

Alteraciones en la producción de citocinas en respuesta a *Toxoplasma gondii* aparecen desde las etapas tempranas en pacientes co-infectados con VIH-1.

Edwin Escobar-Guevara^{1,2,3}, María de Quesada-Martínez⁴, Yhajaira Roldán-Dávila^{5,6}, Belkisyolé Alarcón de Noya⁷ y Miguel Alfonso-Díaz^{1,8}

¹Laboratorio de Inmunofisiología Celular, Escuela de Medicina “José María Vargas”, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

²Cátedra de Inmunología, Escuela de Medicina “José María Vargas”, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

⁴Cátedra de Fisiopatología, Escuela de Medicina “José María Vargas”, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁵Servicio de Infectología, Hospital “José Ignacio Baldó”, El Algodonal, Caracas.

⁶Cátedra de Microbiología, Escuela de Medicina “José María Vargas”, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁷Sección de Inmunología, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

⁸Cátedra de Fisiología, Escuela de Medicina “José María Vargas”, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. Dirección Académica, Escuela Latinoamericana de Medicina “Salvador Allende”, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: VIH-1; *Toxoplasma gondii*; respuesta inmunitaria; co-infección.

Resumen. Tanto el Virus de Inmunodeficiencia Humana-1 (VIH-1), como el protozoo *Toxoplasma gondii* son capaces de infectar al ser humano e invadir su sistema nervioso central (SNC). En individuos inmunocompetentes *T. gondii* causa infecciones crónicas, generalmente asintomáticas; sin embargo, la inmunodeficiencia asociada a etapas avanzadas de la infección por VIH-1, se relaciona con la pérdida del control de la infección parasitaria latente y enfermedades graves a nivel del SNC, como encefalitis toxoplásmica. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la evolución de la respuesta inmunitaria contra *T. gondii* en pacientes co-infectados con VIH-1, en distintas etapas de la infección viral. La respuesta contra *T. gondii* se evaluó a través de la producción *in vitro* de citocinas en respuesta a antígenos parasitarios, en individuos con serología positiva

para VIH-1 y negativa para *T. gondii* (P1), positiva para VIH-1 y *T. gondii* (P2), negativa para VIH-1 y *T. gondii* (C1) y negativa para VIH-1 y positiva para *T. gondii* (C2). Los pacientes (P1 y P2) se agruparon en *tempranos/asintomáticos* (P1A, P2A) o *tardíos/sintomáticos* (P1B/C, P2B/C) de acuerdo a su recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica (>350 o <350 células/ μ L, respectivamente). La infección por VIH-1, desde etapas tempranas, se asoció con una producción de IL-2, TNF- α e IFN- γ en respuesta a *T. gondii* significativamente menor. Estos defectos pueden entorpecer la respuesta anti-*T. gondii* en pacientes co-infectados, aumentando la posibilidad de reactivación de las infecciones latentes, lo que representa un riesgo para la integridad y funcionalidad del SNC.

Alterations in the production of cytokines in response to *Toxoplasma gondii* appear from early stages in patients co-infected with HIV-1.

Invest Clin 2022; 63 (3): 218 – 234

Key words: HIV-1; *Toxoplasma gondii*; immune response; co-infection.

Abstract. Both HIV-1 and *Toxoplasma gondii* are able to invade central nervous system and affect its functionality. Advanced HIV-1 infection has been associated with defects in immune response to *T. gondii*, leading to reactivation of latent infections and the appearing of toxoplasmic encephalitis. This study evaluated changes in the immune response to *T. gondii* in different stages of HIV infection. Immune response to *T. gondii* was assessed studying cytokine production in response to parasite antigens in HIV-1-infected/*T. gondii*-non-infected (P1), HIV-1/*T. gondii* co-infected (P2), HIV-1-non-infected/*T. gondii*-non-infected (C1) and HIV-1-non-infected/*T. gondii*-infected (C2) individuals. Patients (P1 and P2) were divided in early/asymptomatic (P1A, P2A) or late/symptomatic (P1B/C, P2B/C) according to peripheral blood CD4+ T lymphocyte counts (>350 or <350/ μ L, respectively). The HIV-1 infection, from early/asymptomatic stages, was associated with significant lower production of IL-2, TNF- α and IFN- γ in response to *T. gondii*, when P2 patients were compared with C2 controls. These early defects may impair anti-parasitic response in co-infected patients, allowing to reactivation of parasitic latent infection, enhancing the risk of CNS damage and impairment of neurocognitive functions.

Recibido: 10-02-2022

Aceptado: 10-06-2022

INTRODUCCIÓN

Toxoplasma gondii es un parásito intracelular obligado, que causa una de las infecciones por protozoos más comunes en el ser humano¹, con una prevalencia global

promedio del 25,7 %². En individuos inmunocompetentes la infección por *T. gondii* es usualmente crónica y el parásito se mantiene en forma latente en el interior de quistes en los tejidos del hospedador, especialmente en el sistema nervioso central (SNC)^{3, 4}.

Durante la infección aguda los *taquizoítos* (forma del parásito en su fase de replicación rápida⁵) proliferan activamente en diversas células nucleadas que incluyen neuronas, astrocitos y otras poblaciones celulares en el cerebro⁶⁻⁸; luego, bajo la presión ejercida por la respuesta inmunitaria, los *bradizoítos* (forma del parásito en su etapa latente⁵), se ubican dentro de quistes en las células infectadas, estableciendo así la infección crónica. La producción de interferón gamma (IFN- γ), por células de la inmunidad innata⁹,¹⁰ y adaptativa^{11,12} es parte fundamental de la respuesta protectora contra *T. gondii*¹³ y conduce a la activación de macrófagos, con producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y a la expresión de sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS)^{14,15}, creando un microambiente que lleva a la transformación de taquizoítos en bradizoítos¹⁶. La producción de IFN- γ también es primordial para evitar la reactivación de la infección crónica^{17,18}, y aunque diversas poblaciones celulares participan en la producción de esta citocina, el papel de los linfocitos T es esencial en la respuesta protectora efectiva^{11,12,19,20}. En esta respuesta inmunitaria contra *T. gondii*, la interleucina-2 (IL-2) media la expansión de los linfocitos T y de las células citotóxicas naturales (NK)²¹, mientras que la IL-10, con su papel modulador de la respuesta inmunitaria y su efecto anti-inflamatorio, se requiere para evitar el daño a los tejidos del hospedador^{22,23}. Es notable que los estados de inmunosupresión, como aquellos asociados con la infección avanzada por el virus de inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1)^{24,25}, puedan conducir a la reactivación de las infecciones crónicas latentes, con ruptura de quistes y proliferación de taquizoítos, provocando una fuerte respuesta inflamatoria y la destrucción de tejidos del hospedador⁵. En el SNC la reactivación de la infección crónica usualmente se presenta como encefalitis toxoplásmica, una importante infección oportunista en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)²⁶. Debido a que la progresión de la infección por

VIH-1, así como el deterioro de la respuesta inmunitaria asociada con esta, son procesos graduales²⁷⁻²⁹, este estudio se enfocó en evaluar cómo se modifica la producción de citocinas en respuesta a *T. gondii* en las distintas etapas de la infección por VIH-1 en los pacientes co-infectados. La evaluación de la producción de citocinas hizo posible evidenciar alteraciones tempranas en la respuesta anti-*T. gondii*, que podrían disminuir la capacidad de control de las infecciones latentes, con aumento del riesgo de reactivación de la replicación parasitaria y de daños en la estructura y funcionalidad del SNC.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se incorporaron en el estudio 34 individuos adultos seropositivos para VIH-1 y 14 seronegativos, pacientes del Servicio de Infectología del Hospital “José Ignacio Baldó” de Caracas, de la Sección de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical y de la Escuela de Medicina “José María Vargas” de la Universidad Central de Venezuela en Caracas. Todos los participantes firmaron un consentimiento informado y el estudio fue aprobado por los comités de bioética de las instituciones participantes.

