

Estudio de poblaciones de linfocitos B en pacientes VIH– seropositivos

 18 min.



El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta a las células del sistema inmunitario, alterando o anulando su función con la consiguiente inmunodeficiencia. La caracterización de los linfocitos B en pacientes infectados es importante para entender el impacto de la viremia en la respuesta inmune. El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con serología positiva para VIH y la comparación de los valores encontrados con un grupo control. También se analizaron los patrones de electroforesis de proteínas a fin de determinar la existencia de alteraciones cualitativas. Este estudio tiene importantes implicancias para la susceptibilidad a co-infecciones extracelulares.



Castro Ocampo G(3,4),
Bustos A(2),
Carelli D(1),
Cañellas A(1),
Ramis E(1),
Amuchastegui R(2),
Arias D(1),
Kassuha D(4),
Larrea C(1,4)

1. Hospital Público Descentralizado Dr. Guillermo Rawson VIH Servicio de Hematología y Hemoterapia.
2. Hospital Público Descentralizado Dr. Guillermo Rawson -Servicio de Infectología.
3. Hospital Público Descentralizado Dr. Guillermo Rawson -Servicio de Laboratorio Central.
4. Universidad Católica de Cuyo. Facultad de Ciencias de la Alimentación, Bioquímicas y Farmacéuticas. Instituto de

Ciencias Químicas. gerardocastroocampo@gmail.com

HEMATOLOGÍA Volumen 19 Nº 1: 16–23, 2015
Fecha de recepción: 13/11/2014
Fecha de aprobación: 19/12/2014
HEMATOLOGÍA: 16 - 23
Volumen 19 nº 1 Enero-Abril 2015



Resumen

Introducción: La infección por VIH está asociada con anormalidades en las poblaciones linfocitarias, incluidos los linfocitos B. Estas perturbaciones llevan a un incremento de co-infecciones específicas y a una pobre respuesta a vacunas. La caracterización de los linfocitos B en pacientes infectados es importante para entender el impacto de la viremia en la respuesta inmune.

Objetivos: Caracterizar las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con serología positiva para VIH y correlacionar estos hallazgos con los patrones de electroforesis de proteínas encontrados.

Material y métodos: Se incluyeron 30 pacientes VIH – positivos adultos en diferentes estadios de progreso de la enfermedad bajo tratamiento antiretroviral. Las subpoblaciones de linfocitos B fueron inmunotipificadas por citometría de flujo como: CD24^{alto} CD38^{alto} (B transicionales), CD27⁻ (B vírgenes), CD27⁺ IgD⁻ (B memoria sin cambio de isotipo), CD27⁺ IgD⁺ (B memoria con cambio de isotipo) y CD27⁻ (B memoria totales). Se realizaron proteinogramas por electroforesis en analizador semiautomático

y se categorizaron los patrones encontrados como normal, hipogammaglobulinemia, hipergammaglobulinemia policlonal, bandas oligoclonales o banda monoclonal.

Resultados: Demostramos un desbalance del compartimiento de linfocitos B caracterizado principalmente por un incremento de células B transicionales y una disminución de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo. Encontramos correlación entre el recuento de linfocitos T CD4⁺ y el recuento de células B de memoria totales.

Discusión: Este estudio demuestra el desbalance del compartimiento de linfocitos B en pacientes adultos infectados por el virus VIH aún en pacientes bajo tratamiento antiretroviral. Esto tiene importantes implicancias para la susceptibilidad a co-infecciones extracelulares.

