



**PERFIL DE INTERLEUCINAS Y SU RELACIÓN CON LOS LINFOCITOS T CD4⁺
CD25^{hi} EN SANGRE Y PULMÓN DE PACIENTES PORTADORES DEL VIRUS DE
INMUNODEFICIENCIA HUMANA**

**Joanna Santeliz Casavilca¹, Yelitza Vega de Lo Presti², Ivy Contreras Villamizar²,
Maryalejandra Mendoza de Sifontes², Fanny Ochoa Ochoa², Lérica Borges³,
Elis Mosquera¹, William López¹, Jose Angel Cova³**

- 1. Departamento de Ciencias Funcionales, Sección de Fisiología, Decanato de Ciencias de la Salud, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), Barquisimeto, Venezuela**
- 2. Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA), Mérida, Venezuela**
- 3. Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de los Andes (ULA), Mérida, Venezuela**

Autor Corresponsal: Joanna Santeliz Casavilca¹ Avenida Libertador con Avenida Andrés Bello, Decanato de Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Funcionales, Sección de Fisiología, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto, estado Lara, Venezuela, 3001A

Email: jsanteliz@ucla.edu.ve

RESUMEN

Las enfermedades respiratorias en pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) son frecuentes y particularmente severas. Los linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}$ (Tregs) representan una subpoblación de linfocitos T $CD4^+$ cuya función primordial es el mantenimiento de la homeostasis y tolerancia inmune. Se realizó una investigación de corte transversal observacional para evaluar la relación entre variables tales como carga viral, uso de terapia antiretroviral de gran actividad, perfil de interleucinas y frecuencia de linfocitos T reguladores en sangre periférica y pulmón de pacientes portadores de VIH/SIDA. Los linfocitos T $CD4^+CD25^{hi}$ representaron aproximadamente el 5% y el 12% del total de linfocitos T $CD4^+$ en sangre y lavado broncoalveolar (LBA), respectivamente. Se observó una asociación entre el porcentaje de linfocitos T $CD4^+$, el cociente $CD4/CD8$ y el porcentaje de linfocitos T $CD4^+CD25^{hi}$ en el lavado broncoalveolar así como con el porcentaje de linfocitos que expresan el marcador intracelular FoxP3. Hubo una asociación entre carga viral, número y porcentaje de linfocitos T $CD4^+CD25^{hi}$ en sangre. No se observó una correlación entre el uso de terapia antiretroviral de gran actividad y frecuencia de Tregs. Se observó una asociación entre la concentración de IL-10, carga viral y linfocitos T $CD4^+CD25^{hi}$ en sangre pero no en LBA. Los resultados demuestran que el aumento de linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}$ en el pulmón de pacientes VIH se asocia a concentraciones más bajas de IL-10 e IL-12 y más elevadas de IL-17 y $TGF\beta_1$ en lavado broncoalveolar en comparación con sangre periférica.

PALABRAS CLAVE: VIH, linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}$, interleucinas, lavado broncoalveolar, IL-10, pulmón.



INTERLEUKINS PROFILE AND ITS RELATIONSHIP WITH CD4 + CD25^{hi} T LOS LINFOCITOS IN LUNG PATIENTS BLOOD AND CARRIERS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS

ABSTRACT

Respiratory diseases in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) are common and particularly severe. T regulatory CD4⁺CD25^{hi} lymphocytes (Tregs) are a small population of T CD4⁺ lymphocytes whose primary function is the maintenance of immune homeostasis and tolerance. We conducted a cross sectional observational study to evaluate the relationship between variables such as viral load, use of high active antiretroviral therapy, interleukin profile and frequency of T regulatory lymphocytes in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid of HIV/AIDS patients. The results show that T CD4⁺CD25^{hi} lymphocytes represent approximately 5% and 12% of the total T CD4⁺ population in peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid, respectively. A positive correlation was observed between the percentage of T CD4⁺ lymphocytes, CD4/CD8 ratio and the percentage of T CD4⁺CD25^{hi} in bronchoalveolar lavage fluid and also with the percentage of lymphocytes that express the intracellular marker FoxP3. An association between viral load, number and percentage of T CD4⁺CD25^{hi} lymphocytes in blood was observed. No association was observed between high active antiretroviral treatment use and frequency of Tregs. We observed a correlation between the concentration of IL-10, viral load and T CD4⁺CD25^{hi} lymphocytes in blood but not in bronchoalveolar lavage fluid. Our results show that the increase number of T regulatory CD4⁺CD25^{hi} lymphocytes in lungs of HIV patients is associated with lower concentrations of IL-10 and IL-12 and higher concentrations of IL-17 and TGFβ₁ in bronchoalveolar lavage fluid compared to peripheral blood.

KEYWORDS: HIV, T CD4⁺CD25^{hi} lymphocytes, interleukins, bronchoalveolar lavage fluid, IL-10, lung.

INTRODUCCIÓN

El pulmón es el órgano más comúnmente afectado en pacientes portadores de VIH/SIDA. La mayor parte de los pacientes VIH desarrollan alguna complicación pulmonar en el curso de su enfermedad. El espectro de enfermedades respiratorias en estos pacientes incluye condiciones asociadas con el VIH tales como infecciones oportunistas y neoplasias y condiciones no asociadas a la infección tales como EPOC, asma, hipertensión pulmonar entre otras (1).

