

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE LINFOCITOS B REGULATORIOS Y EXPRESIÓN DEL LIGANDO DE MUERTE PROGRAMADA 1 EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Spada, Antonella¹

Fernández, Adriana¹

Peano, Natalia²

Gatti, Gerardo²

Acosta Rodríguez, Eva Virginia³

¹Servicio de Laboratorio- Nuevo Hospital San Antonio de Padua- Río Cuarto- Córdoba- Argentina.

²Laboratorio Bioquímico de Alta Complejidad- Fundación para el Progreso de la Medicina- Córdoba- Argentina.

³Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI)- Facultad de Ciencias Químicas- Universidad Nacional de Córdoba- Córdoba- Argentina

Correspondencia: Spada, Antonella. Servicio de Laboratorio. Nuevo Hospital San Antonio de Padua Río Cuarto. Guardias Nacionales 1027 (CP 5800). Río Cuarto. Córdoba. Tel.: 0358-4678728- antospada87@hotmail.com

Aprobado para su publicación: 26/4/18

RESUMEN

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) continúa siendo un importante problema de salud mundial. Los pacientes infectados experimentan una depleción progresiva y disfunción de linfocitos T CD4+ (LiTCD4+). Por otro lado, existe un compromiso inmune asociado a la disfunción de los linfocitos B (LiB). Dentro de esta población existe una subpoblación conocida como linfocitos B regulatorios (LiBreg) que ejercen una función inmunorreguladora a través de la producción de interleuquinas (IL), principalmente IL-10, y también a través de la expresión de ligando de molécula de muerte programada 1 (PD-L1). En el presente estudio se evaluaron los niveles de LiBreg y la expresión del marcador PD-L1 a través de citometría de flujo en muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de VIH vírgenes de tratamiento y de un grupo control no infectado. Se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se evaluó el porcentaje de los LiBreg ($p=0,005$) y la expresión de PD-L1 ($p=0,015$) en los LiB entre los grupos estudiados (pacientes y controles). En los pacientes infectados se observó una tendencia marcada, aunque no estadísticamente significativa ($p=0,07$) entre los niveles de LiBreg y la carga viral (CV), mientras que no se observó correlación entre CD4+ y LiBreg ($p=0,44$). Se puede concluir que los pacientes en estudio presentaron un porcentaje de LiBreg y una expresión de PD-L1 mayor que el grupo control. Estos resultados sugieren que la infección por el VIH induce mecanismos regulatorios mediados por LiB que podrían jugar un papel importante en la inmunopatogenia de la infección viral.

Palabras clave: VIH, Linfocitos B regulatorios, LiTCD4+, PD-L1.

Abreviaturas:

VIH: Virus Inmunodeficiencia Humana

LiBreg: Linfocitos B regulatorios

PD-L1: Ligando de molécula de muerte programada 1

CV: carga viral

LiTCD4+: Linfocitos T CD4+

TARV: Tratamiento antirretroviral

INTRODUCCION

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) sigue siendo un importante problema de salud mundial (1) y el diagnóstico tardío es aún un gran inconveniente ya que un número importante de pacientes muestran un marcado deterioro de su sistema inmune en el momento del diagnóstico (2). En el paciente infectado se produce una hiperactivación del sistema inmune que incluye desregulación, disfunción inmune y una inflamación crónica. La activación inmune crónica incluye la activación aberrante del sistema inmune adaptativo que compromete tanto a los linfocitos T (LiT) (3,4) como a los linfocitos B (LiB) (5). Estos últimos pueden ejercer efectos directos (6,7,8) e indirectos sobre la viremia, pero además participan en la modulación de la respuesta de los LiT efectores. Esta población conocida como linfocitos B regulatorios (LiBreg) está siendo exhaustivamente estudiada ya que se ha convertido en el "blanco" del estudio de patologías autoinmunes, enfermedades infecciosas y cáncer. Como ha sido revisado recientemente por Rincón-Arévalo y col. la función reguladora de estos LiB se ha adjudicado principalmente a la capacidad de producir interleuquina 10 (IL-10), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) e IL-35 que inducen la diferenciación de LiTCD4⁺ a un perfil Linfocitos Tregulador (LiTreg) e inhiben la diferenciación a perfiles proinflamatorios Th1 y Th17. Por otra parte, los LiBreg ejercen su función mediante el contacto célula-célula a través de moléculas como CD40, MHC-II, CD80, CD86, y la expresión de ligando de muerte programada 1 (PD-L1)(9).