Palabras Claves: VIH; linfopenia; linfocitos B

Introducción

El progreso de la enfermedad causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), está asociado a perturbaciones en las poblaciones celulares del sistema inmune (1). La forma clásica de progresión de la enfermedad lleva a la destrucción de los nódulos linfáticos (NL) contribuyendo a la degeneración de los centros germinales y a la pérdida progresiva de linfocitos T CD4⁺ (2). Aunque esta célula sea la diana del VIH, también se observan una amplia gama de anormalidades en otras poblaciones celulares del sistema inmune y los compartimientos linfoides. Se han descrito disfunciones diversas del linfocito

En el marco de la infección por VIH caracterizadas por hipergammaglobulinemia, incremento de la activación policlonal, incremento de la expresión de marcadores de activación incluyendo CD70, CD71, CD80 y CD86, incremento de la diferenciación de la célula B a plasmoblastos, presencia de anomalías en la electroforesis de proteínas, incremento de la producción de autoanticuerpos y un aumento en la frecuencia de neoplasias del linfocito B (3,4). Estas disfunciones están dirigidas por una replicación continua del virus y los esfuerzos constantes del sistema inmune de limitar la infección y son considerados como unos de los mayores efectos deletéreos de la infección por VIH (5).

El presente trabajo tuvo como objetivo caracterizar las subpoblaciones de linfocitos B en pacientes con serología positiva para VIH y la comparación de los valores encontrados con un grupo control.

Además se analizaron los patrones de electroforesis de proteínas a fin de determinar la existencia de alteraciones cualitativas.

Material y métodos

Población de estudio

El estudio fue de tipo prospectivo, descriptivo de tipo transversal y se realizó entre junio de 2012 y diciembre de 2013. Se incluyeron 30 pacientes VIH – positivos de entre 25 y 60 años, bajo tratamiento antirretroviral. Se consideraron como pacientes VIH – positivo aquellos individuos que presentaron serología positiva para VIH por metodología ELISA y confirmada mediante Western Blot. Todos los pacientes fueron atendidos en el Servicio de Infectología del Hospital Público Dr. Guillermo Rawson, San Juan, Argentina. Se incluyeron en el estudio 15 personas adultas con serología negativa para VIH que fueron seleccionadas como controles. Para el

análisis de los patrones de electroforesis se incluyó como grupo control los resultados de 77 electroforesis de proteínas de sueros provenientes de pacientes ambulatorios que asistieron al Laboratorio Central del Hospital Dr. Guillermo Rawson durante el periodo de estudio.

La investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad Católica de Cuyo y el Comité de Docencia e Investigación del Hospital Público Dr. Guillermo Rawson.

Obtención de muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron en todos los casos por punción venosa y recolectaron en tubos Vacutainer®K EDTA para obtener sangre total y en tubos Vacutainer® SST para obtención de sueros. Las muestras de suero fueron congeladas a -70 °C hasta el momento de las determinaciones. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos antes de su inclusión.



Electroforesis Totalmente Automatizada

Gel de Agarosa

- Fácil Automatización
- Un gel en sólo 45 minutos: aproximadamente un resultado de análisis de seroproteínas por minuto.
- Cámara de Migración Seca con Temperatura controlada.
- Alta Eficacia en el control de la temperatura por Peltier.
- Cámara de migración única en su tipo, con 2 o 3 electrodos.
- Fácil interpretación de los resultados.
- Reporta lo que usted ve, combinando la inspección visual del gel y el gráfico.
- Minimiza las pruebas de inmunofijación innecesarias, Maximiza las pruebas de primera línea negativa utilizando el ESTÁNDAR DE ORO: Electroforesis en gel de agarosa.
- Portamuestras desechables.
- Sistema de electroforesis automatizado más pequeño en el mundo.

Para electroforesis de:

Seroproteínas; Lipoproteínas; Hemoglobinas; Proteínas Urinarias y SDS; Inmunofijación; Isoelectroenfoque de LCR y α 1- AT



