵.

Otro factor importante a considerar en la infección por VIH, es la respuesta de linfocitos Th1 y Th2 (LT *helper* 1 y 2), que presentan un patrón diferente en la expresión de citoquinas. Los primeros liberan principalmente IL-2, IL-12, INF- γ y TNF- α , y se correlacionan con el estímulo de la inmunidad celular. Los linfocitos Th2 liberan IL-4, IL-10 e IL-13, entre otras, relacionándose con un aumento en la producción de anticuerpos. Al inicio de la infección por VIH, existe un predominio de la respuesta Th1 y, en la medida que la infección progresa, se ha evidenciado un cambio de Th1 a Th2, que se ha relacionado con una rápida progresión a SIDA⁶.

Las células NK son potentes productoras de moduladores solubles de la respuesta inmune (citoquinas y quimioquinas), además de su ya mencionada función citolítica. Dentro de las citoquinas más prominentes sintetizadas por estas células están INF- γ y TNF- α . Se ha reportado una supresión significativa de la

producción de estas citoquinas por parte de células NK en pacientes VIH+ con elevada carga viral (CV)^{7,8}.

La terapia antirretroviral (TAR) combinada ha demostrado ser eficaz en detener la evolución de la enfermedad, disminuir la morbimortalidad y mejorar la calidad de vida de los pacientes con infección por VIH. La TAR logra reducir la CV a niveles indetectables, y produce una elevación progresiva de la subpoblación de LT CD4+, lo que determina una mejoría tanto virológica como inmunológica. El recuento de LT CD4+ es el único parámetro inmunológico utilizado en la actualidad en el seguimiento clínico de pacientes con infección VIH/SIDA, sin embargo, se sabe que la TAR induce una restauración global del sistema inmune. La mayoría de los estudios han estado enfocados a la reconstitución de la inmunidad específica o adaptativa asociada a la TAR. Estos revelan mejoría de la inmunidad específica, evidenciada por aumento de los LT CD4+ y CD8+ (de memoria CD45RO+ y naive CD45RA+), y además por estudios con marcadores de activación celular y apoptosis, entre otros⁹⁻¹¹.

En relación a la restauración de la inmunidad innata asociada a la TAR, los estudios han demostrado que en aquellos pacientes que tienen una adecuada respuesta virológica al tratamiento, la actividad de sus células NK es comparable con la de sujetos sanos; y a su vez, en aquellos individuos en que no se logra la completa supresión de la replicación viral, la actividad citolítica de las NK está significativamente disminuida¹². Sin embargo, existe limitada información sobre la respuesta de la inmunidad innata a la TAR, y es por esto que nuestro objetivo es estudiar algunos parámetros de la reconstitución de la inmunidad innata asociada a ella.

PACIENTES Y MÉTODOS

Entre los años 2002 y 2003 se estudió a 25 pacientes con infección por VIH-1 confirmada en el Instituto de Salud Pública, en control médico en el Hospital San José (Servicio de Salud Metropolitana Norte, Región Metropolitana de Santiago). Se incluyó a pacientes mayores de 18 años con indicación de iniciar TAR, de acuerdo a las normas vigentes emitidas por el Ministerio de Salud de Chile en el año 2001¹³; y que no hubiesen recibido previamente tratamiento. Se excluyó a pacientes con recuentos de LT CD4+ menores a 50 células/ μ L y CV menor a 400 copias/mL, o con una

condición indicadora de SIDA considerada irrecuperable a corto plazo (6 meses). También se excluyó a pacientes con TBC activa en tratamiento, mujeres embarazadas y nodrizas. Todos los pacientes firmaron un formulario de consentimiento informado.