La fenotipificación de los LiBreg continúa siendo controversial ya que no es posible asignar la función regulatoria a un único fenotipo y aún no ha sido identificado el factor de transcripción de LiBreg análogo a Foxp3 en LiTreg. Liu y col. encontraron que LiB productores de IL-10 de individuos infectados por VIH presentan mayor expresión de TIM-1 (10). Se ha reportado en pacientes sanos y con artritis reumatoidea la existencia de LiBreg con fenotipo CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}CD1 (11). También se han identificado LiBreg humanos con un fenotipo similar a células B10 murinas que presentan CD24^{hi}CD27⁺ (12). La revisión de Rincon-Arévalo y col. sugiere que se pueden identificar 3 clases de LiBreg en humanos: CD19⁺CD25⁺, CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} y CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺(13).

En cuanto a la función de los LiBreg, evidencias preliminares recopiladas a partir de diferentes modelos murinos de enfermedades autoinmunes sugirieron la existencia de LiB con un fenotipo regulador protector (14-17), así como también en diversas infecciones (18). Con respecto al rol de los LiBreg en la infección por VIH, Liu y col. han reportado recientemente que los LiB productores de IL-10 están elevados en pacientes con infección reciente y crónica por VIH y que éstos tienen la capacidad de suprimir la respuesta de los LiT *in vitro*. En su estudio también demuestra que existe una correlación positiva entre la frecuencia de LiB productores de IL-10 y la carga viral (CV) del paciente infectado y una correlación inversa con la proliferación de LiT específicos para VIH en etapas tempranas de

la infección, contribuyendo a la replicación viral, favoreciendo el establecimiento de la infección crónica y la progresión de la enfermedad. Recientemente, se ha demostrado el rol de los LiBreg en la infección de VIH asociado a la disfunción del sistema inmune vía IL-10 y la expresión de PD-L1. Estos autores sugieren que mecanismos sinérgicos de la IL-10 y PD-L1 de los LiBreg activados contribuyen a la atenuación de la función de los LiT citotóxicos y sugiere que existe una correlación positiva entre los niveles de los LiBreg y la activación crónica inmune que conduce al agotamiento de los LiT y a la progresión de la enfermedad (19,20).

PD-1 es una molécula de coestimulación que da una señal inhibitoria, es un importante regulador negativo de la activación de los LiT y participa en el mantenimiento de la tolerancia periférica inmunológica a los antígenos propios (21). Se ha observado que la expresión del PD-1 en los LiT específicos para el VIH es alta. El mismo fenómeno fue reportado en células específicas para los virus de la hepatitis B y C (22,23). Por lo que el descubrimiento de estas vías de regulación negativa en la activación de los LiT abre nuevas perspectivas en la aplicación clínica, mediante el uso de antagonistas de la vía PD-1/PD-L1 en donde se ha observado la restauración de la respuesta citotóxica mediada por los LiT CD8+ y una mayor capacidad para controlar la replicación viral (24).

El objetivo de este trabajo es evaluar los niveles de LiBreg y la expresión de PD-L1 en sangre periférica de pacientes infectados vírgenes de tratamiento en comparación con un grupo control no infectado, y analizar la correlación de estos parámetros con la CV y el recuento de LiT CD4+ en los pacientes infectados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio. Estudio prospectivo, observacional, que se realizó durante el período comprendido entre el 1º de septiembre de 2016 y el 29 de febrero de 2018 en el Servicio de Laboratorio del Nuevo Hospital San Antonio de Padua Rio Cuarto (NHSAP).