El VIH causa una alteración en el funcionamiento del sistema inmune en el pulmón. Por ejemplo, se sabe que el virus es capaz de infectar macrófagos y linfocitos de las vías aéreas y este hecho pareciera ser crucial en la patogénesis de la enfermedad. De la misma forma, los linfocitos infectados pueden convertirse en reservorios del virus dentro del pulmón(2). Al igual que como ocurre en el resto de los tejidos, se observa

una depleción de linfocitos T CD4⁺ en el tejido linfoide asociado a mucosa bronquial (BALT, por sus siglas en inglés) con una aparente preservación de los linfocitos T CD4⁺ alveolares. A esta depleción se asocia una infiltración de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos VIH-específicos los cuales, en fases más tardías de la infección, son progresivamente sustituidos por linfocitos T CD8⁺ supresores en el alveolo como en el espacio intersticial (3). Asociada a la afectación de la inmunidad celular, hay una disfunción de la inmunidad mediada por linfocitos B caracterizada por una caída en la producción de anticuerpos antígeno-específicos en el pulmón (4). Alteraciones en la función mucociliar y en la producción de moléculas solubles de defensa también han sido descritas en estos pacientes (5). Más aun, la infección por el VIH induce una activación persistente y crónica de células y mediadores inflamatorios tales como IFN γ , TNF α y MCP-1(6).

En 1995, Sakaguchi y colaboradores demostraron que un subgrupo de linfocitos T CD4⁺ que expresaban constitutivamente la cadena α del receptor de IL-2 (CD25) tenían potentes propiedades inmunomodulatorias *in vitro* e *in vivo*(7). Estas células, denominadas linfocitos T reguladores (Tregs), se caracterizan por la elevada expresión del marcador de superficie CD25 y del factor de transcripción intracelular Forkhead box P3 (FoxP3)(8). Asimismo, estas células coexpresan otros marcadores asociados a funciones regulatorias tales como CTLA-4 y miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral GITR y Ox40 (9).

Los linfocitos T reguladores juegan un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la respuesta inmune. Por ejemplo, los Tregs regulan la respuesta inmune en infecciones producidas por *P. jirovecii*, *Leishmania sp.*, *Plasmodium sp.*, *C. albicans*, *M. tuberculosis*, virus del herpes simple y de la hepatitis C, entre otros(10). Por otra parte, diversos estudios

han demostrado que los Tregs suprimen la inmunidad celular mediada por linfocitos T contra tumores(11, 12) lo cual ha permitido diseñar estrategias terapéuticas para inhibir la función de éstas células en pacientes con cáncer(13). Adicionalmente, la ausencia de Tregs se ha asociado con el desarrollo de diversas enfermedades autoinmunes tanto en animales como en humanos(14, 15).

De particular interés es la aparente dualidad del rol de los linfocitos T reguladores en la infección por el VIH. Por una parte, el efecto beneficioso de los Tregs ocurre a través de la supresión de la activación inmune crónica característica de la infección por VIH (16). Asimismo, se ha descrito un efecto deletéreo de estas células a través de la inhibición de las respuestas inmunes dirigidas específicamente al virus (17). A pesar de que en los últimos años hay una plétora de información acerca del tema, el papel preciso que estas células juegan en la patogénesis de la interacción VIH-pulmón aún está por dilucidar. Este estudio fue realizado con la finalidad de evaluar la



relación entre diversas variables tales como carga viral, uso de terapia antiretroviral de gran actividad, producción de interleucinas y frecuencia de linfocitos T reguladores tanto en sangre periférica como en pulmón en pacientes portadores de VIH/SIDA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Previa evaluación y aprobación por la Comisión de Bioética del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes (IAHULA, Mérida, estado Mérida) se incluyeron 35 pacientes mayores de 18 años de edad seropositivos para el virus VIH-1 que acudieron a la consulta externa del Programa VIH/SIDA o al Servicio de Neumonología y Cirugía de Tórax de dicho hospital por presentar síntomas respiratorios. Posterior a la firma del consentimiento informado se procedió a recolectar 5 cc de sangre venosa del brazo derecho y a la realización de broncoscopia flexible con la finalidad de obtener muestras respiratorias siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana del Tórax (ATS) y de la Sociedad Respiratoria Europea

(ERS)(18, 19). Brevemente, después de la premedicación con atropina (0.5 mg IM) y diazepam (10 mg IM) se introdujo por vía oral un broncoscopio Olympus BF tipo P10 (Pennsylvania, USA) y se procedió a anestesiar la laringe y las cuerdas vocales con lidocaína al 2%. Se instilaron alícuotas de 5 ml de solución salina estéril a temperatura corporal (37°C) en cada lóbulo pulmonar los cuales fueron inmediatamente aspiradas a una presión negativa de 5 a 120 mmHg y recolectadas en trampas de Lukens. Se realizó cultivo bacteriológico y micológico del lavado broncoalveolar. El cultivo bacteriológico se consideró positivo si se detectó crecimiento de más de 10.000 UFC/ml de lavado broncoalveolar. Se realizó biopsia transbronquial bajo visión directa del área afectada y las muestras fueron colocadas en una solución de formalina al 10% para su ulterior procesamiento histológico y su coloración con Hematoxilina-Eosina, Ácido Periódico de Schiff (PAS), Tricrómico y Ziehl Neelsen. Se utilizó la coloración de Metenamina de Plata (Grocott) para la

Recibido: 12-03-2015

Aceptado: 3-06-2015

identificación histopatológica de hongos.