Ideal para laboratorios pequeños y medianos



Av. Ing. Huergo 1437 P.B. "I" C1107APB - Buenos Aires Argentina Tel./Fax: +54 11 4300-9090

info@biodiagnostico.com.ar www.biodiagnostico.com.ar

Inmunomarcación de subpoblaciones linfocitarias

La población de linfocitos B total fue diferenciada según la expresión de CD19 (Cytognos) y subdividida de acuerdo a la expresión de CD24 (BD-Pharmingen), CD27 (BD-Pharmingen); CD38 (MiltenyiBiotec) e IgD (BD-Pharmingen). La población B fue caracterizada como CD24^{alto}CD38^{alto} (B transicionales), CD27⁻ (B vírgenes), CD27⁺IgD⁺ (B memoria sin cambio de isotipo), CD27⁺IgD⁻ (B memoria con cambio de isotipo) y CD27⁺ (B memoria totales). A fin de reconocer si los linfocitos B de memoria constituyen un marcador de progreso en el curso de la infección por VIH se correlacionaron los valores encontrados para dicha población con el recuento de linfocitos T CD4⁺. El recuento de linfocitos T CD4 fue obtenido por el análisis de la expresión de CD3 (PerCP Invitrogen) y CD4 (PE Invitrogen).

Las muestras fueron procesadas en citómetro de flujo FACSCalibur (BD). El análisis de los datos se realizó mediante el programa CellQuest Pro (BD). La calibración del citómetro de flujo se realizó con perlas CaliBrite usando el programa FACSCComp. La cantidad de cada una de las poblaciones celulares se expresó en porcentajes y valor absoluto, como cantidad de células por milímetro cúbico (mm³).

Recuento celular

Los valores absolutos de las poblaciones celulares fueron calculados a partir del valor diferencial de linfocitos y recuento total de leucocitos obtenido en analizador automático CellDyn[®] 1800.

Electroforesis de Proteínas

Se realizó la electroforesis de proteínas de todas las muestras de suero sobre gel de agarosa en analizador HYDRASYS LC. La migración se realizó de forma automática a una temperatura controlada de 20° C. Una vez finalizada la migración comenzó el proceso de secado a 50° C. Posteriormente, se realizó la tinción con colorante negro amido. La lectura final se realizó mediante escáner para su posterior análisis por el programa Phoresis 6.1.2.

Este sistema de migración permite separar 6 fracciones de proteínas; Albúmina, Alfa-1 globulinas, Alfa-2 globulinas, Beta-1 globulinas, Beta-2 globulinas y gamma globulinas. Los patrones de electroforesis se clasificaron como: normal, hipogammaglobulinemia, aumento policlonal, patente oligoclonal o banda monoclonal.

Análisis de resultados

Antes de aplicar el análisis estadístico se comprobó la existencia de valores atípicos mediante el test de Dixon. Se analizaron las posibles causas del desvío antes de la eliminación del dato. Previo a la comparación de los grupos se realizó la prueba F de Fisher a fin de la existencia de homogeneidad de varianzas. Para la evaluación de significancia se realizó la prueba t de Student para muestras independientes.

Se aplicó la prueba de Welch en los casos en que se asumió varianzas desiguales. La correlación entre variables se analizó utilizando la prueba de Spearman. El grado de significación estadística se estableció a partir de valores de $p < 0,05$. El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa MedCalc.

Resultados

Para el análisis estadístico de los datos se analizaron los valores porcentuales de las poblaciones linfocitarias estudiadas, excepto para el caso de linfocitos totales y linfocitos B totales (CD19⁺). La media de los valores absolutos y porcentuales de las diferentes poblaciones de linfocitos (excluyendo valores atípicos) está representada en la Tabla N° 1 y 2.



Tabla N° 1: Comparación de valores porcentuales de poblaciones linfocitarias

Valores porcentuales	HIV - Seropositivos		Controles		p-valor
	Media	IC 95%	Media	IC 95%	
B totales	7,95	6,10 - 9,79	13,53	11,23 - 15,82	<0,05
B transicionales	4,92	3,33 - 6,52	1,21	0,75 - 1,69	<0,05
B vírgenes	57,46	49,91 - 65,00	60,23	51,97 - 68,49	0,63
B memoria sin cambio de isotipo	4,62	3,46 - 5,79	7,25	5,05 - 9,44	<0,05
B memoria con cambio de isotipo	19,32	15,71 - 22,94	18,27	15,49 - 21,06	0,63
B memoria totales	23,43	19,17 - 27,68	26,81	22,47 - 31,15	0,32