Muestras: Criterios de inclusión y exclusión. Se estudiaron pacientes mayores de 18 años con infección por VIH vírgenes de tratamiento, que fueron diagnosticados en el Servicio de Laboratorio del Nuevo Hospital San Antonio de Padua y que aceptaron participar de esta investigación mediante la firma del consentimiento informado. Como grupo control, se incluyeron individuos con serología negativa para VIH, que manifestaron no haber tenido situaciones de riesgo de contagio en los últimos tres meses y no padecer ninguna enfermedad infecciosa ni autoinmune. Los criterios de exclusión fueron: pacientes menores de 18 años y pacientes con diabetes, patologías autoinmunes, neoplasias, patologías infecciosas agudas o crónicas y embarazadas.

La toma de muestra se realizó en el momento en el cual el paciente concurrió al servicio de laboratorio para la confirmación de su diagnóstico presuntivo (un test positivo para VIH). A cada paciente se le extrajo 20 ml de sangre mediante punción venosa; 5 ml para la determinación de CV, 3 ml para la determinación de subpoblación linfocitaria y 3 ml para las diferentes marcaciones de superficie para la investigación, destinando el volumen restante para otras determinaciones de laboratorio solicitadas.

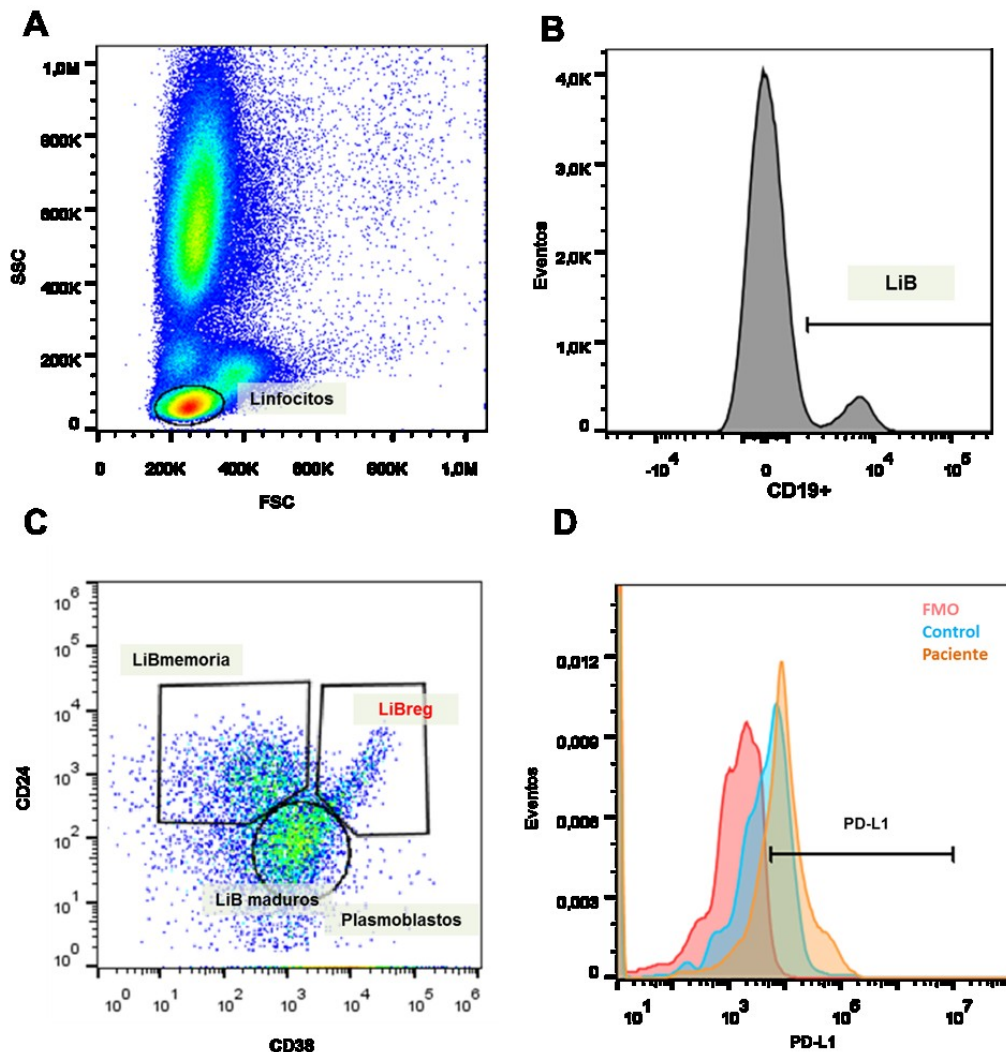
El traslado de las muestras desde el Laboratorio del Nuevo Hospital San Antonio de Padua (Río Cuarto) hasta la Fundación para el Progreso de la Medicina (Córdoba) se realizó según las Normas de Bioseguridad establecidos en la “Guía y Regulación para el transporte de sustancias infecciosas 2015–2016” de la OMS(25).