Los estudios de este trabajo se realizaron cada 4 meses desde el inicio de la TAR, y se extendieron hasta los 16 meses de éste. En cada evaluación se realizó un seguimiento clínico y de laboratorio que incluyó: 1) Inmunofenotipo por citometría de flujo para la determinación de LT CD3+, CD4+, CD8+ y células NK CD16/56+, según protocolo Simultest de citómetro Becton Dickinson, en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. 2) Determinación de CV, por técnica de Amplicor HIV-1 Monitor versión 1.5 de Roche Diagnostics Systems, disponible en el Laboratorio de Medicina Molecular del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (ambos laboratorios pertenecientes a la Sección de Inmunología de dicho hospital). 3) Ensayos de citotoxicidad de células NK utilizando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los pacientes como células efectoras y células K-562 marcadas con Cr51 como células blanco, determinando el porcentaje de lisis celular como porcentaje de lisis específica, en el Laboratorio de Inmunobioquímica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y

Farmacéuticas de la Universidad de Chile. 4) Cuantificación de TNF- α e IL-10 por PCR en PBMC, en el Instituto Científico San Raffaele, Milán, Italia.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a pruebas estadísticas de análisis de varianza, a través del test de Bartlett.

RESULTADOS

Sólo 13 pacientes continuaron en estudio, debido a dificultades en el seguimiento. Todos de sexo masculino, con un promedio de edad de 35 años (23 a 50 años). El promedio de LT CD4+ al inicio del estudio fue de 146 células/ μ L (31-362 células/ μ L), y la CV de 82.000 copias/mL (4.000-290.000 copias/mL). Según la clasificación del CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) de 1993¹⁴, al iniciar el estudio, dos pacientes se encontraban en etapa A2, cuatro en etapa A3, uno en etapa B2, cuatro en B3 y dos en etapa C3.

Del total de pacientes estudiados, 6 iniciaron tratamiento con dos inhibidores de transcriptasa reversa análogos de nucleósidos (ITRN) y un inhibidor de transcriptasa reversa no análogo de nucleósidos (ITRNN); 5 con tres ITRN, y 2 con dos ITRN y un inhibidor de proteasa (IP) (Tabla 1). Cabe destacar que técnicamente fue imposible

Tabla 1. Características basales de los 13 pacientes VIH+ incluidos en el estudio y su esquema de TAR

Paciente	Edad (años)	Etapa clínica (CDC '93) ¹⁴	Recuento CD4+ (cél./ μ L)	Carga viral (copias/mL)	TAR
1	25	A3	113	19.000	3 ITRN
2	40	A3	114	110.000	2 ITRN - 1 ITRNN
3	34	A2	362	6.200	2 ITRN - 1 IP
4	50	A2	224	58.000	2 ITRN - 1 ITRNN
5	33	B2	328	45.000	2 ITRN - 1 IP
6	33	B3	106	120.000	2 ITRN - 1 ITRNN
7	34	B3	96	ND	2 ITRN - 1 ITRNN
8	31	B3	102	ND	2 ITRN - 1 ITRNN
9	23	A3	152	120.000	3 ITRN
10	44	B3	91	4.000	3 ITRN
11	24	C3	44	290.000	2 ITRN - 1 ITRNN
12	47	A3	138	44.000	3 ITRN
13	36	C3	31	86.000	3 ITRN
Promedio	34,92 (23-50)		146,23	82.018,18	

TAR= terapia antirretroviral; ITRN= inhibidor transcriptasa reversa análogo de nucleósidos; ITRNN= inhibidor transcriptasa reversa no análogo de nucleósidos; IP= inhibidor proteasa; ND= dato no disponible.

que todos los pacientes incluidos al inicio del estudio comenzaran a recibir la TAR en el mismo momento. Por este motivo, al realizar las tomas de muestras, los pacientes estaban con un desfase en el tiempo desde el inicio de la terapia, lo que se tradujo en la necesidad de agrupar los datos en intervalos de meses para su análisis (1-4, 5-8 y 9-16 meses).

En los 13 pacientes estudiados, se observó en el período de 9 a 16 meses de terapia, un incremento de LT CD3+, CD4+, CD8+ y CD16/56+, no estadísticamente significativo ($p > 0,12$). En el mismo período de tiempo, de manera significativa, la CV se hizo indetectable en 100% de los pacientes (Figuras 1 y 2), en concordancia con la evolución clínica de los pacientes a lo largo del estudio.