Tabla N° 2: Comparación de valores absolutos de poblaciones linfocitarias

Valores absolutos	HIV - Seropositivos		Controles		p-valor
	Media	IC 95%	Media	IC 95%	
B totales	125,01	84,34 - 165,68	433,92	345,42 - 522,43	<0,05
B transicionales	3,35	1,74 - 4,96	2,20	1,35 - 3,06	0,3394
B vírgenes	71,41	43,09 - 99,72	269,30	196,08 - 342,53	<0,05
B memoria sin cambio de isotipo	8,98	5,27 - 12,69	19,46	14,51 - 24,43	<0,05
B memoria con cambio de isotipo	24,77	16,56 - 32,99	97,63	70,96 - 124,29	<0,05
B memoria totales	33,07	22,56 - 43,58	202,76	145,83 - 259,70	<0,05
Linfocitos totales	1724,03	1385,42 - 2062,65	3215,38	2806,15 - 3824,61	<0,05
Linfocitos T CD4	229,72	169,27 - 290,18	1286,25	1116,03 - 1456,47	<0,05

Linfopenia asociada a VIH

Para analizar la existencia de linfopenia se evaluaron los valores absolutos de linfocitos totales obtenidos por recuento en analizador automático y de linfocitos B CD19⁺ obtenido por citometría de flujo.

En ambos casos se encontró una reducción estadísticamente significativa de estas poblaciones celulares en los pacientes VIH seropositivos, ($p < 0,05$).

Este hallazgo se encuentra representado en la Figura n° 1.

La más amplia gama de Analizadores de Electrolitos



- Expandibles hasta 5 electrolitos simultáneos en cualquier combinación



- Lector de código de barras y teclado externo (opcionales)
- Conexión al LIS
- Software de control de calidad incorporado
- El menor costo operativo del mercado

Diestro® 103/103+/103A/103A+



Diseñados y producidos
en Argentina

Comercializados
en todo el mundo



Desde equipos
semiautomáticos
para pocas muestras
diarias, hasta
automáticos de alta
gama y prestación
para una gran
carga de trabajo



DIESTRO 103 AP



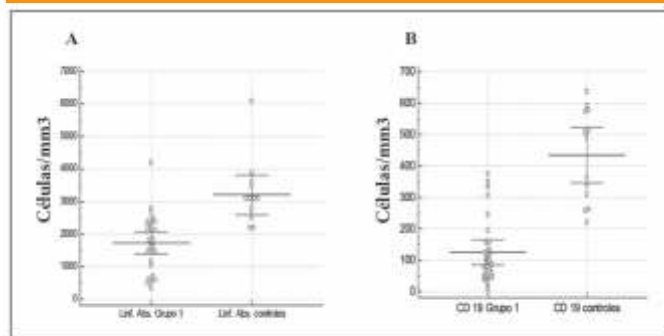


Figura n° 1: Valores absolutos de linfocitos totales y linfocitos B totales. Media e intervalo de confianza del recuento de linfocitos totales (A) y de linfocitos B totales (CD19+) (B) de pacientes VIH-seropositivos y el grupo control expresados como cmoa células/mm3. En ambos casos se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Expansión de células B transicionales en Pacientes VIH-seropositivos

Para analizar la existencia de cambios en el recuento de linfocitos B transicionales ($CD24^{alto}CD38^{alto}$) se analizaron los valores relativos encontrados. Se observó un aumento significativo en los valores porcentuales de linfocitos B transicionales ($p < 0,05$) como se muestra en la Figura n° 2. Los valores absolutos de linfocitos B transicionales no presentaron diferencias significativas.

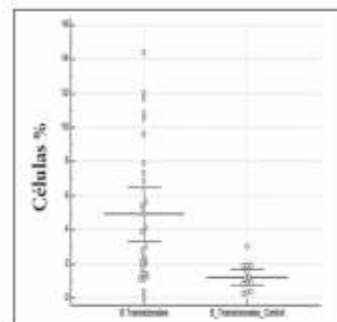


Figura n° 2: Valores porcentuales de linfocitos B transicionales. Media e intervalo de confianza del recuento de linfocitos B transicionales ($CD24+CD38+$) de pacientes VIH-seropositivos y el grupo control expresado como porcentaje de células (%). Se obtuvo un aumento estadísticamente significativo del valor porcentual de linfocitos B transicionales en pacientes VIH-seropositivos ($p < 0,05$).