Métodos. La determinación del fenotipo y niveles de los LiBreg y expresión de PD-L1, al igual que los niveles de LiTCD4+ en los pacientes infectados se realizaron por citometría de flujo en muestras de sangre periférica, en el Laboratorio de la Fundación para el Progreso de la Medicina. De la muestra obtenida se tomaron 100ul y se incubaron con los anticuerpos monoclonales durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad, luego se lisaron los glóbulos rojos con cloruro de amonio durante 15 min a 4°C y en oscuridad; y finalmente los tubos fueron adquiridos y analizados en el citómetro. Para la evaluación de LiBreg se realizaron las siguientes marcaciones de superficie; anti-CD24FITC/ anti PDL-1 PECy7/ anti-CD19 PERCP/ anti-CD38APC, y para el control de fluorescencia menos uno (FMO o *fluorescenceminusone*): anti-CD24FITC/anti-CD19PerCP/anti-CD38APC. Para la determinación de subpoblaciones de LiT; anti-CD3 FITC/anti-CD8 PE/ anti-CD45 PerCP/ anti-CD4 APC. El citómetro de flujo utilizado fue Attune® NxT de Invitrogen™ y el análisis de los datos de citometría se realizó utilizando el programa FlowJoX.

Los valores de CV de los pacientes se obtuvieron de los resultados proporcionados por el Área Biología Molecular del Laboratorio Central de la Provincia de Córdoba. Esta medición fue realizada por PCR en tiempo real, COBAS TaqMan VIH-1 V2.0, Roche.

Como estrategia de análisis se identificaron los linfocitos de acuerdo a su posición en un gráfico de tamaño (*forward scatter*–FSC) versus granularidad (*sidescatter*–SSC), y por la expresión de CD19, los LiB totales. Se analizó la expresión de PD-L1 en dicha población. Por otra parte, se analizaron las diferentes subpoblaciones de LiB siendo la de interés la población de LiBreg por la expresión de CD19+ CD24^{hi} CD38+ (26, 27), en los que también se analizó la expresión de PD-L1. El control FMO se utilizó para interpretar correctamente los datos de citometría de flujo, el mismo contenía todos los fluorocromos excepto el de interés, en este caso PD-L1. Esto permitió fijar un marcador para determinar la expresión de PDL-1 en la población estudiada (LiB totales y LiBreg) para el grupo control y los pacientes infectados (Figura I).

Figura I: Estrategia de análisis de citometría.



A. Gate de Li a partir de SSC vs FSC. B. Gate de LiB CD19+. C. Subpoblaciones de LiB a partir de CD24 vs CD38. D. Histograma de expresión de PD-L1 en FMO, control normal y paciente infectado.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se utilizó el software InfoStat versión estudiantil. En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de los datos, luego para determinar si los datos presentaban una distribución gaussiana se aplicó el análisis estadístico de Shapiro Wilks. Para evaluar la diferencia de medias en aquellos datos que ajustaron a una distribución gaussiana se utilizó el test t-Student y para aquellos datos que no cumplían con dicha distribución se aplicó la prueba estadística U-Mann Whitney. Para realizar el análisis de correlación se utilizó el test de Spearman. Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0,05$ (95% de confianza).