Los participantes fueron agrupados de la siguiente manera:

- **Grupo Control 1 (C1):** 5 individuos asintomáticos (2 hombres, 3 mujeres; 38 ± 4 años de edad), seronegativos para VIH-1 y *T. gondii*.
- **Grupo Control 2 (C2):** 9 individuos asintomáticos (6 hombres, 3 mujeres; 31 ± 12 años de edad), seronegativos para VIH-1 y seropositivos para *T. gondii*.
- **Grupo de Pacientes 1 (P1):** 13 individuos (8 hombres, 5 mujeres; 37 ± 9 años de edad), seropositivos para VIH-1 y seronegativos para *T. gondii*. Estos pacientes se agruparon en base a su recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de la siguiente manera:

***Grupo P1A** (“temprano/asintomático”): 5 individuos (2 hombres, 3 mujeres; 39 ± 6 años de edad), con recuentos de linfocitos T CD4+ en sangre periférica mayores a 350 células/ μ L.

***Grupo P1B/C** (“tardío/sintomático”): 8 individuos (6 hombres, 2 mujeres; 36 ± 10 años de edad), con recuentos de linfocitos T CD4+ en sangre periférica menores a 350 células/ μ L.

• **Grupo de Pacientes 2 (P2)**: 21 individuos (16 hombres, 5 mujeres; 37 ± 10 años de edad), seropositivos para VIH-1 y *T. gondii*. Estos pacientes se agruparon en base a su recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica de la siguiente manera:

***Grupo P2A** (“temprano/asintomático”): 8 individuos (5 hombres, 3 mujeres; 35 ± 10 años de edad), con recuentos de linfocitos T CD4+ en sangre periférica mayores a 350 células/ μ L.

***Grupo P2B/C** (“tardío/sintomático”): 13 individuos (11 hombres, 2 mujeres; 38 ± 9 años de edad), con recuentos de linfocitos T CD4+ en sangre periférica menores a 350 células/ μ L.

Criterios de exclusión y Toma de la muestra

La serología para VIH-1 se determinó por pruebas de ELISA y Western Blot, y la de *T. gondii* por ELISA (IgG e IgM) y avidéz. Los participantes no habían recibido terapia anti-retroviral ni anti-toxoplásmica al momento del estudio. Los criterios de exclusión incluían traumatismo cráneo-encefálico, enfermedades autoinmunes, enfermedades del SNC no asociadas a VIH-1, abuso o dependencia al alcohol o drogas ilícitas y el tratamiento con inmunosupresores. A cada participante se le tomó una muestra de sangre periférica, utilizando EDTA como anticoagulante, para la determinación de la carga viral de VIH-1,

las subpoblaciones de linfocitos T, el cultivo celular y la determinación de citocinas.

Cultivo de células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas por gradiente de densidad (Histopaque 1077; Sigma-Aldrich) de las muestras de los pacientes. Las CMSP (1×10^5 células/pozo) fueron cultivadas por 72 horas, a una temperatura de 37°C y un ambiente con 5% de CO₂, por triplicado (tres pozos para cada condición), en placas de cultivo de 96 pozos (Nuncclone, Nunc), en un volumen final de 200 μ L/pozo, en medio de cultivo RPMI completo (RPMI 1640, Gibco; tampón HEPES 10 mM, Gibco; piruvato de sodio 1 mM, Sigma; aminoácidos no esenciales 1x, Gibco; L-glutamina 2 mM, Gibco; antibióticos: penicilina 100 U/mL, estreptomina 100 mg/mL, Gibco; suero bovino fetal 10%, Gibco), en tres condiciones básicas:

- **Medio**: CMSP cultivadas en condiciones basales, sin estimulación.
- **PHA**: CMSP cultivadas en presencia del estimulador policlonal fitohemaglutinina (PHA, Sigma, 5 μ g/mL)
- **SATg**: CMSP cultivadas en presencia de extracto de antígenos solubles de taquizoítos de *T. gondii* (SATg, provisto por Belkisyolé Alarcón de Noya, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas; 1 μ g/mL). A las 72 horas de cultivo los sobrenadantes se recolectaron y almacenaron a -80°C, para ser posteriormente utilizados en la determinación de citocinas.

Determinación de citocinas

La concentración de IL-2, IL-10, TNF- α e IFN- γ en los sobrenadantes de cultivo se determinó por citometría de flujo (citómetro FACScalibur, Becton Dickinson) utilizando un estuche comercial (*Human Th1/Th2 Cytokine, Cytometric Bead Array*, Becton-Dickinson), siguiendo las instrucciones del fabricante.

te. Brevemente, los sobrenadantes de cultivo se incubaron simultáneamente con varias poblaciones de microperlas. Cada población de microperlas tenía una intensidad de fluorescencia particular, la cual podía evidenciarse con el detector FL3 del citómetro, y tenía en su superficie anticuerpos específicos para una de las citocinas (IL-2, IL-10, TNF- α o IFN- γ), de manera que podía “atrapar” dicha citocina del sobrenadante. Simultáneamente, las muestras fueron incubadas con anticuerpos detectores conjugados con ficoeritrina (PE), que eran específicos para cada una de las distintas citocinas y podían formar complejos o “sándwiches” con las citocinas unidas a las microperlas. La intensidad de fluorescencia de la PE medida en el detector FL2 del citómetro revelaba cuánta citocina se había unido a cada población de microperlas y, utilizando curvas de calibración, era posible conocer la concentración en las muestras.

Análisis estadístico

Para analizar los datos se utilizó el programa SigmaStat® (Jandel Scientific). Para estudiar las diferencias entre los grupos se utilizaron las pruebas *T de Student* o *U de Mann-Whitney*, según fuese apropiado. El coeficiente de *Pearson* se utilizó para analizar la correlación entre las variables. Las pruebas se consideraron estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Producción de IL-2: Cuando las CMSP del grupo C2 (individuos con serología positiva para *T. gondii*, y negativa para VIH-1) fueron estimuladas durante 72 horas con antígenos de *T. gondii* (SATg), produjeron más IL-2 que cualquier otro grupo (Tablas 1 y 2), con diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con la producción de las mismas células cultivadas sin estimulación ($p=0,001$) (Fig. 1A, SATg vs. Medio). Por otra parte, la producción de IL-2 por las CMSP de los pacientes P2 (individuos con serología positiva para *T. gondii* y VIH-1) estimuladas con

SATg, fue significativamente menor que la del grupo C2, tanto en las etapas tempranas ($p=0,006$) como en las tardías ($p < 0,001$) (Fig. 1A, SATg). Ningún grupo incrementó su producción de IL-2 cuando las CMSP fueron cultivadas por 72 horas en presencia de PHA (Fig. 1A, PHA vs. Medio).

Producción de IL-10: La estimulación con PHA indujo una producción significativamente mayor de IL-10 en todos los grupos, al comparar con los cultivos no estimulados ($p \leq 0,029$) (Fig. 1B, PHA vs. Medio). Cuando las CMSP de los grupos C2 y P1A fueron cultivadas en presencia de SATg, produjeron cantidades significativamente mayores de IL-10 que el grupo C1 ($p=0,040$ y $p=0,016$, respectivamente) (Fig. 1B, SATg) y que sus respectivos cultivos en Medio ($p=0,001$ y $p=0,029$, respectivamente) (Fig. 1B, SATg vs. Medio). P2B/C, bajo estimulación con SATg, produjo una cantidad significativamente mayor de IL-10 que en cultivos no estimulados ($p=0,009$) (Fig. 1B, SATg vs. Medio). P1B/C evidenció producción espontánea de IL-10 en cultivos no estimulados, con valores significativamente mayores que P1A y C1 ($p=0,024$ y $p=0,042$, respectivamente) (Fig. 1B, Medio).