Disminución de linfocitos B de memoria en Pacientes VIH-seropositivos

Se analizaron los valores porcentuales de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo ($CD27^{+}IgD^{+}$), linfocitos B de memoria con cambio de isotipo ($CD27^{+}IgD^{-}$) y los linfocitos B de memoria totales ($CD27^{+}$). Se observó una disminución estadísticamente significativa para los linfocitos B $CD27^{+}IgD^{-}$ ($p < 0,05$). Figura n° 3.

Los valores absolutos de estas poblaciones se encontraron en todos los casos disminuidos.

En relación a la correlación entre el número absoluto de linfocitos T $CD4^{+}$ y el recuento de linfocitos B de memoria totales ($CD27^{+}$), se observó una correlación moderada, $r = 0,55$; $p < 0,005$. Figura 4.

Al realizar la electroforesis de proteínas se encontró mayor

frecuencia de alteraciones cualitativas en pacientes HIV-seropositivos con respecto al grupo control. Los patrones encontrados se detallan en la Tabla 3.

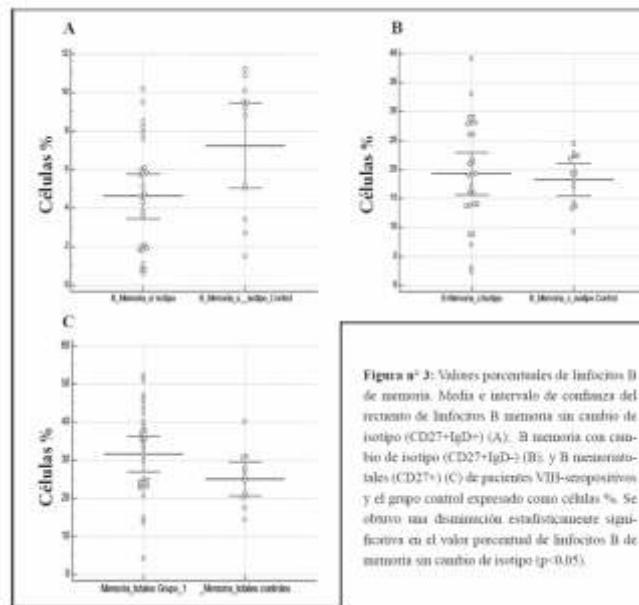


Figura n° 3: Valores porcentuales de linfocitos B de memoria. Media e intervalo de confianza del recuento de linfocitos B memoria sin cambio de isotipo ($CD27^{+}IgD^{+}$) (A), B memoria con cambio de isotipo ($CD27^{+}IgD^{-}$) (B) y B memoria totales ($CD27^{+}$) (C) de pacientes VIH-seropositivos y el grupo control expresado como células %. Se obtuvo una disminución estadísticamente significativa en el valor porcentual de linfocitos B de memoria sin cambio de isotipo ($p < 0,05$).

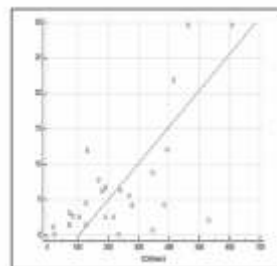


Figura n° 4: Correlación entre los valores absolutos de linfocitos T $CD4^{+}$ y valores absolutos de linfocitos B de memoria totales ($CD27^{+}$). Correlación de Spearman para valores absolutos de linfocitos T $CD4^{+}$ y valores absolutos de linfocitos B de memoria totales. Se obtuvo una correlación moderada entre las variables ($r = 0,55$; $p < 0,005$).