Cabe destacar que al tratarse de un estudio observacional y debido a los recursos limitados es que en función de ello se acotó el número de controles y muestras de pacientes, aun así,

y luego de realizar los cálculos de potencia de los test empleados, los datos describen correctamente lo observado y permite sacar conclusiones válidas estadísticamente.

Consideraciones Éticas. El protocolo de trabajo fue evaluado y aprobado por el Comité de Capacitación, Docencia e Investigación del NHSAP y por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Río Cuarto y registrado en el Registro Provincial de Investigaciones en Salud (RePIS).

RESULTADOS

Análisis descriptivo de las variables: Las características de los sujetos estudiados y el análisis descriptivo de las variables en estudio se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Características de los grupos en estudio

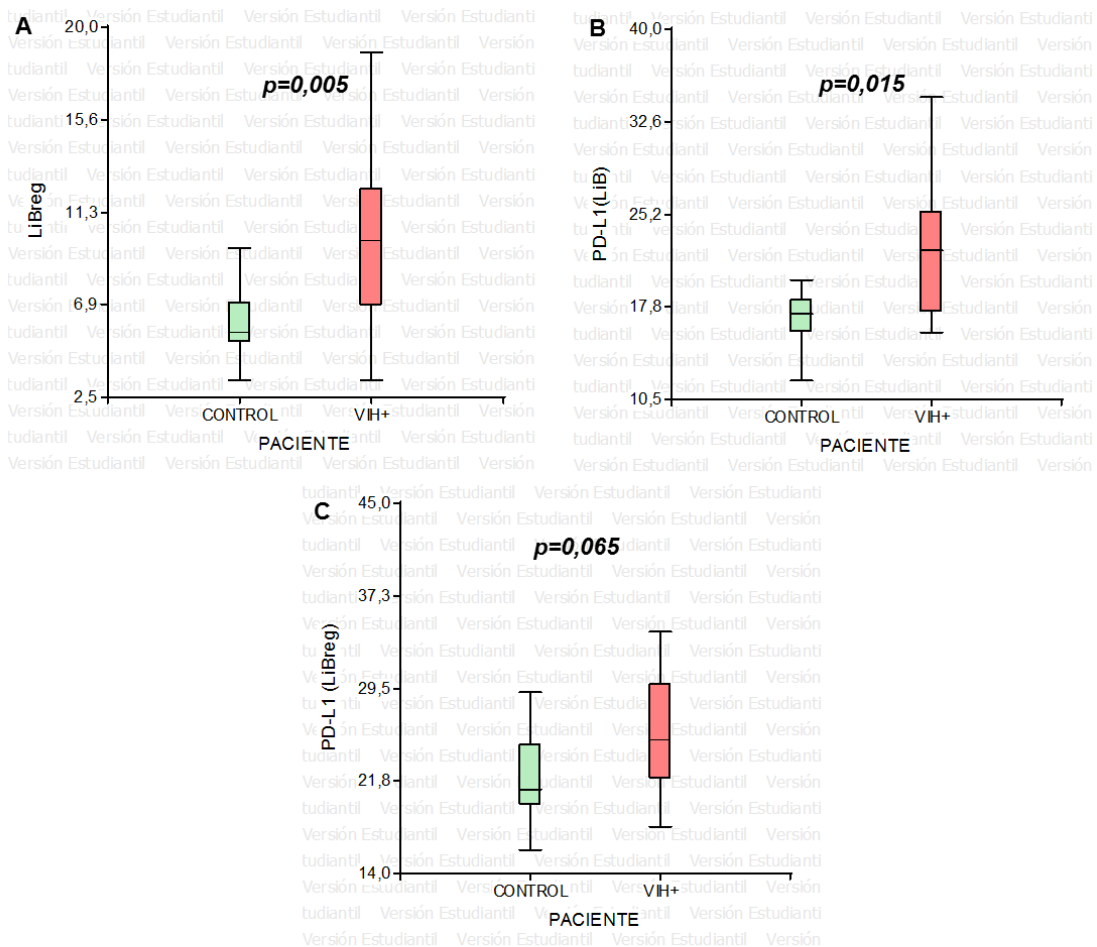
	Grupo control	Pacientes HIV+
n	9	16
Edad	35 [30;38] años	29 [24;34] años
Sexo	F:4 M:5	F:6 M:10
LiTCD4+ (%)	ND	24 [15;29]
Carga Viral (log)	ND	3,68 [3,10;4,10]