Producción de TNF- α : Bajo estimulación con PHA, todos los grupos produjeron una cantidad significativamente mayor de TNF- α que los cultivos en Medio ($p \leq 0,032$) (Fig. 1C, PHA vs. Medio), pero la producción de los pacientes (P1 y P2), en esta condición de estimulación policlonal, fue significativamente mayor que la de los grupos control (C1 y C2, respectivamente; $p \leq 0,029$) (Fig. 1C, PHA). C2, bajo estimulación con SATg, produjo una cantidad significativamente mayor de TNF- α que C1 ($p=0,004$) (Fig. 1C, SATg) y que su respectivo cultivo en Medio ($p=0,001$) (Fig. 1C, SATg vs. Medio). También, bajo estimulación con SATg, los dos grupos de pacientes P2 produjeron más TNF- α que los cultivos en Medio (significativo para P2B/C; $p=0,006$) (Fig. 1C, SATg vs. Medio) pero menos que C2 (significativo para P2A; $p=0,041$) (Fig. 1C, SATg).

Tabla 1
Determinación de Citocinas

C1	IL-2 (pg/mL) ^a			IL-10 (pg/mL) ^a			TNF- α (pg/mL) ^a			IFN- γ (pg/mL) ^a		
	Medio ^b	PHA ^c	STAg ^d	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
C1.1	26	23	35	9		36	3	5	2	43	51	25
C1.2	17	32	18		354		7		12	23	10821	43
C1.3	16	23	17	3	486	3	2	8	3	29	48	36
C1.4	17	18	19	9	750	9	3	8	2	27	41	36
C1.5	16	15	59	6	906	16	4	108	20	18	9047	
C2	IL-2 (pg/mL)			IL-10 (pg/mL)			TNF- α (pg/mL)			IFN- γ (pg/mL)		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
C2.1	14	11	196	4	1661	60	2	214	422	28	37819 ^e	41280 ^e
C2.2	13	11	143	3	750	32	3	49	82	38	8074	16263
C2.3	18	17	38	10	498	28	3	68	50	39	1483	3242
C2.4	19	19	188	3	1185	35	3	61	460	32	2391	37520 ^e
C2.5	22	16	98	10	800	49	6	473	54			
C2.6	18	16	57	25	1064	40	4	75		23	326	
C2.7	17	26	32		914	101	17			92	74225 ^e	37918 ^e
C2.8	18	22	24					527	286			
C2.9	25	20	20									
P1A	IL-2 (pg/mL)			IL-10 (pg/mL)			TNF- α (pg/mL)			IFN- γ (pg/mL)		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
P1A.1	18	28	16	18	208	35	3	757	3	31	5556	33
P1A.2	14	18	15									
P1A.3	19	15	19	3	2384	63	3	831	4	31	34044 ^e	37
P1A.4	20	17	20	13	1762	73	3	1100	7	39	34776 ^e	54
P1A.5	18	18	20	4	631	43	2	1441	21	33	25029 ^e	46
P1B/C	IL-2 (pg/mL)			IL-10 (pg/mL)			TNF- α (pg/mL)			IFN- γ (pg/mL)		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
P1B/C.1	18	18	17	19	2514	162	3	767	6	29	20010 ^e	42
P1B/C.2	19	19	17	105	1244	127	4	2310	4	33	22243 ^e	35
P1B/C.3	22	23	18	137	1984	20	36	1687	8	58	54711 ^e	45
P1B/C.4	17	23	16	6	344	7	5	411	7	33	10341	38
P1B/C.5	18	20	18	249	594	379	13	1134	33	35	7440	23
P1B/C.6	20	22	21	32	1618	167	5	316	7	56	769	48
P1B/C.7	16	19	15									
P1B/C.8	17	17		75	623		12	334		39		

Tabla 1. CONTINUACIÓN

P2A	IL-2 (pg/mL)			IL-10 (pg/mL)			TNF- α (pg/mL)			IFN- γ (pg/mL)		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
P2A.1	12	13	12	6	2787	14	7	943	4	41	8666	43
P2A.2	13	16	21									
P2A.3	21	21	24	5	780	10	8	580	62	110	50854 ^e	
P2A.4	22	21	21	5	1051	8	5	1274	7	43	3766	68
P2A.5	15	25	20	24	791	40	8	1163	18	37	71385 ^e	277
P2A.6	11	68	18	6	3428	185	2	3123	6	30	31280 ^e	42
P2A.7	21	18	23	17	187	17				58	27951 ^e	1964
P2A.8	17	22	21	34	182	142	20	884	135	18	11292	107

P2B/C	IL-2 (pg/mL)			IL-10 (pg/mL)			TNF- α (pg/mL)			IFN- γ (pg/mL)		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
P2B/C.1	12	12	12				8	1929	80	39	33603 ^e	102
P2B/C.2	20	19	20	3	1478	42	3	2364	10	31	35101 ^e	45
P2B/C.3	16	20	15	46	180	68	42	1335	94	36	20398 ^e	199
P2B/C.4	14	12	15	27	227	68				43	31413 ^e	65
P2B/C.5	19	15	27	5	507	11	4	203	206	24	32945 ^e	
P2B/C.6	18	18	21	9	824	17	2	52	4	37		39
P2B/C.7	17	19	18	11	473	129	6	874	76	40	12347	53
P2B/C.8	15	12	13	49	427	32	31	469	6	69	1436	21
P2B/C.9	17	13	17	38	668	171	10	3130	146	44	37327 ^e	1089
P2B/C.10	19	37	23	28	459	84						
P2B/C.11	18	21	18	39	1030	235	3	531	8	35	12381	61
P2B/C.12	19	20	24	16	231	22	5	1809	66	31	5201	887
P2B/C.13	18	19	21	16	1560	334	3	859	234	24	10802	774

^aLas concentraciones de IL-2, IL-10, TNF- α e IFN- γ se determinaron en el sobrenadante de los cultivos.

^bMedio: CMSP cultivadas por 72 horas en condiciones basales, sin estimulación.

^cPHA: CMSP cultivadas por 72 horas en presencia de fitohemaaglutinina (5 μ g/mL).

^dSATg: CMSP cultivadas por 72 horas en presencia de antígenos solubles de taquizoítos de *T. gondii* (1 μ g/mL).

^eLas concentraciones de IFN- γ mayores a 20.000 pg/mL se consideran más allá del rango de la curva de calibración.

Tabla 2
Producción de Citocinas – Dispersión de valores.

C1	IL-2			IL-10			TNF- α			IFN- γ		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
Mediana ^a	17	23	19	7	618	13	3	8	3	27	52	36
25% ^a	16	17	18	5	420	6	3	6	2	22	47	31
75% ^a	19	25	41	9	829	26	5	58	14	32	9491	40
n ^b	5	5	5	4	4	4	5	4	5	5	5	4
C2	IL-2			IL-10			TNF- α			IFN- γ		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
Mediana	18	17	58	7	914	41	3	75	82	35	5233	37520
25%	16	15	30	3	763	33	3	63	51	28	1484	13008
75%	19	21	155	11	1155	57	6	408	388	39	37819	38759
n	9	9	9	6	7	7	7	7	7	6	6	5
P1A	IL-2			IL-10			TNF- α			IFN- γ		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
Mediana	18	18	19	8	1196	53	3	966	5	32	29536	42
25%	17	17	16	3	419	39	2	794	3	31	15293	35
75%	19	21	20	16	2073	68	3	1271	14	36	34410	50
n	5	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4
P1B/C	IL-2			IL-10			TNF- α			IFN- γ		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
Mediana	18	19	17	75	1244	144	5	767	7	35	15176	40
25%	17	18	17	22	602	20	4	353	6	33	7440	35
75%	19	22	18	129	1893	167	13	1549	8	52	22243	45
n	8	8	7	7	7	6	7	7	6	7	6	6
P2A	IL-2			IL-10			TNF- α			IFN- γ		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
Mediana	16	21	21	6	791	17	7	1053	13	41	27952	88
25%	13	17	19	5	335	11	5	884	6	32	9323	43
75%	21	24	22	22	2353	116	8	1274	62	54	45960	277
n	8	8	8	7	7	7	6	6	6	7	7	6
P2B/C	IL-2			IL-10			TNF- α			IFN- γ		
	Medio	PHA	STAg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg	Medio	PHA	SATg
Mediana	18	19	18	22	490	68	5	874	76	37	20398	65
25%	16	13	15	10	329	27	3	484	9	31	11189	47
75%	19	20	21	39	927	150	9	1899	133	41	33439	630
n	13	13	13	12	12	12	11	11	11	12	11	11

^aLos valores de mediana, percentil 25 y percentil 75 están expresados en pg/mL.