Tabla 3: Interpretación de patrones de electroforesis

Patrones de Electroforesis	Grupo 1		Grupo control	
	Cantidad	Porcentaje (%)	Cantidad	Porcentaje (%)
Normal	23/28	82,1	71/77	92,2
Hipogamutaglobulinemia	1/28	3,6	2/77	2,6
Aumento polifonal	2/28	7,1	3/77	3,9
Patente oligoclonal	3/28	10,7	2/77	2,6
Banda monoclonal	0/28	0,0	1/77	1,3

Discusión

En este estudio de corte transversal, se observa que los pacientes adultos VIH seropositivos presentan una reducción significativa del número total de células B asociado a linfopenia. Estudios previos han demostrado que la proteína gp120 activa la apoptosis de las células B, lo que podría explicar el mecanismo por el cual se produce la disminución del número total de estas células,

aunque el mecanismo puede verse atenuado si se reduce la viremia como resultado de la terapia antirretroviral (6).

Asimismo, la evaluación de los linfocitos B de memoria identificados por el marcador de superficie CD27, es importante ya que determina la capacidad del sistema inmune en producir anticuerpos funcionales. Esto es de particular interés debido a que la pérdida de linfocitos B CD27⁺ es considerado un factor responsable de una inmunidad humoral dañada y una pobre respuesta a vacunas en pacientes infectados (7). En el presente trabajo se observó una reducción significativa en los valores porcentuales de linfocitos B memoria sin cambio de isotipo aunque no se observaron diferencias en linfocitos B de memoria con cambio de isotipo y linfocitos B memoria totales. El análisis de los valores absolutos (datos no mostrados) de ambas poblaciones presenta una reducción significativa. Sin embargo, la linfopenia asociada en los pacientes VIH-

seropositivos influye directamente en el cálculo de los valores absolutos por lo cual el dato es limitado. Los linfocitos CD27⁺IgD⁺ son importantes en la respuesta inmune independiente del linfocito T y secretan IgM de alta afinidad en las fases tempranas de infección para inhibir la replicación microbiana en sangre. En este sentido resulta evidente que este grupo de pacientes carece de respuesta humoral efectiva a corto plazo y que el puente entre la respuesta inmune innata y adaptativa se encuentra dañado.

Estudios previos han demostrado que la terapia antirretroviral es capaz de normalizar no solo el recuento de linfocitos B sino también de producir un aumento relativo de los valores de linfocitos B de memoria luego de 12 meses de tratamiento si la terapia comienza en etapas tempranas de la infección. Sin embargo, estos resultados son controvertidos ya que varios estudios recientes indican que la restauración de la respuesta de memoria B por la terapia

antirretroviral está ausente o incompleta (5,8,9). En nuestro caso, para demostrar si existió una modificación parcial del compartimiento de linfocitos B de memoria o una restauración incompleta del mismo por la terapia antirretroviral, se requeriría un estudio posterior de tipo longitudinal que permita seguir el recuento de las poblaciones B en un tiempo determinado. Además, encontramos que el recuento de los linfocitos B de memoria se correlaciona con el recuento de linfocitos T CD4⁺. Se ha visto previamente que la pérdida del compartimiento B de memoria es un evento progresivo que ocurre en el curso de la infección por VIH manifestándose significativamente en estadios crónicos. Así, el número de linfocitos B de memoria circulante es un marcador de progresión de la infección por VIH y su medición puede ser útil para predecir la susceptibilidad de pacientes VIH seropositivos a infecciones bacterianas (11).

Se encontró un incremento



ILLUMINA lanza el nuevo equipo de Secuenciación de Nueva Generación NextSeq 500.

Sistema integrado (on-instrument) para generación automática de clusters de ADN por amplificación en puente, secuenciación y análisis primario y secundario de los datos.