Citometría de flujo para la fenotipificación de linfocitos CD3⁺/CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD25^{hi} en sangre periférica y CD4⁺CD25^{hi}FOXP3⁺ en lavado broncoalveolar

La determinación de los marcadores extracelulares CD4, CD8 y CD25 se realizó según protocolo descrito anteriormente (20). Brevemente, 100µl de sangre venosa heparinizada y de lavado broncoalveolar se mezclaron por separado con 10 µl de MultiMix Mouse anti Human CD8FITC + CD4RPE + CD3RPE-Cy5 (DAKO, USA). En un segundo tubo contentivo de 100µl de sangre venosa heparinizada y de lavado broncoalveolar, se añadieron (por separado) los anticuerpos Mouse Anti-Human CD4/RPE (DAKO R0805) y Mouse Anti-Human CD25/FITC (DAKO F0801). Para la determinación de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ en el lavado broncoalveolar, se permeabilizaron los linfocitos con una solución de IntraPrepTM Permeabilization Reagent (DAKO, USA),

se añadió el anticuerpo anti-Human Foxp3 PerCP-Cy5.5 PCH 101 (eBioscience, USA) procediendo a su fijación con formaldehído para el análisis por citometría de flujo utilizando un citómetro FACSort (Becton Dickinson, USA). Se realizó un gráfico CD4 versus Side Scatter (SSC), seleccionando la región de células positivas para el marcador CD4 y en un segundo gráfico CD4 versus CD25, se analizaron las células que coexpresaban el doble marcador CD4 y CD25^{high}. En un segundo gráfico FOXP3 versus CD25, se analizaron las células que coexpresaban el doble marcador FoxP3 y CD25^{hi}. Se analizaron 10.000 eventos por tubo utilizando el CellQuest software (Becton Dickinson, USA). Los resultados son expresados en porcentajes de CD4⁺CD25^{high} y CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ del total de linfocitos CD4⁺.

Determinación de las interleucinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 y TGFβ₁ en sangre y lavado broncoalveolar

Los niveles de las interleucinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17 y TGFβ₁ en sangre y lavado

Recibido: 12-03-2015

Aceptado: 3-06-2015

broncoalveolar fueron determinados a través del método de ELISA según las recomendaciones del fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Las muestras fueron evaluadas en duplicados y las concentraciones de las diferentes interleucinas se determinaron a través de una curva estándar. El límite de detección para las interleucinas IL-4, IL-12, IL-17 y TGF β ₁ es de 31.2 pg/ml y para la IL-10 es de 7.8 pg/ml.

Determinación del ARN del VIH-1 en plasma

La cuantificación directa del ARN del VIH-1 en el plasma se realizó utilizando el VERSANT HIV-1 RNA 3.0 Assay (SIEMENS) según protocolo descrito anteriormente (21). Las concentraciones de ARN VIH-1 se determinaron a través de una curva estándar. El límite de detección es de 35 copias de ARN VIH-1/mL.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como media \pm error típico de la media de los datos

obtenidos. Las correlaciones se realizaron utilizando la prueba de correlación de Spearman. La comparación entre grupos se realizó utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La comparación de las muestras pareadas se realizó utilizando la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Una $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativa. El análisis de los resultados se realizó utilizando el paquete estadístico IBM SPSS 20.0 para Windows.

RESULTADOS

Características demográficas de la población en estudio

Las características demográficas y clínicas de los treinta y cinco pacientes incluidos en este estudio se muestran en la Tabla 1. En relación a la forma de contagio, 22 pacientes (62.8%) reportaron contagio por contacto heterosexual, 11 pacientes (31.4%) por contacto homosexual y 2 pacientes (5.7%) por vía transfusional. En relación a la sintomatología respiratoria, 91.6% de los

pacientes presentaban tos, 75% presentaban disnea en reposo y 50% reportaron dolor torácico. Con respecto al uso de terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), sólo 37% de los participantes la recibían. Al analizar la respuesta virológica e inmunológica en los pacientes que recibieron TARGA, 68.75% se consideraron respondedores inmunológicos (RI), es decir, mostraron supresión virológica y restauración del número de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica, mientras que 31.25% se consideraron no respondedores (NRI). Consecuentemente, los pacientes no

respondedores presentaron cocientes CD4/CD8 muy disminuidos comparados con los pacientes respondedores. Con respecto a la subpoblación de linfocitos T CD8⁺, hubo una tendencia a observar un mayor número de estos linfocitos en los RI. El tiempo de uso de TARGA no fue significativamente diferente entre ambos grupos sin embargo se observó que los RI tendían a tener mayor tiempo recibiendo tratamiento antiviral. Para el momento de participación en el estudio, ningún paciente recibía profilaxis para *P. jirovecii* o *M. tuberculosis*.

Tabla 1. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes incluidos en el estudio

	Respondedores (n=11)	No Respondedores (n=6)	Sin TARGA (n=18)	p
Edad (años)	45.8 ± 4.2	33.1 ± 4.6	36.7 ± 2	p = 0.04
% Femenino/Masculino	18.9/81.1	0/100	22.3/77.7	NA
CD4 ⁺ (células/mm ³)	563 ± 73	68 ± 23	287 ± 65	p = 0.001
CD8 ⁺ (células/mm ³)	1053 ± 116	584 ± 152	834 ± 160	p = 0.26
Relación CD4/CD8	0.59 ± 0.09	0.10 ± 0.03	0.47 ± 0.14	p = 0.02
Categoría CDC	20% C, 5.6% A1, 5.6% A2	11.4% C, 5.6% B3	40% C, 2.8% A1, 5.6% B1, 2.8% B3	NA