^bn=número de pacientes en cada grupo analizado.

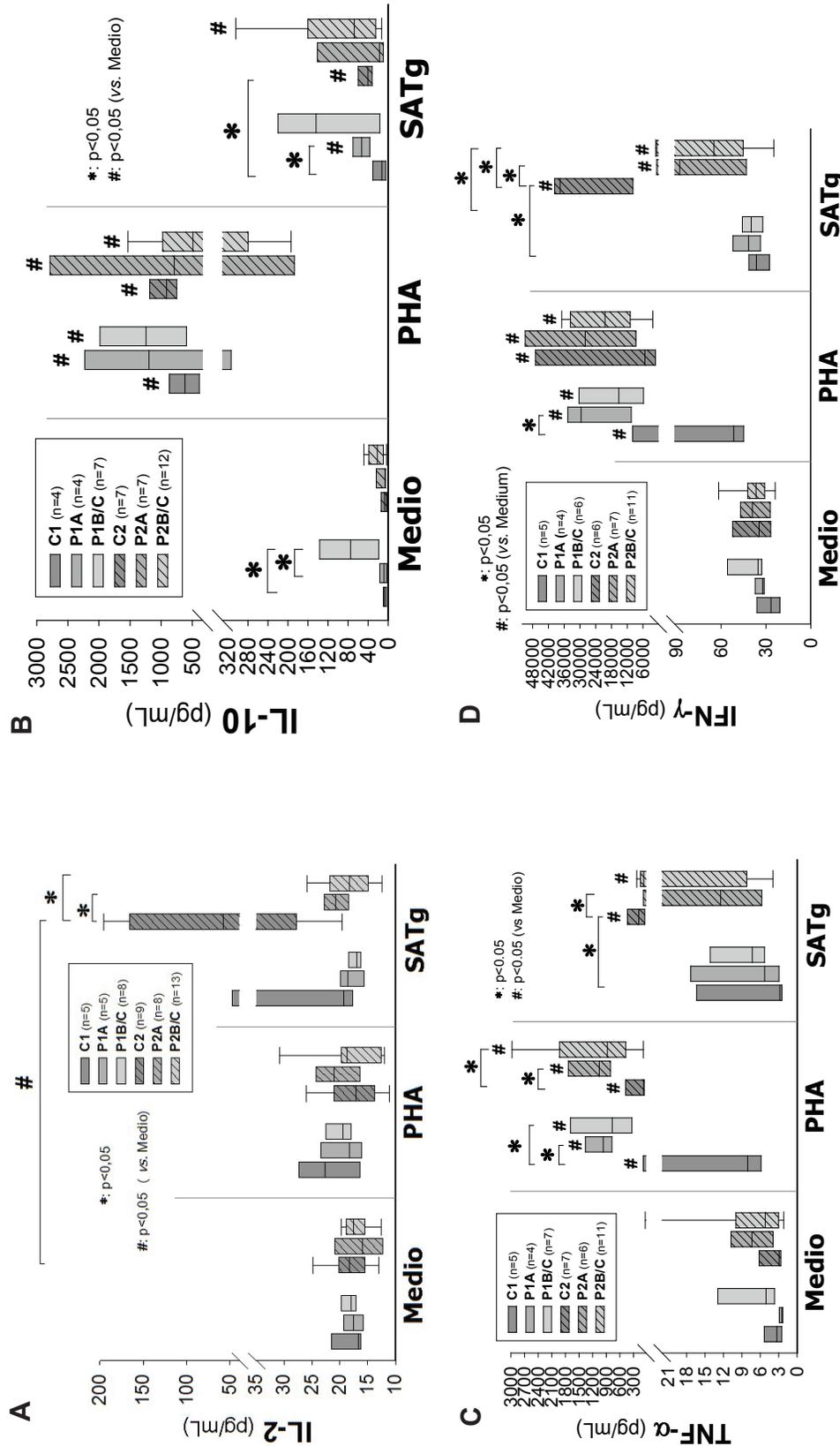


Fig. 1. Producción de Citocinas: Se representan las medianas (líneas horizontales), los percentiles 5 y 95 (cajas) y las líneas de error de las concentraciones (pg/mL) de IL-2 (A), IL-10 (B), TNF-α (C) e IFN-γ (D) en los sobrenadantes de cultivos de CMSP de individuos no infectados con VIH-1 con serología negativa (C1) o positiva (C2) para *T. gondii*; y de pacientes infectados con VIH-1, con serología negativa (P1) o positiva (P2) para *T. gondii*. Los pacientes (P1 y P2) se agruparon de acuerdo a su recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica, en *tempranos/sintomáticos* (>350 células/ μ L: P1A y P2A) o *tardeos/sintomáticos* (<350 células/ μ L: P1B/C y P2B/C). Las CMSP fueron cultivadas por 72 horas en condiciones basales/sin estimulación (Medio), en presencia del estimulador policlonal fitohemaglutinina (PHA, 5 μ g/mL) o en presencia de antígenos solubles de taquizoítos de *T. gondii* (SATg, 1 μ g/mL). Los asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, el símbolo de número representa diferencias estadísticamente significativas entre un grupo en una condición determinada y su respectivo cultivo control sin estimulación (Medio).

Producción de IFN- γ : La estimulación con PHA indujo una producción significativamente mayor de IFN- γ en todos los grupos, al comparar con la condición *Medio* ($p \leq 0,029$) (Fig. 1D, *PHA* vs. *Medio*). Bajo estimulación con SATg, los grupos C2, P2A y P2B/C produjeron una cantidad significativamente mayor de IFN- γ que en *Medio* ($p=0,004$, $p=0,026$ y $p=0,006$, respectivamente) (Fig. 1D, *SATg* vs. *Medio*), y mayor que sus respectivos grupos C1, P1A y P1B/C, también bajo estimulación con SATg (significativo para C2 vs. C1: $p=0,016$; y para P2B/C vs. P1B/C: $p=0,024$) (Fig. 1D, *SATg*). Sin embargo, los pacientes P2A y P2B/C produjeron cantidades significativamente menores de IFN- γ que el grupo C2, en cultivos estimulados con SATg ($p=0,004$ y $p=0,002$, respectivamente) (Fig. 1D, *SATg*).

Correlaciones entre las producciones de citocinas: Cuando la producción de citocinas en respuesta a los antígenos de *T. gondii* (SATg) se analizó en los grupos de individuos seropositivos para el parásito (C2 y P2), se encontraron correlaciones positivas (Coeficiente de *Pearson*), estadísticamente significativas, entre la producción de IFN- γ y la producción de IL-2 ($p < 0,001$, $n=25$; Fig. 2A), entre la producción de TNF- α y la producción de IL-2 ($p < 0,001$, $n=23$; Fig. 2B), y entre la producción de TNF- α y la producción de IFN- γ ($p < 0,001$, $n=20$; Fig. 2C).