La actividad citolítica de las células NK inicialmente disminuyó, de manera significativa, de los 1 a 4 meses de TAR ($p=0,01$). Luego de esto, se aprecia una recuperación progresiva que se man-

tuvo hasta el final del seguimiento, en 11 pacientes, llegando a sus niveles más altos a los 9 a 16 meses de terapia, alcanzando valores similares a los observados basalmente (Figura 3). Esta variación también fue estadísticamente significativa ($p=0,01$).

La IL-10 no mostró cambios significativos en todo el período de estudio. Los análisis de TNF- α evidenciaron un aumento en 6 pacientes (46%), desde el primer mes hasta el octavo desde el inicio del tratamiento (Figura 4).

DISCUSIÓN

En la infección por VIH la evolución de la enfermedad está relacionada con la capacidad del huésped de montar una respuesta inmune efectiva, capaz de controlar la replicación y diseminación viral. Existen evidencias que tanto una respuesta celular citotóxica específica mediada

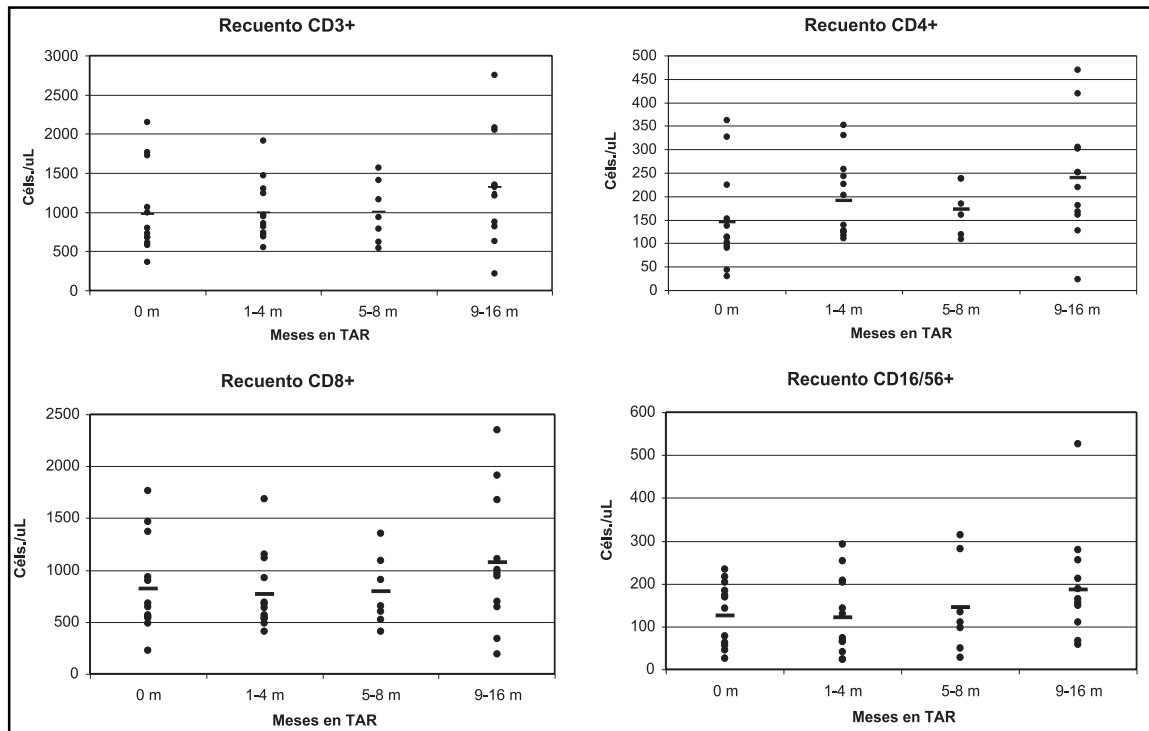


Figura 1. Evolución en el tiempo de los marcadores inmunofenotípicos (CD3, CD4, CD8, CD16/56) después de iniciada la TAR.