Carga viral (copias/ml)	1.031 ± 731	96.872 ± 32.577	122.803 ± 45.233	p = 0.002
-------------------------	-------------	-----------------	------------------	-----------

*Los resultados son expresados como la media ± error estándar de la media. Los grupos fueron comparados mediante el test de Kruskal-Wallis. NA = no aplicable

Niveles de linfocitos T CD3⁺/CD4⁺ y linfocitos T CD4⁺/CD25^{hi} en sangre periférica y LBA

Para caracterizar los linfocitos T CD4⁺CD25^{hi}, se determinó primeramente el porcentaje de éstos en sangre periférica el cual fue de 5.1% ± 0.8% con respecto al total de la población de linfocitos T CD4⁺. Al evaluar el compartimiento pulmonar, se observó que el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que presentaban el marcador CD25^{hi} en el lavado broncoalveolar fue en promedio de 12.4% ± 1.7% (Figura 1, p=0.002). No se observó una correlación entre el número y

porcentaje de linfocitos T CD4⁺, relación CD4/CD8 y linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en sangre (R=-0.02, p=0.91), sin embargo lo contrario ocurrió en el compartimiento pulmonar donde se observó una correlación positiva entre el porcentaje de células T CD4⁺ y T CD4⁺CD25^{hi} (R=0.668, p=0.001) (Figura 2) así como con la relación CD4/CD8 (R=0.594, p=0.001). Asimismo, se observó una correlación francamente positiva entre la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} y aquellos que concomitantemente expresan el marcador intracelular FoxP3 (R=0.895, p=0.001).

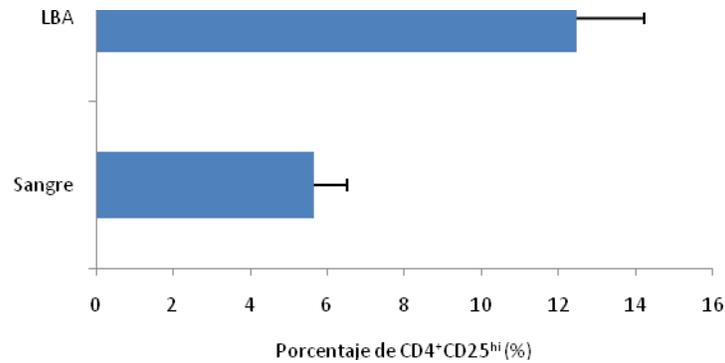


Figura 1. Linfocitos TCD4⁺CD25^{hi} en sangre y lavado broncoalveolar en pacientes VIH

Al estudiar la asociación entre carga viral y linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en sangre se observó que tanto el número absoluto de linfocitos (Figura 3) como el porcentaje en relación al total de linfocitos CD4⁺ estuvo

altamente correlacionada con la carga viral ($R=1,00$; $p=0,01$ para CD4⁺CD25^{hi} y $R=0,81$; $p=0,00$ para %CD4⁺CD25^{hi}). Dicha asociación $p=0,002$ no se observó en el lavado broncoalveolar ($R=-0,014$, $p=0,93$).

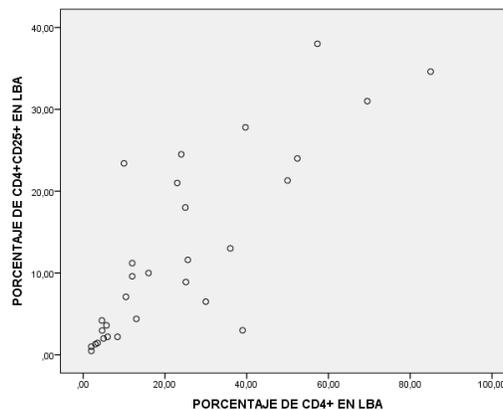


Figura 2. Correlación entre porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y T CD4⁺CD25^{hi} en lavado broncoalveolar en pacientes VIH

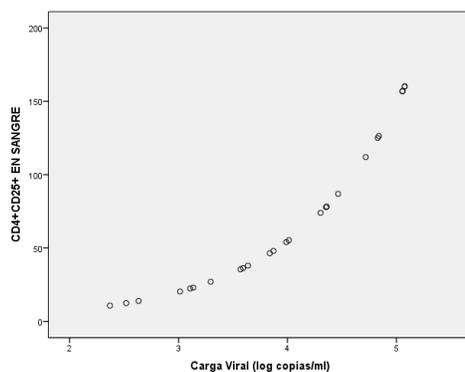


Figura 3. Correlación entre el número de linfocitos T CD4⁺ y CD4⁺CD25^{hi} en sangre y carga viral en pacientes VIH

Al analizar la relación entre uso de terapia antiretroviral de gran actividad (TARGA) y recuento absoluto de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en sangre no se observó asociación estadísticamente significativa entre ambas variables (63.75 ± 15.2 células/ μ l en pacientes sin TARGA vs 62.68 ± 14.05 células/ μ l en pacientes con TARGA, $p= 0.716$) sin embargo los pacientes sin terapia antiviral mostraron los valores más bajos de linfocitos Tregs particularmente en el lavado broncoalveolar. El uso de TARGA

tampoco se correlacionó con cambios en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} ($12.34\% \pm 2.46\%$ en pacientes sin TARGA vs $12.67\% \pm 2.55\%$ en pacientes con TARGA, $p= 0.59$) en el lavado broncoalveolar. Asimismo, el número de linfocitos CD4⁺CD25^{hi} fue independiente de la respuesta inmunológica a la terapia antiretroviral aun cuando hubo una tendencia a observar un mayor número y porcentaje de estas células en pacientes no respondedores (Tabla 2).