DISCUSIÓN

Los individuos inmunocompetentes son capaces de controlar la infección por *T. gondii* induciendo una respuesta inmunitaria celular temprana y fuerte^{30,32}. En esta respuesta el IFN- γ es el principal mediador de resistencia del hospedador¹³, al estimular la expresión de diferentes moléculas efectoras, tales como las trifosfatasa de guanosina inducibles por IFN (GTPasas), la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS) y la indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO)^{33,34}, las cuales conducen a vigorosas respuestas inmunitarias celulares autónomas^{35,36}, con supresión

del crecimiento y/o muerte del parásito dentro de las células infectadas³³⁻³⁶. El TNF- α también juega un papel fundamental en la respuesta protectora, particularmente en el cerebro^{14,15,37-39}, al disminuir la entrada del parásito a las células, detener su proliferación e inducir su muerte. La IL-10, por su parte, ejerce un efecto regulador, al prevenir la inmunopatología potencialmente letal^{22,23,31}. Así pues, el perfil de citocinas producido en respuesta a *T. gondii*, es crítico para lograr un control efectivo de la infección, pero sin causar daños al propio hospedador^{30,32}. En los experimentos descritos en este trabajo, los individuos seropositivos para *T. gondii*, pero seronegativos para VIH-1, produjeron cantidades significativamente mayores de IFN- γ , TNF- α e IL-10 en respuesta a los antígenos parasitarios, que los individuos seronegativos para *T. gondii* y VIH-1. Por lo tanto, la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-10, de acuerdo a los métodos aquí descritos, permite claramente distinguir entre la respuesta inmunitaria contra *T. gondii* de individuos asintomáticos seropositivos para este parásito y la de individuos seronegativos.

Por su parte, la IL-2 es importante para la función y regulación de los linfocitos T^{21,40,41} y su producción bajo estimulación con SATg, presentó correlaciones positivas con las producciones de IFN- γ y de TNF- α en los individuos seropositivos para *T. gondii*. Sin embargo, los pacientes infectados con VIH-1 y serología positiva para *T. gondii*, desde etapas tempranas/asintomáticas, produjeron cantidades significativamente menores de IL-2, TNF- α e IFN- γ en respuesta a los antígenos parasitarios que las del grupo seropositivo para *T. gondii*, pero seronegativos para VIH-1, lo cual relaciona a la infección por VIH-1 con alteraciones tempranas (además de las ya descritas en etapas avanzadas) en la respuesta contra *T. gondii*. Estas alteraciones tempranas podrían comprometer la capacidad de control de la infección latente^{13-18,37-39}, aumentando el riesgo de reactivación de la replicación parasitaria, aunque fuese de manera limitada^{42,43}, es decir, no

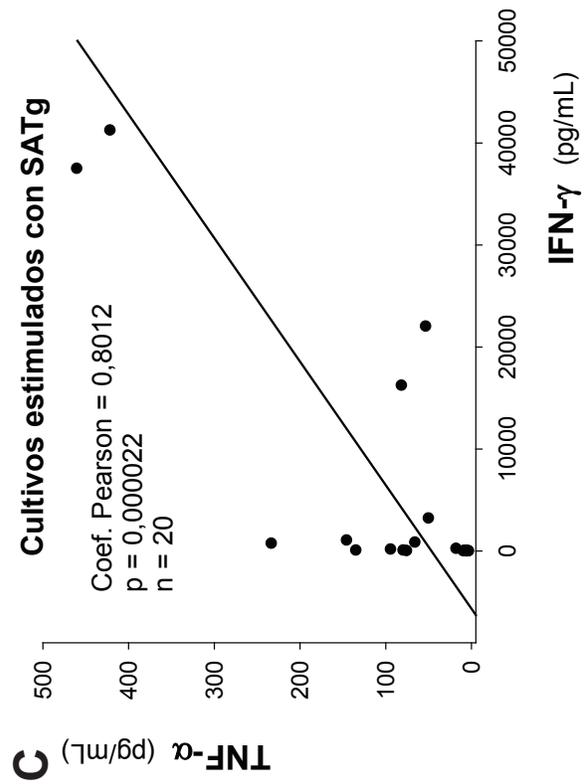
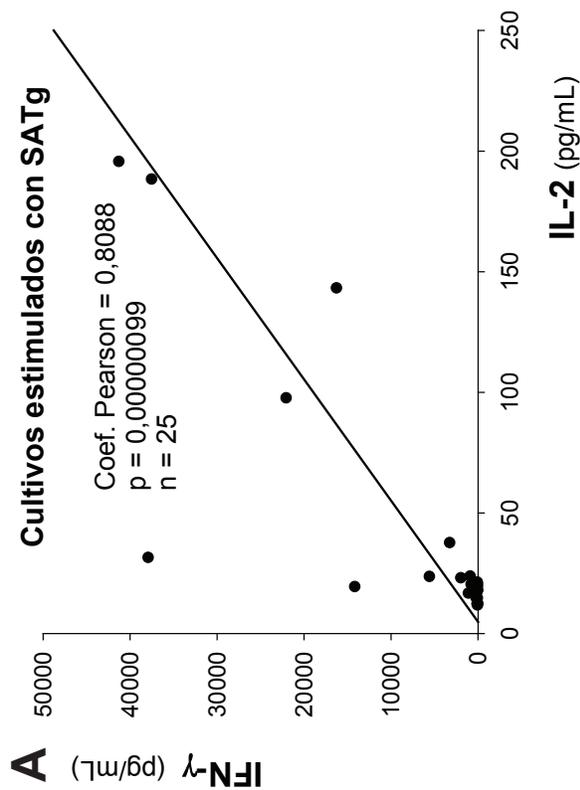
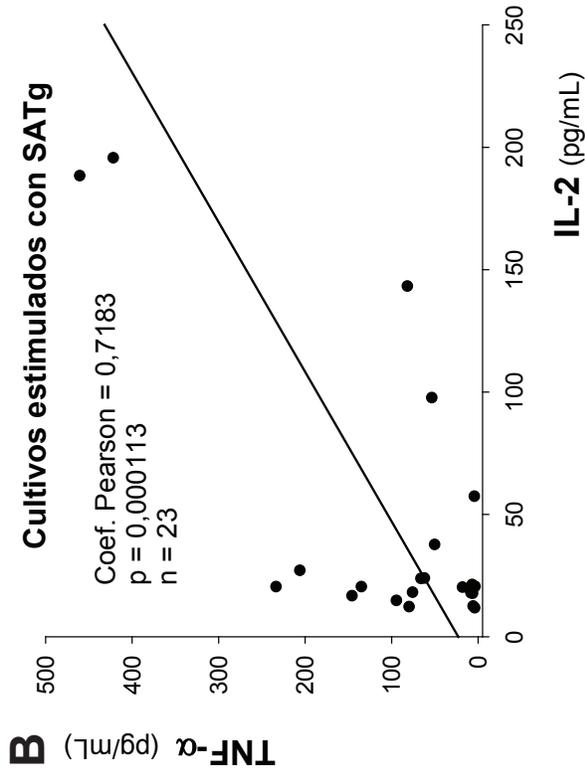


Fig. 2. Correlación entre Citocinas: Se muestran las correlaciones (Coeficiente de Pearson) entre las producciones de IFN- γ e IL-2 (A), TNF- α e IL-2 (B) y TNF- α e IFN- γ (C), bajo estimulación con SATg, en individuos seropositivos para *T. gondii*.

en una magnitud suficiente para producir encefalitis toxoplásmica (asociada sólo con etapas avanzadas de la infección por VIH-1), pero con la posibilidad de provocar daños acumulativos a nivel del SNC y de deteriorar las funciones neurocognitivas, incluso antes de llegar a etapas francamente sintomáticas. En congruencia con este razonamiento, la evaluación neurofisiológica de estos mismos grupos^{44, 45} evidenció que los pacientes infectados con VIH-1 y serología positiva para *T. gondii* presentaron deficiencias de la memoria a corto plazo^{46, 47}, del procesamiento cognitivo de estímulos visuales y auditivos^{48, 49} y de las funciones ejecutivas del lóbulo frontal^{50, 51}, significativamente mayores que las de los pacientes infectados con VIH-1 y serología negativa para *T. gondii*, desde etapas tempranas de la infección por VIH-1, sugiriendo que la neurotoxicidad está aumentada^{44, 45}, lo cual refuerza la relevancia que puede tener la pérdida gradual del control de tales infecciones latentes, al comprometer la función del sistema nervioso central, adicionalmente al deterioro que pueda generar el propio VIH-1^{52, 53}.