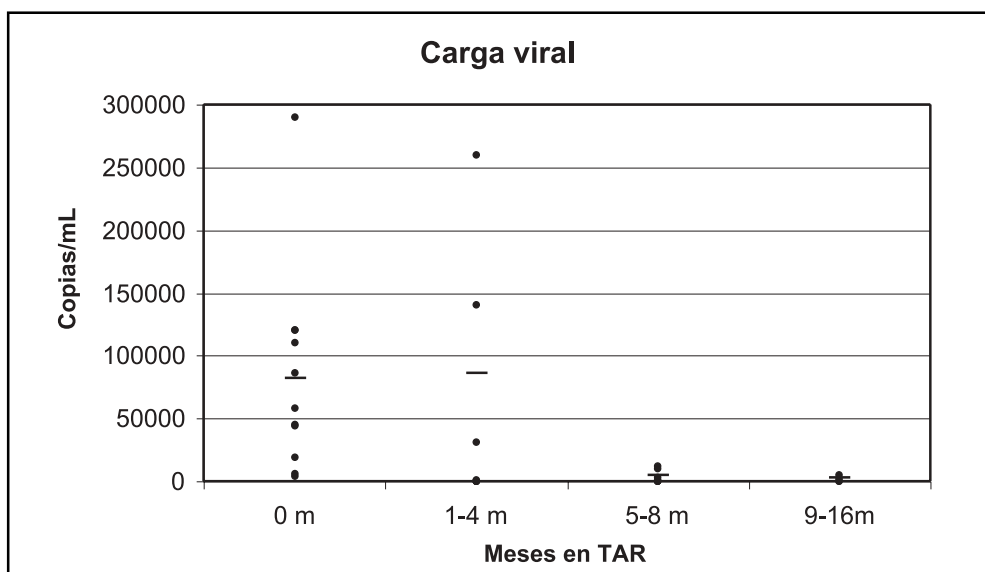


Figura 2. Evolución en el tiempo de la CV después de iniciada la TAR.

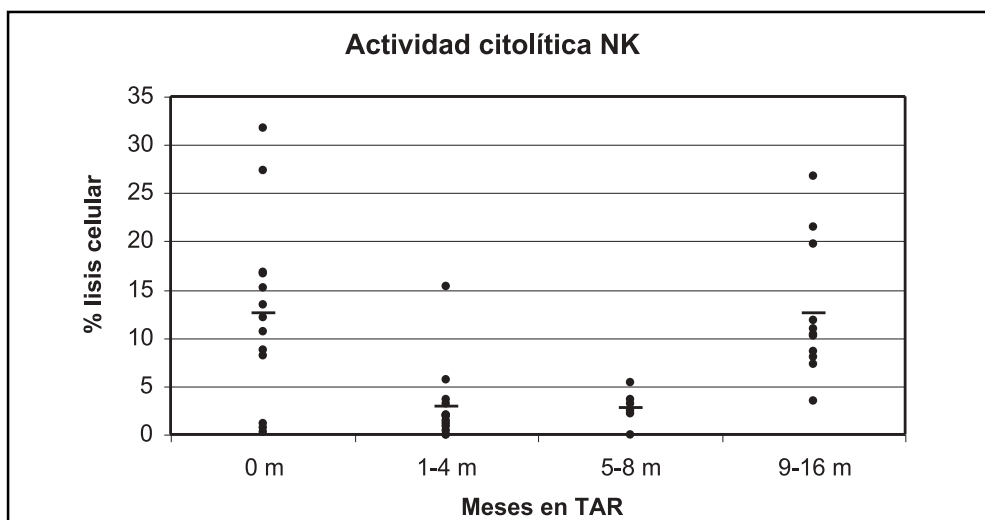


Figura 3. Evolución en el tiempo de la actividad citolítica de células NK después de iniciada la TAR.

por LT citotóxicos (CTL) como una respuesta T helper específica (mediada por LTh), tienen un valor pronóstico en el control del VIH¹⁵. Si bien el problema inmunológico más obvio finalmente es la pérdida gradual de LT CD4+, también existen

otras anomalías inmunológicas, muchas de ellas del sistema inmune innato, tales como: alteración de la respuesta quimiotáctica de monocitos, reducción de la capacidad de presentación antigénica de los macrófagos, alteración funcional