Tabla 2. Relación entre respuesta inmunológica a la TARGA y el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en sangre y lavado bronchoalveolar en pacientes VIH

	Respondedores (n=11)	No Respondedores (n=6)	Sin TARGA (n=18)	p value
Porcentaje de linfocitos T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} en sangre	5.04 ± 1.42	7.47 ± 2.27	5.22 ± 1.32	p = 0.6
Porcentaje de linfocitos T CD4 ⁺ CD25 ^{hi} en lavado broncoalveolar	13.14 ± 3.24	17.4 ± 3.87	10.41 ± 1.47	p = 0.36

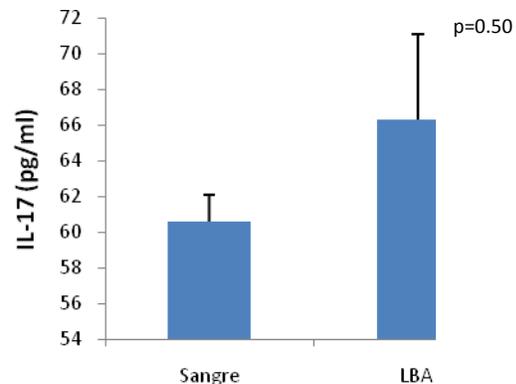
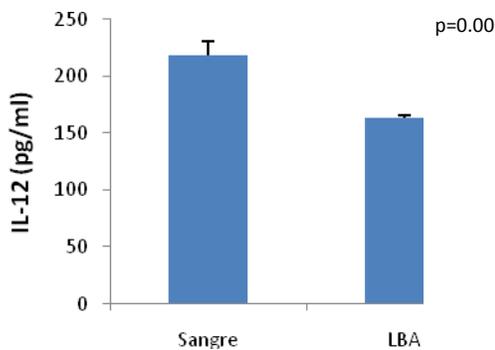
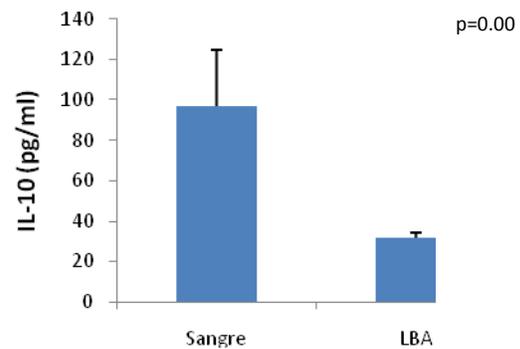
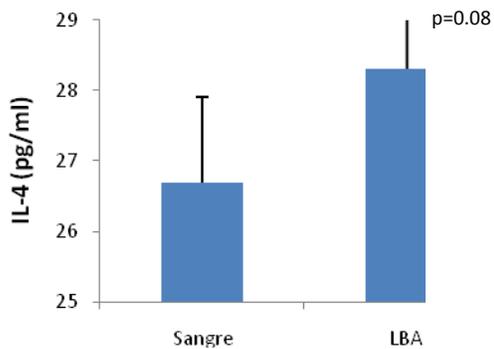
Niveles de interleucinas en sangre periférica y LBA de pacientes VIH

El perfil de interleucinas en los pacientes estudiados se observa en la Figura 4. Comparativamente, los pacientes presentaron concentraciones más elevadas de IL-10 e IL-12 en sangre periférica y de TGFβ₁ en el lavado broncoalveolar. Por otra parte, sólo los niveles de IL-10 en sangre periférica se correlacionaron con la carga viral (R=0,37, p=0.02). En pacientes que recibían TARGA, los no respondedores presentaron niveles elevados de IL-10 en sangre en comparación con pacientes

respondedores (252 ± 134 pg/ml vs 62 ± 22 pg/ml, p=0.04). La concentración de IL-10 en sangre periférica se asoció al número absoluto de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en sangre y con el cociente porcentual CD4⁺CD25^{hi}(sangre)/CD4⁺CD25^{hi}(LBA) (R=0.437, p=0.03). Esta asociación no fue observada en el lavado broncoalveolar. Asimismo, se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en el lavado broncoalveolar y la concentración de IL-17 en sangre (R=0.362, p=0.03). Dicha asociación no fue observada con respecto a la concentración de IL-17 en el LBA (R=0.05, p=0.74). Hubo

una correlación negativa entre el cociente porcentual $CD4^+CD25^{hi}(\text{sangre})/CD4^+CD25^{hi}(\text{LBA})$ y el cociente IL-17 sangre/IL-17 LBA ($R=-0.451$, $p=0.02$). No fueron observadas

asociaciones entre los linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}$ y las otras interleucinas evaluadas.