Con respecto a la IL-10, los resultados de este trabajo asociaron la infección por VIH-1 con producción “inespecífica”, ya que los pacientes infectados con VIH-1 y serología negativa para *T. gondii* la produjeron en respuesta a la estimulación con SATg; así como con producción “espontánea” en etapas tardías, pues este grupo produjo cantidades significativamente elevadas en cultivos sin estimulación. La IL-10 es una importante citocina reguladora^{54, 55}, cuya producción ha sido reportada como aumentada en pacientes infectados con VIH-1^{56, 57}. Este aumento se ha asociado con la inhibición de la respuesta específica contra el virus⁵⁶⁻⁵⁹, pero también con el control de la replicación viral⁶⁰⁻⁶², de manera que es difícil definir si el efecto de la IL-10 en la infección por VIH-1 es perjudicial o protector^{63, 64}. Existen diversos reportes de situaciones en las cuales la IL-10 puede presentar efectos estimuladores de la respuesta inmunitaria o pro-inflama-

torios^{65, 66}, y de otras circunstancias en las cuales se puede presentar una resistencia al efecto anti-inflamatorio de la IL-10^{65, 67}, todo lo cual hace más compleja la interpretación de la acción de la IL-10 en un contexto determinado.

Por otra parte, la infección por VIH-1 se asoció con mayor producción de TNF- α bajo estimulación con PHA, ya que todos los pacientes infectados con VIH-1 produjeron cantidades significativamente mayores que sus respectivos grupos controles sin infección por VIH-1, en esta condición de estimulación policlonal, lo cual asocia a la infección por VIH-1 con la inducción de un ambiente pro-inflamatorio⁶⁸. Es notable cómo la infección por VIH-1 puede estar asociada simultáneamente con el aumento en la producción de citocinas reguladoras (IL-10) y pro-inflamatorias (TNF- α), y cómo la co-infección con *T. gondii* puede aumentar la complejidad de esta red de citocinas⁶⁹.

También fue notable que los pacientes infectados con VIH-1 fuesen capaces de producir IFN- γ , TNF- α e IL-10 bajo estimulación con PHA, en todas las etapas de la infección viral, mostrando que mantenían esta capacidad, aun cuando presentaran defectos en la producción de estas citocinas en respuesta los antígenos parasitarios. De manera que, incluso en etapas avanzadas, los pacientes son capaces de responder con producción de citocinas dadas las condiciones apropiadas, lo cual es una oportunidad para la intervención terapéutica^{70, 71}.

Con relación a la IL-2, es importante recordar que esta citocina se produce muy rápido, es decir, pocos minutos después de la estimulación antigénica⁷². De manera que el hecho de que sólo el grupo seropositivo para *T. gondii*, pero seronegativo para VIH-1, presentara aumentos significativos en la concentración de IL-2 bajo estimulación con SATg, muestra que la producción fue lo suficientemente prolongada y/o lo suficientemente elevada como para ser detectada después de 72 horas de cultivo, mientras que la producción en los pacientes co-infectados no fue tan prolongada o tan elevada. Valdría la pena estudiar estas mismas respues-

tas inmunitarias en pacientes co-infectados tratados con medicamentos anti-*T. gondii*, a fin de evaluar si estos hallazgos se revierten, al menos parcialmente, con el tratamiento antiparasitario.

Así pues, desde etapas tempranas los pacientes co-infectados presentaron defectos en la producción de citocinas que podrían alterar el control de la replicación del parásito en el SNC, con la posibilidad de causar daños al tejido y deterioro de la función. El hecho de que en su evaluación neurocognitiva^{44, 45} estos mismos pacientes hayan presentado mayores defectos que aquellos con serología negativa para *T. gondii*, sugiere fuertemente una asociación entre los efectos tempranos sobre la respuesta inmunitaria y el aumento de las alteraciones neurocognitivas en los pacientes co-infectados, incluso en etapas “asintomáticas”. Estos resultados invitan a reconsiderar lo que es realmente la etapa “asintomática”. De hecho, varios grupos están reevaluando el concepto de que la infección crónica por *T. gondii* sea realmente “asintomática”, debido a la gran cantidad de evidencias que sugieren que esta está asociada con alteraciones neuropsiquiátricas y conductuales^{4, 73-76}. Más aún, los resultados de este trabajo enfatizan la importancia del diagnóstico temprano y el tratamiento precoz para preservar la integridad de la respuesta inmunitaria y evitar el deterioro del SNC y sus funciones⁷⁷⁻⁷⁹, y así mejorar la calidad de vida de los pacientes.

AGRADECIMIENTO

Varios miembros de nuestros laboratorios participaron en el desarrollo de este trabajo atendiendo a los pacientes, procesando y analizando muestras clínicas: Ydelys Fuentes, Riward Campelo, Alexandra Díaz, Josibel Camacho, Alexandra Rodríguez, Gustavo Rico, José Carrero, Edwin Díaz, Wolfgang Vivas y Eduardo Navarro.

Financiamiento

Este trabajo recibió financiamientos del FONACIT (G-2005000823) y del Insti-

tuto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC-2009000441). EEEG recibió becas doctorales del FONACIT y el IVIC. Las instituciones que financiaron el trabajo no tuvieron parte en el diseño del estudio, en la recolección y análisis de datos, en la decisión de publicar o en la preparación del manuscrito.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Contribución de los Autores

- Investigador principal y Supervisión: MAAD.
- Conceptualización y Metodología: MAAD, MEDQM, YBRD, BAN, EEEG.
- Recursos: BAN (SATg, selección de pacientes), YBRD (selección de pacientes), MAAD (selección de pacientes).
- Realización de los experimentos/Investigación: EEEG, MAAD.
- Análisis de Datos: EEEG, MAAD.
- Escritura - Preparación del manuscrito original: EEEG.
- Escritura - Revisión y edición del manuscrito: EEEG, MAAD, BAN, MEDQM, YBRD.

Número ORCID de los autores

- Edwin Eliel Escobar-Guevara: 000-0003-3093-5491
- María Esther de Quesada-Martínez: 0000-0003-2994-4788
- Yhajaira Beatriz Roldán-Dávila: 0000-0002-8742-1590
- Belkisyolé Alarcón de Noya: 0000-0002-3139-7480
- Miguel Antonio Alfonzo-Díaz: 0000-0002-3029-5191