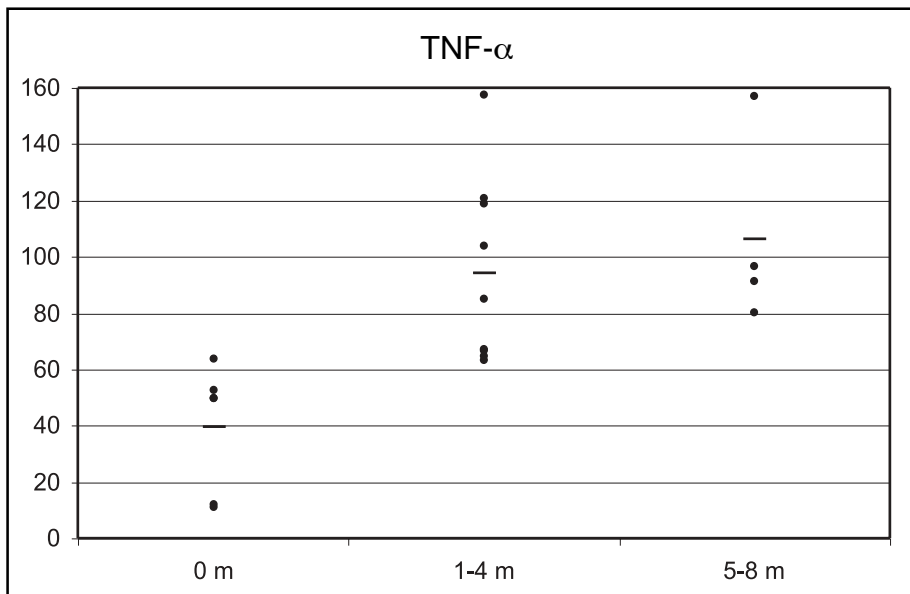


Figura 4. Evolución en el tiempo de TNF- α después de iniciada la TAR.

y cuantitativa de las células NK, y disminución cuantitativa de los granulocitos^{6,16}.

La actividad del sistema inmune innato ha adquirido un creciente interés como mecanismo defensivo contra una gran variedad de microorganismos patógenos, incluyendo al VIH^{17,18}. Esta respuesta defensiva no sólo precede a la respuesta del sistema inmune específico, sino que también la orienta al desarrollo de la respuesta inmune más adecuada según el patógeno involucrado^{19,20}. Dentro de los componentes celulares efectores del sistema inmune innato destacan las células NK, subpoblación de linfocitos identificable por su fenotipo en reposo (CD16/56+, CD3-) y por su función citotóxica antiviral y antitumoral²¹⁻²³. Las células NK secretan diversas citoquinas, especialmente IFN- γ y quimioquinas^{22,24} y desempeñan su rol de citotoxicidad ya sea en forma directa (citotoxicidad natural) o con la participación de anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*). La citotoxicidad natural corresponde a la citotoxicidad espontánea frente a una gran variedad de células blancas, especialmente tumorales o transformadas por virus, sin previa sensibilización; ocurre a través de receptores aún no totalmente caracterizados que incluyen tanto receptores de activación (CD2, CD44, CD69, CD28) como a receptores de inhibición de la

citotoxicidad, especialmente los denominados KIR (*killer inhibitory receptor*) que reconocen moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I)^{24,25}.

Ha sido bien establecido que en la respuesta inmune contra el VIH y otros virus, los LT y las células NK constituyen la principal estrategia defensiva, sin embargo, dado que la infección y en consecuencia la posterior disminución de los LT CD4+ ocurre en etapas precoces de la infección, el rol de las células NK es de vital importancia. Este tipo celular, en general, carece de receptores CD4, lo que las hace relativamente resistentes a la infección por el virus. Diversos autores han demostrado que la preservación de la actividad y número de estas células son factores asociados al pronóstico de individuos VIH+ con recuentos muy bajos de LT CD4+^{26,8}.