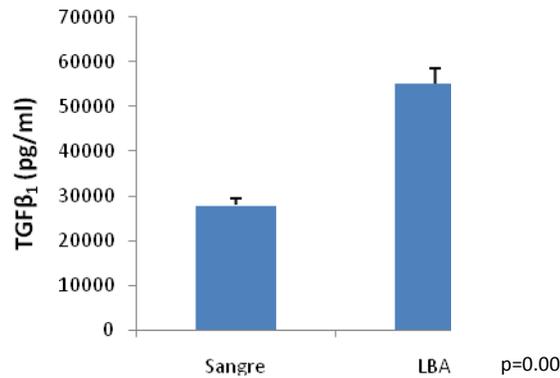


Figura 4. Niveles de interleucinas en sangre y lavado broncoalveolar en pacientes VIH

DISCUSIÓN

Los linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} representan una pequeña subpoblación (entre 5% a 10%) del total de linfocitos T CD4⁺ con competencias modulatorias sobre la homeostasis y la activación inmune por lo cual reciben el nombre de linfocitos T reguladores. Alteraciones cuantitativas y cualitativas de este grupo de linfocitos se han correlacionado con la presencia de

enfermedades autoinmunes y con efectos supresores anti-tumorales, sin embargo, su rol en enfermedades infecciosas y en particular en la infección por el VIH es aun sujeto de extensa controversia (8).

La relación entre la infección por el VIH y los linfocitos T reguladores depende de diversos factores entre ellos progresión de la enfermedad, marcadores fenotípicos y compartimiento anatómico. El presente

estudio demuestra que en pacientes infectados con el VIH ocurre un aumento en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en el compartimiento pulmonar. Es de hacer notar que aunque el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica y lavado broncoalveolar fue similar, sólo en el pulmón este incremento se asoció al cociente CD4/CD8 lo cual sugiere que una mayor proporción de linfocitos T CD4⁺ expresan el marcador CD25 en el pulmón en comparación con lo que ocurre a nivel de la periferia. En relación a este hallazgo, Andersson y colaboradores por primera vez demostraron que en pacientes crónicamente infectados con el VIH, ocurre un cambio en la distribución tisular de los linfocitos Tregs observando un incremento en el número de estas células en el tejido linfoido amigdalino. Este incremento se asoció a la carga viral y fue independiente de los niveles de IL-10(22). Asimismo, Rueda y colaboradores demostraron un aumento en la frecuencia de linfocitos Tregs en el tejido linfoido asociado a intestino (GALT por sus siglas en inglés) comparado con monocitos

de sangre periférica (23). Esta redistribución de la población de linfocitos T reguladores pudiese estar asociada a cambios en la expresión antigénica local, replicación microbiana oportunista o viral tisular y microambiente inflamatorio presente en el pulmón. Es importante recalcar que en nuestro estudio, el 70% de los pacientes presentaron algún tipo de infección pulmonar demostrada por la positividad de los cultivos bacteriológicos y/o micológicos en el lavado broncoalveolar y/o la presencia histopatológica de hongos en las muestras de tejido pulmonar. Como se mencionó anteriormente, en el contexto de una infección aguda, los Tregs controlan y limitan las respuestas efectoras inmunes y los daños colaterales tisulares producto de intensas respuestas inmunes antimicrobianas (10). Sin embargo, este patrón tolerogénico e inmunosupresor secundariamente favorecería la persistencia de VIH en el tejido bronquial e inclusive podría tratarse de un mecanismo de evasión de la respuesta inmune por parte del virus.

En concordancia con estudios anteriores (22, 24-26), hubo una fuerte asociación entre carga viral, número absoluto y porcentaje de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} en sangre periférica. La asociación entre estas variables tiene diversas explicaciones. La replicación persistente y continua del VIH induce un estado de activación inmune la cual resulta en un incremento en los linfocitos T CD4⁺ con el fenotipo de Tregs. Por otra parte, linfocitos no Tregs pueden convertirse en Tregs lo cual explicaría el incremento proporcional de los Tregs en relación con la población total de linfocitos T CD4⁺. El virus preferentemente infecta linfocitos activados T CD4⁺ que se encuentran en fase proliferativa mientras que los linfocitos T reguladores constituyen una subpoblación con bajos niveles de proliferación lo cual los haría menos susceptibles a la infección por el virus y a la apoptosis inducida por la activación inmune persistente (27).

Nuestro estudio demuestra que tanto en sangre periférica como en el lavado

bronchoalveolar, el número de linfocitos T reguladores fue independiente del uso de terapia antiretroviral de gran actividad y en aquellos pocos pacientes que la recibían, independiente de la respuesta inmunológica a la misma. Algunos estudios demuestran una asociación positiva entre uso de terapia antiretroviral y linfocitos T reguladores (23, 28-29). Es importante acotar que el presente estudio tiene la particularidad de que, al momento de la realización del mismo, la indicación de TARGA según la Organización Mundial de la Salud estaba limitada sólo a pacientes con contaje de CD4⁺<200 células/ μ l. En consonancia con las normativas internacionales, nuestros pacientes iniciaron tratamiento en condiciones de profunda inmunosupresión y clínicamente en estadios más avanzados de la infección (Categoría C y D, según la CDC) y por lo tanto no se encontraban avirémicos al momento de su ingreso al protocolo de investigación lo cual explicaría la falta de asociación entre ambas variables.

En relación a las interleucinas medidas en sangre periférica y en el lavado broncoalveolar, comparativamente observamos un incremento significativo en las concentraciones pulmonares de TGF β 1, en menor grado de IL-4 e IL-17 y disminución significativa de IL-10. Bajo la influencia de TGF β , es sabido que los linfocitos Th17 se diferencian a partir de los linfocitos T CD4⁺ y producen IL-17(30). La IL-17 promueve la proliferación, maduración y actividad quimiotáctica de los neutrófilos, favorece la coestimulación de los linfocitos T y la maduración de las células dendríticas entre otras múltiples funciones (31). Por otra parte, TGF β actúa facilitando la diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en linfocitos T reguladores. En condiciones normales, la IL-10 tiene potentes efectos inmunosupresores inhibiendo las funciones de los linfocitos Th1 y reduciendo el daño colateral producido por una respuesta inmune descontrolada (32). En definitiva, el perfil de interleucinas en las muestras de lavado broncoalveolar sugiere la presencia de un

ambiente local predominantemente proinflamatorio en el pulmón de los pacientes infectados con el VIH.