REFERENCIAS

1. **Ferguson DJP.** *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(2): 133-148.
2. **Molan A, Nosaka K, Hunter M, Wang W.** Global status of *Toxoplasma gondii* infection: systematic review and prevalence snapshots. Trop Biomed 2019; 36(4): 898-925.
3. **Remington JS, Cavanaugh EN.** Isolation of the encysted form of *Toxoplasma gondii* from human skeletal muscle and brain. N Engl J Med 1965; 273(24):1308-10.
4. **Carruthers VB, Suzuki Y.** Effects of *Toxoplasma gondii* infection on the brain. Schizophr Bull 2007; 33(3):745-751.
5. **Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA.** Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev 1998; 11(2):267-299.
6. **Suzuki Y.** Immunopathogenesis of Cerebral Toxoplasmosis. J Infect Dis 2002; 186(Suppl 2):S234-240.
7. **Ghatak NR, Sawyer DR.** A morphologic study of opportunistic cerebral toxoplasmosis. Acta Neuropathol 1978; 42(3): 217-221.
8. **Halonen SK, Lyman WD, Chiu FC.** Growth and development of *Toxoplasma gondii* in human neurons and astrocytes. J Neuropathol Exp Neurol 1996; 55(11):1150-1156.
9. **Yarovinsky F.** Innate immunity to *Toxoplasma gondii* infection. Nat Rev Immunol 2014; 14:109-121.
10. **Lopez-Yglesias AH, Burger E, Camanzo E, Martin AT, Araujo AM, Kwok SF, Yarovinsky F.** T-bet dependent ILC1- and NK cell-derived IFN- γ mediates cDC1-dependent host resistance against *Toxoplasma gondii*. PLoS Pathog 2021; 17(1): e1008299.
11. **Gazzinelli RT, Hakim FT, Hieny S, Shearer GM, Sher A.** Synergistic role of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in IFN- γ production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. J Immunol 1991; 146(1):286-292.
12. **Gazzinelli R, Xu Y, Hieny S, Cheever A, Sher A.** Simultaneous depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii*. J Immunol 1992; 149(1):175-180.
13. **Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS.** Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. Science 1988; 240(4851):516-518.
14. **Langermans JA, Van der Hulst ME, Nibbering PH, Hiemstra PS, Fransen L, Van Furth R.** IFN- γ -induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . J Immunol 1992; 148(2):568-574.
15. **Gazzinelli RT, Eltoun I, Wynn TA, Sher A.** Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF- α and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. J Immunol 1993; 151(7):3672-3681.
16. **Bohne W, Heesemann J, Gross U.** Reduced replication of *Toxoplasma gondii* is necessary for induction of bradyzoite-specific antigens: a possible role for nitric oxide in triggering stage conversion. Infect Immun 1994; 62(5):1761-1767.
17. **Suzuki Y, Conley FK, Remington JS.** Importance of endogenous IFN- γ for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. J Immunol 1989; 143(6):2045-2050.
18. **Wang X, Kang H, Kikuchi T, Suzuki Y.** Gamma interferon production, but not perforin-mediated cytolytic activity, of T cells is required for prevention of toxoplasmic encephalitis in BALB/c mice genetically resistant to the disease. Infect Immun 2004; 72(8):4432-4438.
19. **Sturge CR, Felix Yarovinsky F.** Complex immune cell interplay in the gamma interferon response during *Toxoplasma gondii* infection. Infect Immun 2014; 82(8):3090-3097.
20. **Kang H, Suzuki Y.** Requirement of non-T cells that produce gamma interferon for prevention of reactivation of *Toxoplasma gondii* infection in the brain. Infect Immun 2001; 69(5):2920-2927.
21. **Kupz A, Pai S, Giacomini PR, Whan JA, Walker RA, Hammoudi PM, Smith NC, Miller CM.** Treatment of mice with S4B6 IL-2 complex prevents lethal toxoplasmosis via IL-12- and IL-18-dependent interferon- γ production by non-CD4 immune cells. Sci Rep 2020; 10(1):13115.

22. **Gazzinelli RT, Wysocka M, Hieny S, Schar-ton-Kersten T, Cheever A, Kühn R, Müller W, Trinchieri G, Sher A.** In the absence of endogenous IL-10, mice acutely infected with *Toxoplasma gondii* succumb to a lethal immune response dependent on CD4+ T cells and accompanied by overproduction of IL-12, IFN- γ and TNF- α . *J Immunol* 1996; 157(2):798-805.
23. **Wilson EH, Wille-Reece U, Dzierszynski F, Hunter CA.** A critical role for IL-10 in limiting inflammation during toxoplasmic encephalitis. *J Neuroimmunol* 2005; 165(1):63-74.
24. **Wang ZD, Liu HH, Ma ZX, Ma HY, Li ZY, Yang ZB, Zhu XQ, Xu B, Wei F, Liu Q.** *Toxoplasma gondii* infection in immunocompromised patients: A systematic review and meta-analysis. *Front Microbiol* 2017; 8:389.
25. **Wong SY, Remington JS.** Biology of *Toxoplasma gondii*. *AIDS* 1993; 7(3):299-316.
26. **Luft BJ, Remington JS.** AIDS commentary. Toxoplasmic encephalitis. *J Infect Dis* 1988; 157:1-6.
27. **Boasso A, Shearer GM, Chougnat C.** Immune dysregulation in human immunodeficiency virus infection: know it, fix it, prevent it? *J Intern Med* 2009; 265(1):78-96.
28. **De Boer RJ.** Time scales of CD4+ T cell depletion in HIV infection. *PLoS Med* 2007; 4(5):e193.
29. **Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA, Herzenberg LA.** CD8 naïve cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest* 1995; 95:2061-2066.
30. **Denkers EY, Gazzinelli RT.** Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(4): 569-588.
31. **Yap GS, Sher A.** Cell-mediated immunity to *Toxoplasma gondii*: initiation, regulation and effector function. *Immunobiology* 1999; 201(2):240-247.
32. **Tait ED, Christopher A, Hunter CA.** Advances in understanding immunity to *Toxoplasma gondii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(2):201-210.
33. **Sasai M, Pradipta A, Yamamoto M.** Host immune responses to *Toxoplasma gondii*. *Int Immunol* 2018; 30(3):113-119.
34. **Fisch D, Clough B, Frickel EM.** Human immunity to *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog* 2019; 15(12): e1008097.
35. **MacMicking JD.** Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* 2012; 12(5):367-82.
36. **Randow F, MacMicking JD, James LC.** Cellular self-defense: how cell-autonomous immunity protects against pathogens. *Science* 2013; 340(6133):701-706.
37. **Chao CC, Gekker G, Hu S, Peterson PK.** Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*. The role of cytokines. *J Immunol* 1994; 152(3):1246-1252.
38. **Däubener W, Remscheid C, Nockemann S, Pilz K, Seghrouchni S, Mackenzie C, Hadding U.** Anti-parasitic effector mechanisms in human brain tumor cells: role of interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Eur J Immunol* 1996; 26(2):487-492.
39. **Janssen R, van Wengen A, Verhard E, De Boer T, Zomerdijk T, Ottenhoff THM, Van Dissel JT.** Divergent role for TNF- α in IFN- γ -induced killing of *Toxoplasma gondii* and *Salmonella typhimurium* contributes to selective susceptibility in patients with partial IFN- γ receptor 1 deficiency. *J Immunol* 2002; 169(7):3900-3907.
40. **Ross SH, Cantrell DA.** Signaling and function of IL-2 in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2018; 36:411-433.
41. **Bachmann MF, Oxenius A.** Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep* 2007; 8(12):1142-1148.
42. **Escobar Guevara EE, Alfonso Díaz MA, Fernández-Mestre M, Camacho Velásquez JC, Roldán Dávila YB, Alarcón de Noya B, De Quesada ME.** HIV/*Toxoplasma gondii* co-infected patients produce lower levels of IFN- γ in response to *T. gondii* antigens, even in the asymptomatic stage of viral infection. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Cape Town 2009; Abstract no. WELBA104. ([http://www.iasociety.org/Default.aspx? pageId=11&abstractId=200722748](http://www.iasociety.org/Default.aspx?pageId=11&abstractId=200722748)).
43. **Escobar-Guevara EE, Alfonso-Díaz MA, Camacho-Velásquez JC, Roldán-Dávila YB, Alarcón de Noya B.** HIV/*Toxoplasma gondii*