LiTCD4+: linfocitos T CD4+, F:femenino, M: masculino, ND: no determinado.
Valores expresados como Mediana [percentil 25th;75th]

Niveles de LiBreg y expresión de PD-L1: Se evaluaron los niveles de LiBreg, la expresión de PD-L1 en LiB totales y la expresión de PD-L1 en esta subpoblación en ambos grupos (controles y pacientes infectados con el VIH).

Para comparar la diferencia de medias entre grupos con respecto a %LiBreg, se aplicó el test t-Student. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa ($p=0,005$) (Figura IIA). Para la comparación del comportamiento de PD-L1(LiB totales) y PD-L1(LiBreg) entre los diferentes grupos, se utilizó la prueba de Man-Whitney. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,015$) para la distribución de PD-L1 (LiB totales) en los grupos control e infectados (Figura IIB), mientras que la variable PD-L1 (LiBreg) no presentó diferencias significativas ($p=0,065$) (Figura IIC).

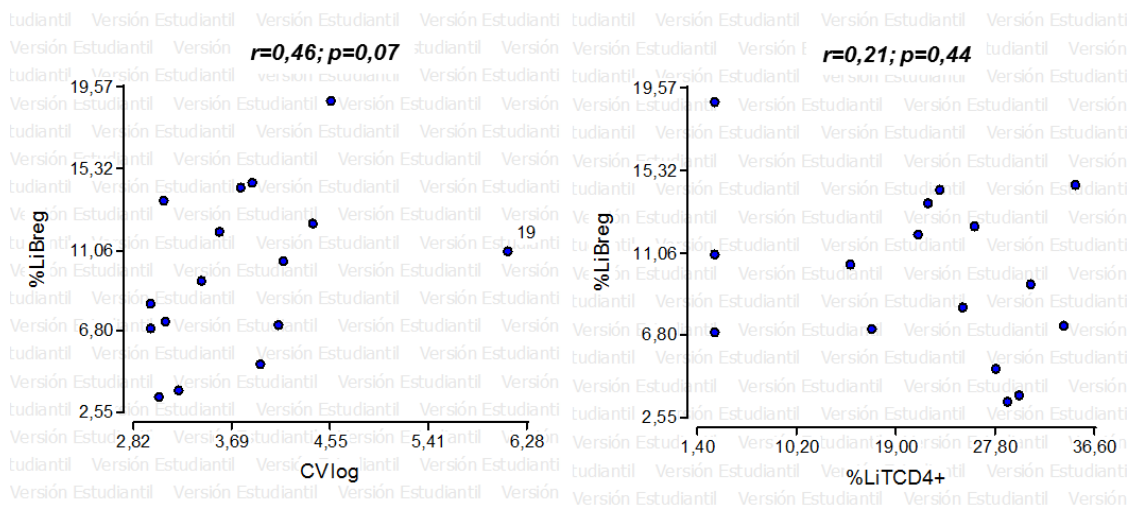
Figura II: Niveles de LiBreg y expresión de PD-L1 en LiB totales y en LiBreg por citometría de flujo.



A. %LiBreg. **B.** Expresión de PD-L1 en LiB totales. **C.** Expresión de PD-L1 en LiBreg en el grupo control y grupo de pacientes VIH+.

Análisis de correlación en los pacientes infectados: Para el análisis de correlación se utilizó la prueba correlación de rangos de Spearman. Se obtuvo una tendencia, que no alcanzó a ser estadísticamente significativa ($p=0,07$) de asociación entre niveles de LiBreg y CV (Figura IIIA), mientras que no se identificó correlación entre LiTCD4+ y LiBreg ($p=0,44$) (Figura IIIB).