- Capacidad de generación de datos actual de 120 Gb en modo High Output y 40 Gb en MidOutput.
- Secuenciación de un genoma humano (2 x 150 pb) en 30 horas y 1 exoma (2 x 75 pb) en 18 horas.
- Lecturas paired-end con calidad esperada de Q30 (1 error cada 1000 bases) para más del 75% de las bases leídas durante la secuenciación de fragmentos de 150 pb.
- Servidor para almacenamiento de datos provisto por Illumina (BaseSpace).



www.biosystems.com.ar

significativo de los valores porcentuales de linfocitos B transicionales (CD24^{alto}CD38^{alto}) en pacientes VIH-seropositivos. Se ha observado que esta expansión puede estar relacionada a la pérdida de linfocitos CD4⁺ y no a la viremia por VIH de forma directa. La linfopenia asociada a la infección por VIH activa mecanismos de compensación homeostática en donde la interleuquina -7 (IL-7) tiene un rol protagónico en particular en la recuperación del compartimiento de linfocitos T. Sin embargo, los niveles de IL-7 se correlacionan con el recuento de linfocitos B transicionales lo que hace pensar que la IL-7 actúa de forma directa sobre precursores de linfocitos B en médula ósea que expresan el receptor específico para IL-7, CD127 (2). Por otro lado, el análisis de los patrones derivados de la electroforesis de proteínas en el grupo de pacientes VIH seropositivos mostró un 82% de las patentes observadas como normales, un 11% de patrones oligoclonales y no se detectó ningún caso de banda monoclonal. La frecuencia de patentes oligoclonales y monoclonales en pacientes VIH-seropositivos observada en este trabajo se encuentra en concordancia con lo observado en diferentes estudios efectuados recientemente, que revelan una reducción de patentes oligoclonales en pacientes infectados por el virus en comparación a las observadas en años anteriores. Esta reducción de anomalías en los patrones electroforéticos se ha visto de forma marcada en los últimos años quizás en parte gracias a la mayor efectividad de las terapias antirretrovirales (4).

Este estudio demuestra el desbalance del compartimiento de linfocitos B en adultos infectados por el virus VIH aún en pacientes bajo tratamiento antirretroviral. La determinación de los linfocitos B de memoria podría tener utilidad clínica para evidenciar la susceptibilidad de los pacientes VIH -seropositivos a co-infecciones extracelulares.

Declaración de conflictos de interés:

Los autores declaran que no poseer conflictos de interés.



Bibliografía

1. Moir S, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of B-lymphocyte dysfunction in HIV disease. *J Allergy Clin Immunol*. 2008; 122(1):12-21.
2. Malaspina A., Moir S., Ho J. y cols. Appearance of immature_transitional B cells in HIV-infected individuals with advanced disease: Correlation with increased IL-7. *Blood*. 2006; 103(7): 2262-67.
3. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(4): 234-45.
4. Konstantinopoulos P., Dezube B., Pantanowitz L. y cols. Protein Electrophoresis and Immunoglobulin Analysis in HIV-Infected Patients. *Am J Clin Pathol* 2007; 128: 596-603.
5. Titanji K., De Milito A., Cagigi A. y cols. Loss of memory B cells impairs maintenance of long-term serologic memory during HIV-1 infection. *Blood*. 2006; 108: 1580-1587.
6. Longwe H., Gordon S., Malamba R. y cols. Characterising B cell numbers and memory B cells in HIV infected and uninfected Malawian adults. *BMC Infectious Diseases*. 2010; 10:280-286.
7. Hart M., Steel A., Clark SA. y cols. Loss of discrete memory B cell subsets is associated with impaired immunization responses in HIV-1 infection and may be a risk factor for invasive pneumococcal disease. *J Immunol*. 2007; 178(12): 8212-8220.
8. Moir S., Buckner C., Ho j. y cols. B cells in early and chronic HIV infection: evidence for preservation of immune function associated with early initiation of antirretroviral therapy. *Blood*. 2010; 116(25): 5571–5579.
9. Malaspina A., Follmann D., Orsega SM. Y cols. Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals. *J Infect Dis*. 2005; 191(9): 1442-14450.
10. D'Orsogna LJ., Krueger RG., McKinnon EJ. Y cols. Circulating memory B cell subpopulations are affected differently by HIV infection and antirretroviral therapy. *AIDS*. 2007; 21(13): 1747-1752.