- coinfectad patients modify their IL-2 and IL-10 production in response to *T. gondii* and HIV antigens, even in the early stage of viral infection. 9th Latin American Congress of Immunology, Chile 2009; Abstract No. 354.
44. **De Quesada ME, Marín H, Fuentes Alvarado YJ, Escobar Guevara EE, Roldán Dávila YB, Alfonzo Díaz MA.** Disorders on attention, short-term memory and executive functions in HIV/*Toxoplasma gondii* co-infected patients, in the asymptomatic stage of viral infection. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome 2011; Abstract no. CDB224. (<http://www.iasociety.org/Default.aspx?pageId=11&abstractId=200742783>).
 45. **De Quesada ME, Fuentes Alvarado YJ, Marín H, Escobar Guevara EE, Roldán Dávila YB, Alfonzo Díaz MA.** Visual and auditory event related potentials in HIV/*Toxoplasma gondii* co-infected patients, in the asymptomatic stage of viral infection. 6th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention, Rome 2011; Abstract no. CDB225. (<http://www.iasociety.org/Default.aspx?pageId=11&abstractId=200742799>).
 46. **Sternberg S.** High-speed scanning in human memory. *Science* 1966; 153: 652-654.
 47. **Sternberg S.** In defence of high-speed memory scanning. *Q J Exp Psychol* 2016; 69(10):2020-2075.
 48. **Picton TW.** The P300 wave of the human event related potencial. *Clin Neurophysiol* 1992; 1030 9(1):456-479.
 49. **Polich J.** P300 clinical utility and control of variability. *J Clin Neurophysiol* 1998; 15(1):14-33.
 50. **Berg EA.** A simple objective technique for measuring flexibility in thinking. *J Gen Psychol* 1948; 39:15-22.
 51. **Grant DA, Berg EA.** A behavioral analysis of degree of reinforcement and ease of shifting to new responses in a Weigl-type card-sorting problem. *J Exp Psychol* 1948; 38: 404-411.
 52. **Gabuzda DH, Hirsch MS.** Neurologic manifestations of infection with human immunodeficiency virus. Clinical features and pathogenesis. *Ann Intern Med* 1987; 107(3):383-391.
 53. **González-Scarano F, Martín-García J.** The neuropathogenesis of AIDS. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 69-81.
 54. **Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.
 55. **Couper KN, Blount DG, Riley EM.** IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008; 180(9):5771-5777.
 56. **Brockman MA, Kwon DS, Tighe DP, Pavlik DF, Rosato PC, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring MT, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh DG, Walker BD, Kaufmann DE.** IL-10 is up-regulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood*. 2009; 114(2):346-356.
 57. **Bahraoui E, Briant L, Chazal N.** E5564 inhibits immunosuppressive cytokine IL-10 induction promoted by HIV-1 Tat protein. *Virology* 2014, 11:214.
 58. **Clerici, M, Wynn TA, Berzofsky JA, Blatt SP, Hendrix CW, Sher A, Coffman RL, Shearer GM.** Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 1994; 93:768-775.
 59. **Taufik Y, Lantz O, Wallon C, Charles A, Dussaix E, Delfraissy JF.** Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10-mediated effect. *Blood* 1997; 89(8):2842-2848.
 60. **Andrade RM, Lima PG, Filho RG, Hygino J, Milczanowski SF, Andrade AF, Lauria C, Brindeiro R, Tanuri A, Bento CA.** Interleukin-10-secreting CD4 cells from aged patients with AIDS decrease in-vitro HIV replication and tumour necrosis factor alpha production. *AIDS* 2007; 21(13):1763-1770.
 61. **Bento CA, Hygino J, Andrade RM, Sara-mago CS, Silva RG, Silva AA, Linhares UC, Brindeiro R, Tanuri A, Rosenzweig M, Klatzmann D, Andrade AF.** IL-10-secreting T cells from HIV-infected pregnant women downregulate HIV-1 replication: effect enhanced by antiretroviral treatment. *AIDS* 2009; 23(1):9-18.
 62. **Arias JF, Nishihara R, Bala M, Ikuta K.** High systemic levels of interleukin-10, interleukin-22 and C-reactive protein in Indian patients are associated with low in vitro replication of HIV-1 subtype C viruses. *Retrovirology* 2010; 7:15.

63. **Kwon DS, Kaufmann DE.** Protective and detrimental roles of IL-10 in HIV pathogenesis. *Eur Cytokine Netw* 2010; 21:208–214.
64. **Fourman LT, Saylor CF, Cheru L, Fitch K, Looby S, Keller K, Robinson JA, Hoffmann U, Lu MT, Burdo T, Lo J.** Anti-inflammatory interleukin 10 inversely relates to coronary atherosclerosis in persons with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2020; 221:510–515.
65. **Islam H, Chamberlain TC, Mui AL, Little JP.** Elevated interleukin-10 levels in COVID-19: Potentiation of pro-inflammatory responses or impaired anti-inflammatory action? *Front Immunol* 2021; 12:677008.
66. **Lu L, Zhang H, Dauphars DJ, He Y-W.** A potential role of interleukin 10 in COVID-19 pathogenesis. *Trends Immunol* 2021; 42:3–5.
67. **Barry JC, Shakibakho S, Durrer C, Simtchouk S, Jawanda KK, Cheung ST, Mui AL, Little JP.** Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in Type 2 Diabetes. *Sci Rep* 2016; 6:21244.
68. **Escobar-Guevara E, Alfonzo-Díaz M.** HIV induces a pro-inflammatory/neurotoxic response in primary cultures of nervous cells, even without infection. Symposium “30 Years of HIV Science: Imagine the Future”, Institute Pasteur, 2013; Abstract No. 70/14PS. (<http://www.30yearshiv.org/Images/Public/30Y-HIV2013-Abstract-book.pdf>).
69. **Escobar EE, Alfonzo MA.** A more pro-inflammatory environment is generated in nervous cells cultures in the simultaneous presence of HIV-1 and *Toxoplasma gondii*, even with a lower parasite replication. *Front Immunol* 2013; Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.01122. (http://www.frontiersin.org/10.3389/conf.fimmu.2013.02.01122/event_abstract)
70. **Landay AL, Clerici M, Hashemi F, Kessler H, Berzofsky JA, Shearer GM.** In vitro restoration of T cell immune function in human immunodeficiency virus-positive persons: effects of interleukin (IL)-12 and anti-IL-10. *J Infect Dis* 1996; 173:1085–1091.
71. **Porichis F, Hart MG, Zupkosky J, Barblu L, Kwon DS, McMullen A, Brennan T, Ahmed R, Freeman GJ, Kavanagh DG, Kaufmann DE.** Differential impact of PD-1 and/or interleukin-10 blockade on HIV-1 specific CD4 T cell and antigen-presenting cell functions. *J Virol* 2014; 88(5):2508–2518.
72. **Sojka DK, Bruniquel D, Shwartz RH, Singh NJ.** IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J Immunol* 2004; 172(10):6136–6143.
73. **Dickerson F, Boronow J, Stallings C, Origoni A, Yolken R.** *Toxoplasma gondii* in individuals with schizophrenia: association with clinical and demographic factors and with mortality. *Schizophr Bull* 2007; 33(3):737–740.
74. **Flegr J.** Effects of *toxoplasma* on human behavior. *Schizophr Bull* 2007; 33(3):757–760.
75. **Flegr J.** How and why toxoplasma makes us crazy. *Trends Parasitol* 2013; 29:156–163.
76. **Milne G, Webster JP, Walker M.** *Toxoplasma gondii*: An Underestimated Threat? *Trends Parasitol* 2020; 36(12): 959–969.
77. **Chang L, Ernst T, Leonido-Yee M, Witt M, Speck O, Walot I, Miller EN.** Highly active antiretroviral therapy reverses brain metabolite abnormalities in mild HIV dementia. *Neurol* 1999; 53(4):782–789.
78. **Selnes OA.** Memory loss in persons with HIV/AIDS: assessment and strategies for coping. *AIDS Read* 2005; 15(6):289–292, 294.
79. **Wright MJ, Woo E, Foley J, Etenhofer ML, Cottingham ME, Gooding AL, Jang J, Kim MS, Castellon SA, Miller EN, Hinkin CH.** Antiretroviral adherence and the nature of HIV-associated verbal memory impairment. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2011; 23(3): 324–331.