En nuestro estudio observamos que entre los pacientes no se evidenció un significativo aumento del recuento de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, lo que pudo estar influenciado por el corto período de seguimiento, sin embargo, la disminución de la CV a niveles indetectables traduce la buena respuesta virológica a la TAR.

Los ensayos de citotoxicidad evidenciaron una disminución inicial de la actividad citolítica de las

células NK; en este mismo período (1-4 meses) la CV no varió, lo que podría corresponder a un efecto inicial de la TAR. Además, la alta sensibilidad de estas células al estrés, que en este caso estaría dado por lo que significa iniciar una terapia por tiempo indefinido y con efectos secundarios, podría explicar esta disminución. La recuperación significativa de la citotoxicidad natural a partir de este período y hasta el final del estudio, sí se correlacionó con la caída de la CV a niveles indetectables, lo que refleja la efectividad de la TAR. Los datos obtenidos se correlacionan con lo descrito en la literatura; en este sentido, se ha visto que el número y la función de las células NK puede reconstituirse en pacientes bajo TAR, siempre que se haya logrado la completa supresión de la replicación viral (como fue el caso del 100% de los pacientes estudiados), indicando que la replicación del VIH es la responsable de la supresión de las células NK^{27,12,8}.

Pese a que IL-10, citoquina representativa de una respuesta Th2, no demostró cambios a lo largo del estudio, TNF- α evidenció un aumento significativo en 6 pacientes estudiados. Esto podría corresponder a un estímulo de la respuesta inmune celular, con predominio de la respuesta Th1.

Es interesante considerar a futuro el estudio de otras citoquinas, principalmente de aquellas producidas predominantemente por las células NK, como son MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES, ya que ha sido recientemente demostrado que la destrucción de las células del huésped infectadas por el virus no son el único mecanismo que tienen las células

NK de controlar la diseminación de la viremia⁸. Estas células también son capaces de suprimir la replicación del VIH en los LT CD4+, mediante la secreción de quimioquinas CC⁸.

Dentro de las limitaciones de nuestro trabajo, se encuentran el número reducido de pacientes y el período de seguimiento. En este sentido, observar la evolución de la actividad citolítica de las células NK es importante, ya que hasta el final del estudio se evidenció una recuperación de su caída inicial hasta llegar a niveles similares a los basales, sin embargo, en este mismo período sólo se observó una recuperación parcial del recuento de LT CD4+. Extender el seguimiento permitiría evaluar si esta tendencia al incremento de la actividad citolítica se mantiene y si el recuento de LT CD4+ se recupera a niveles normales. Este aumento de la actividad citolítica, en asociación a niveles de CV indetectables, traduciría la restauración de un importante constituyente de la inmunidad innata asociada a una TAR eficaz.

Este es el primer estudio realizado en Chile sobre la restauración de la inmunidad innata asociada a la TAR en pacientes con infección por VIH/SIDA. Considerando que las células NK representan uno de los componentes celulares de la inmunidad innata, los datos obtenidos permiten obtener una imagen parcial de su restauración posterior al inicio de esta terapia. Destacamos lo relevante de continuar estos estudios, considerando prolongar el período de seguimiento de los pacientes, dado que la mayoría de las investigaciones previas se han enfocado en la inmunidad específica.

REFERENCIAS

1. ONUSIDA. *Situación de la epidemia de SIDA*: Diciembre de 2004. 2005.
2. CONASIDA, Chile. *Caracterización epidemiológica del VIH/SIDA en Chile a diciembre de 2003*. Agosto 2004.
3. KATZ JD, MITSUYASU R, GOTTLIEB MS, LEBOW LT, BONAVIDA B. Mechanism of defective NK cell activity in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. II. Normal antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by effector cells defective in natural killer (NK) cytotoxicity. *J Immunol* 1987; 139: 55-60.
4. SCOTT-ALGARA D, VUILLIER F, CAYOTA A, DIGHERO G. Natural killer (NK) cell activity during HIV infection: a decrease in NK activity is observed at the clonal level and is not restored after *in vitro* long-term culture of NK cells. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 181-7.
5. SEPÚLVEDA C, PUENTE J, WEINSTEIN C, WOLF ME, MOSNAIM AD. Enhancement of natural killer cell activity in HIV-1-infected subjects by a mixture of