En relación a la IL-10, nuestro estudio demostró una asociación entre la concentración de esta interleucina en sangre periférica y carga viral. Estos hallazgos concuerdan con estudios anteriores(33, 34) que demuestran que la activación inmune inducida por el VIH favorece la producción de esta interleucina altamente inmunosupresora. Recientemente Haij y colaboradores (35) demostraron que la proteína Tat del VIH-1 es capaz de interactuar con el receptor TLR4-MD2 en las células del sistema fagocítico/mononuclear e inducir directamente la producción de IL-10. Por otra parte, estudios *in vivo* han demostrado que los efectos supresores de los linfocitos T reguladores ocurren a través de contacto celular directo y de manera indirecta a través de la producción de interleucinas tales como IL-10 (36). Es sabido que en infecciones crónicas los linfocitos Tregs son importantes

productores de IL-10 permitiendo la supresión de la actividad de los linfocitos T, evitando el *clearance* de patógenos y a largo plazo ejerciendo efectos beneficiosos en el huésped favoreciendo el desarrollo de una inmunidad efectiva y duradera(37). A pesar de que efectivamente observamos una asociación entre la frecuencia de linfocitos T CD4⁺CD25^{hi} y [IL-10] en la periferia, esta asociación no ocurrió a nivel pulmonar y por el contrario, observamos concentraciones significativamente más bajas de IL-10 en el lavado broncoalveolar por lo que podemos suponer que el efecto inmunomodulador de los linfocitos T reguladores en el pulmón pudiera ser independiente de IL-10 lo cual concuerda con estudios realizados *in vitro*(37, 39) e *in vivo* en tejido linfoideo amigdalino(22).

La presente investigación demostró una asociación entre el porcentaje de linfocitos CD4⁺CD25^{hi} en el pulmón y los niveles de IL-17 en sangre periférica. A pesar de que los niveles de IL-17 en el lavado broncoalveolar fueron más elevados

comparados con los de la misma interleucina en sangre periférica, no fue posible observar esta misma asociación con el porcentaje de CD4⁺CD25^{hi} del pulmón. Es sabido que los linfocitos T reguladores, a través de la producción de TGFβ, pueden inducir la diferenciación de los Th17 y por lo tanto la producción de IL-17. En base a los hallazgos de nuestro estudio, es posible pensar que este mecanismo de retroalimentación positiva no esté ocurriendo a nivel pulmonar. Por otra parte recientes estudios han evidenciado que los linfocitos Tregs pueden producir directamente IL-17(40). Para que esto ocurra, los Tregs sufren un mecanismo de reprogramación que los convierte en linfocitos T IL-17⁺Foxp3⁺ (41)lo que nos lleva a sugerir que, según nuestros hallazgos, esta reprogramación pudiera estar ocurriendo a nivel periférico pero no a nivel pulmonar. Por último, un desbalance de la relación Th1/Th2 evidenciada por la elevación en los niveles pulmonares de IL-4 y disminución de IL-12 estaría afectando el fino balance de la relación Th17/Tregs. Debido a la



reciprocidad en las vías de desarrollo de estas células, nuevas evidencias apuntan a que la relación Th17/Tregs pudiese haberse desarrollado para inducir o regular las respuestas inflamatorias tisulares tal y como ocurre con las respuestas inmunes mediadas por la dicotomía de la relación Th1/Th2(42).

En conclusión, nuestro trabajo demostró que en pacientes VIH hay un aumento proporcional de los linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^{hi}$ en el pulmón los cuales expresan altos niveles del marcador intracelular FoxP3. Este aumento se asoció al porcentaje de linfocitos T $CD4^+$ y al cociente $CD4/CD8$ y fue independiente de la carga viral, del uso de TARGA y de los niveles locales de IL-10. Nuevos estudios son necesarios para dilucidar el rol de la interrelación IL17/Tregs sobre los efectos reguladores de los linfocitos T $CD4^+CD25^{hi}$ en el pulmón de los pacientes VIH.

FINANCIAMIENTO

Recibido: 12-03-2015

Aceptado: 3-06-2015

Este proyecto fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes (Mérida, estado Mérida, Venezuela) y de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (Barquisimeto, estado Lara, Venezuela) (códigos M-971-09-07-C y 006-CS-2011, respectivamente).

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a los pacientes que participaron en este estudio así como al personal de Enfermería del Servicio de Neumonología y Cirugía de Tórax del IAHULA y al personal del Laboratorio de Hormonas de dicha institución.