Figura III: Correlación entre la CV / LiTCD4+ y LiBreg en pacientes infectados



A. Correlación entre %LiBreg vs CV log. B. Correlación entre %LiBreg vs %LiTCD4+.

DISCUSION

Los LiBreg son importantes células inmunomoduladoras de la respuesta inmune durante la infección por el VIH. Pudo observarse en los resultados, que existe una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de LiBreg entre los grupos, siendo mayor en los pacientes infectados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otras investigaciones.

Liu y col. reportaron que los LiB productores de IL-10 están elevados en pacientes con infección reciente y crónica, y que existe una correlación positiva entre la frecuencia de LiB productores de IL-10 y la CV del paciente infectado y una correlación inversa con la proliferación de LiT específicos para VIH en etapas tempranas de la infección, favoreciendo la replicación viral, el establecimiento de la infección crónica y la progresión de la enfermedad (4). Jiao y col. identificaron una correlación positiva entre LiBreg y la carga viral y una correlación negativa entre LiBreg y el nivel de LiTCD4+ (28). Sin embargo, los resultados de esta investigación mostraron una tendencia, que no alcanzó a ser significativa ($p=0,07$), de correlación entre niveles de LiBreg y CV. Probablemente esto se deba a que no puede establecerse con certeza en qué etapa de la infección se encuentran los pacientes en estudio y esto influya en el análisis posterior. Una hipótesis alternativa, considerando la tendencia a una correlación positiva entre las variables de LiBreg y CV, es que el tamaño de la muestra estudiada no alcance a evidenciar posibles diferencias estadísticas. En este contexto, se propone continuar con el trabajo incrementando el tamaño muestral e incorporando nuevas variables de análisis como el recuento de LiT CD8+ activados.

Se ha observado que la expresión del PD-1 en los LiT específicos para el VIH es alta. Sin embargo, pocos trabajos se han encargado del estudio de PD-L1 expresado en los LiBreg. En este trabajo al evaluarse la expresión de PD-L1 en los LiB totales se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los controles y los pacientes, pero no se observó esta diferencia cuando se evaluó la expresión de PD-L1 en los LiBreg. Los pacientes infectados mostraron una expresión mayor de PD-L1 (LiBtotales), lo cual permite inferir que durante la infección por VIH este ligando juega un rol importante. Este trabajo no puede establecer si lo hacen específicamente la población de LiBreg, sin embargo, otros estudios han demostrado que, durante la infección por VIH, la alteración de la respuesta efectora de células T está mediada por los LiBreg a través de la producción de IL-10 y PD-L1 (9,19,29). En este sentido, cabe destacar que debido a que no existen marcadores específicos para LiBreg, la definición fenotípica CD19 CD24 CD38 utilizada en este trabajo (25,26), si bien se sustenta en la literatura actual, puede excluir otras LiB con funciones regulatorias mediadas por la expresión de PD-L1.

La función regulatoria de los LiBreg en la infección por VIH no ha sido completamente dilucidada. Por un lado, es posible que tenga un efecto negativo en la respuesta inmune antiviral, favoreciendo la replicación viral, el agotamiento de los LiT y la progresión de la enfermedad (19,28) y, por otro lado, es posible que estos linfocitos sean necesarios para regular la hiperactivación del sistema inmune. Por lo que, comprender el rol de los LiBreg relacionados a la inmunopatogenia del paciente infectado por VIH aportaría conocimientos para el desarrollo de nuevos parámetros, como los niveles de LiBreg, que podrían ser utilizados en el seguimiento del paciente y mejorar así la toma de decisiones terapéuticas. Para ello, a futuro, deberían realizarse estudios para establecer cómo se modifican los niveles de LiBreg y la expresión de PD-L1 luego de ser tratados los pacientes con la TARV.

AGRADECIMIENTOS

A las instituciones participantes en el estudio: NHSAP, FPM y al CIBICI.

Al Dr. Héctor Angelli por su colaboración en el análisis estadístico.