- the calcium ionophore A23187 and the phorbol ester TPA: lack of response to a similar challenge with interleukin-2 or alpha-interferon. *Am J Ther* 1997; 4: 413-21.
6. AFANI A. Immunopatogenia de la infección por VIH. En: Sepúlveda C, Afani A, eds. *SIDA*. 3ª edición, 2002.
 7. AZZONI L, PAPANAVAS E, CHEHIMI J, KOSTMAN JR, MOUNZER K, ONDERCIN J ET AL. Sustained impairment of IFN- γ Secretion in Suppressed HIV-Infected Patients Despite Mature NK Cell Recovery: Evidence for a Defective Reconstitution of Innate Immunity. *J Immunol* 2002; 168: 5764-70.
 8. JACOBS R, HEIKEN H, SCHMIDT RE. Mutual interference of HIV and natural killer cell-mediated immune response. *Mol Immunol* 2005; 42: 239-49.
 9. EMERY S, LANE HC. Immune reconstitution in HIV infection. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 568-72.
 10. NOTERMANS DW, PAKKER NG, HAMANN D, FOUORAINE NA, KAUFFMANN RH, MEENHORST PL ET AL. Immune reconstitution after 2 years of successful potent antiretroviral therapy in previously untreated human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *J Infect Dis* 1999; 180: 1050-6.
 11. SAAG MS. The impact of highly active antiretroviral therapy on HIV-specific immune function. *AIDS* 2001; 15: S4-10.
 12. WEBER K, MEYER D, GROSSE V, STOLL M, SCHMIDT RE, HEIKEN H. Reconstitution of NK cell activity in HIV-1 infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Immunobiology* 2000; 202: 172-8.
 13. CONASIDA, Chile. *Guía clínica para la atención de las personas adultas que viven con VIH/SIDA*. 2001.
 14. CDC. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* 1992; 41(RR-17): 1-19.
 15. NORRIS PJ, ROSENBERG ES. Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *AIDS* 2001; 15: S16-21.
 16. HOWIE S, RAMAGE R, HEWSON T. Innate immune system damage in human immunodeficiency virus type 1 infection. Implications for acquired immunity and vaccine design. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: S141-5.
 17. PUENTE J, BLANCO L, MONTOYA M, MIRANDA D, CONTRERAS I, VINÉS E ET AL. Effect of *Salmonella typhi* wild type and O-antigen mutants on human natural killer cell activity. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 355-64.
 18. BIRON CA, NGUYEN KB, PIEN GC, COUSSENS LP, SALAZAR-MATHER TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 189-220.
 19. TRINCHIERI G, SCOTT P. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. *Res Immunol* 1995; 146: 423-31.
 20. MOSSER DM. Receptor mediated subversion of macrophage cytokine production by intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 406-11.
 21. ROBERTSON MJ, RITZ J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76: 2421-38.
 22. VÉLY F, VIVIER É. Mécanismes moléculaires de la cytotoxicité des cellules NK. *Médecine/Sciences* 1996; 12: 458-64.
 23. LEIBSON PJ. Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer. *Immunity* 1997; 6: 655-61.
 24. PERITT D, ROBERTSON S, GRI G, SHOWE L, ASTE-AMEZAGA M, TRINCHIERI G. Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets. *J Immunol* 1998; 161:5821-4.
 25. LANIER LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-93.
 26. IRONSON G, BALBIN E, SOLOMON G, FAHEY J, KLIMAS N, SCHNEIDERMAN N ET AL. Relative preservation of natural killer cell cytotoxicity and number in healthy AIDS patients with low CD4 cell counts. *AIDS* 2001; 15: 2065-73.
 27. VILLANUEVA JL, CABALLERO J, DEL NOZAL M, SÁNCHEZ B, VICIANA P, ALARCÓN A ET AL. Peripheral blood natural killer cell reconstitution after highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14: 473-4.