A la Bioq. Esp. Susana Rubiolo por su importante aporte.

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial del Sector de la Salud contra VIH 2016. Número de referencia OMS: WHO/HIV/2016. Organización Mundial de la Salud, 2016.

2. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Boletín epidemiológico VIH-Sida. Dirección de Sida y ETS, Ministerio de Salud de la Nación. Argentina, 2016
3. Haas A, Zimmermann K, Oxenius A. Antigen-Dependent and -Independent Mechanisms of T and B Cell J Virol 2011; 85 :12102-13.
4. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1997 Oct 1;16:83-92.
5. Moir S, Fauci AS. B cells in HIV infection and disease. Nat Rev Immunol. 2009 April 9: 235–245.
6. Kacani L, Prodinger WM, Sprinzl GM, Kacani L, et al. Detachment of human immunodeficiency virus type 1 from germinal centers by blocking complement receptor type 2. J Virol. 2000; 74: 7997–8002.
7. Moir S, Malaspina A, Li Y, et al. B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. J Exp Med. 2000; 5: 637–46.
8. Malaspina A, Moir S, Nickle DC, et al. Human immunodeficiency virus type 1 bound to B cells: relationship to virus replicating in CD4+ T cells and circulating in plasma. J Virol. 2002;76:8855-63.
9. Rincón-Arévalo H, Sanchez-Parra CC, Castaño D, Yassin L, Vásquez G. Regulatory B Cells and Mechanisms. Int Rev Immunol. 2016;35:156-76.
10. Liu J, Zhan W, Kim C, et al. IL-10-Producing B Cells Are Induced Early in HIV-1 Infection and Suppress HIV-1-Specific T Cell Responses. PLoS One. 2014 Feb 21;9: e89236.
11. Flores-Borja F, Bosma A, Ng D, Reddy V, Ehrenstein MR, Isenberg DA, Mauri C. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. Sci Transl Med. 2013;5:173ra23
12. Iwata Y, Matsushita T, Horikawa M, Dilillo DJ., et al. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. Blood. 2011;117:530-41
13. Rincón-Arévalo H, Yassin-Noreña L, Vásquez G, Castaño D. Regulatory B cells in human diseases and mouse models of autoimmunity. Inmunología 2013;32:129–38.
14. Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F, Janeway CA. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. J Exp Med. 1996;184:2271-8.

15. Lenert P, Brummel R, Field EH, Ashman RF. TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production. *J Clin Immunol* 2005;25:29–40.
16. Mizoguchi A, Mizoguchi E, Smith RN, et al. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. *J Exp Med* 1997;186:1749–56.
17. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 2001;167:1081–9.
18. Liu Y, Cheng LS, Wu SD, et al. IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clin Sci (Lond)*. 2016;130:907-19.
19. Siewe B, Stapleton JT, Martinson J, et al. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti- HIV CD8(p) T cell function in vitro. *J Leukoc Biol* 2013; 93:811–18.
20. Siewe B, Wallace J, Rygielski S, et al. Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PLoS One* 2014; 9:e92934.
21. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006; 27:195-201.
22. Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, et al. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 2007;81:4215-25.
23. Urbani S, Amadei B, Tola D, et al. PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 2006;80: 11398-403.
24. Vargas- Rojas M, Jimenez-Alvarez L, Ramirez G, et al. PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 2008;21:235-240.
25. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2015–2016. WHO/HSE/GCR/2015.2. World Health Organization 2016.
26. Berthelot JM, Jamin C, Amrouche K, Le Goff B, Maugars Y, Youinou P. (2013) Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine* 2013; 80:18–22.
27. Zhang X. Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol*. 2013; 10:113-21.
28. Jiao Y, Wang X, Zhang T, Sun L, Wang R, Li W, Ji Y, Wu H, Liu C. Regulatory B cells correlate with HIV disease progression. *Microbiol Immunol* 2014; 58: 449–55.
29. Said EA, Dupuy FP, Trautmann L, Zhang Y, Shi Y, et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4 p T cell activation during HIV infection. *Nat Med*. 2010;16:452-9.