REFERENCIAS

1. UCSF: University of California, San Francisco [Internet]. USA: UCSF; 2009 [07/04/2014]. Disponible en: <http://www.postgradoudh.edu.pe/ass>

- [ets/normas-vancouver-buma-2013-guia-breve.pdf](#).
2. Twigg H, Weiden M, Valentine F, Schnizlein-Bick C, Bassett R, Zheng L, Collman R, Coombs R, Bucy R, Rezk N, Kashuba A. Effect of highly active antiretroviral therapy on viral burden in the lungs of HIV-infected subjects. *J Infect Dis* 2008;197:109–116.
 3. Crothers K, Thompson B, Burkhardt K, Morris A, Flores S, Diaz P, Chaisson R, Kirk G, Rom W, Huang L, Lung HIV Study. HIV-associated lung infections and complications in the era of combination antiretroviral therapy. *Proc Am Thorac Soc* 2011; 8(3): 275-281.
 4. Beck J, Rosen M, Peavy H. Pulmonary complications of HIV infection. Report of the NHLBI workshop. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 2120-2126.
 5. Shellito J. Failure of host defenses in human immunodeficiency virus. *Semin Respir Crit Care Med* 2004; 25:73–84.
 6. Ansari A, Kamarulzaman A, Schmidt R. Multifaceted impact of host C–C chemokine CCL2 in the immunopathogenesis of HIV-1/*M. tuberculosis* infection. *Front Immunol* 2013; 4:312.
 7. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151–1164.
 8. Toda A, Piccirillo C. Development and function of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2006; 80:458–470.
 9. Chougnet C, Shearer G. Regulatory T Cells (Treg) and HIV/AIDS: Summary of the September 7-8, 2006 Workshop. *AIDS Research and*

- Human Retroviruses 2007; 23(7): 945-952.
10. Belkaid Y, Rouse B. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nat Immunol 2005; 6(4): 353-360.
 11. Beyer M, Schultze J. Regulatory T cells in cancer. Blood 2006; 108: 804-811.
 12. Wolf A, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. Clin Cancer Res 2003; 9:606-12.
 13. Zou W. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. Nat Rev Immunol 2006; 6: 295-307.
 14. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. Cell 2000; 101: 455-458.
 15. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. Nat Immunol 2005; 6: 338-344.
 16. Chevalier M, Weiss L. The split personality of regulatory T cells in HIV infection. Blood 2013; 121:29-37.
 17. Imamichi H, Lane C. Regulatory T cells in HIV-1 infection: The Good, the Bad and the Ugly. J Infectious Dis 2012; 205: 1479-82.
 18. American Thoracic Society. Clinical role of bronchoalveolar lavage in adults with pulmonary disease. Am Rev Respir Dis 1990; 142:481-486.
 19. European Society of Pneumology Task Group on BAL. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Eur Respir J 1989; 2:561-585.
 20. Venet F, Chung C, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G. Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25(+)CD127(-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. Intensive Care Med 2009; 35: 678-686.

21. Katsoulidou A, Rokka C, Issaris C, Haida C, Tzannis K, Sypsa V, Detsika M, Paraskevis D, Hatzakis A. Comparative evaluation of the performance of the Abbott RealTime HIV-1 assay for measurement of HIV-1 plasma viral load on genetically diverse samples from Greece. *Virol J* 2011; 8:10.
22. Andersson J, Boasso A, Nilsson J, Zhang R, Shire N, Lindback S, Shearer G, Chougnat CA. Cutting Edge: The prevalence of regulatory T cells in Lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. *J Immunol* 2005; 174: 3143-3147.
23. Rueda C, Velilla P, Rugeles M. Chronically HIV-1 Infected Patients Exhibit Low Frequencies of CD25+ Regulatory T Cells. *Virol J* 2012; 6:49-58.
24. Schulze J, Thomssen A, Hartjen P, Toth I, Lehmann C, Meyer-Olson D, Colberg K, Frerk S, Babikir D, Schmiedel S, Degen O, Mauss S, Rockstroh J, Staszewski S, Khaykin P, Strasak A, Lohse AW, Fätkenheuer G, Hauber J, van Lunzen J. Comprehensive Analysis of Frequency and Phenotype of T Regulatory Cells in HIV Infection: CD39 Expression of FoxP3⁺ T Regulatory Cells Correlates with Progressive Disease. *J Virol* 2011; 85(3): 1287–1297.
25. Hunt P, Landay A, Sinclair E, Martinson J, Hatano H, Emu B, Norris P, Busch M, Martin J, Brooks C, McCune J, Deeks S. A Low T Regulatory Cell Response May Contribute to Both Viral Control and Generalized Immune Activation in HIV Controllers. *PLoS One* 2011; 6(1): e15924.
26. Suchard M, Mayne E, Green V, Shalekoff S, Donninger S, Stevens W, Gray C, Tiemessen C. FOXP3 Expression Is Upregulated in CD4⁺T Cells in Progressive HIV-1 Infection

- and Is a Marker of Disease Severity. PLoS One 2010; 5(7): e11762.
27. Wan-hai W, Liang M, Ying W, Quan-cheng K, Xiao-yan Z. High frequency of regulatory T cells among HIV type 1-infected men who have sex with men correlates with disease progression. Chin Med J 2013;126 (11): 2054-2061.
28. Epplé H, Loddenkemper C, Kunkel D, Troger H, Maul J, Moos V, Berg E, Ullrich R, Schulzke J, Stein H, Duchmann R, Zeitz M, Schneider T. Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART. Blood 2006; 108: 3072–3078.
29. Shaw J, Hunt P, Critchfield J, McConnell D, Garcia J, Pollard R, Somsouk M, Deeks S, Shacklett B. Increased Frequency of Regulatory T Cells Accompanies Increased Immune Activation in Rectal Mucosae of HIV-Positive Noncontrollers. J Virol 2011; 85: 11422–11434.
30. Qu N, Xu M, Mizoguchi I, Furusawa J, Kaneko K, Watanabe K, Mizoguchi J, Itoh M, Kawakami Y, Yoshimoto T. Pivotal role of T-Helper 17–Related Cytokines, IL-17, IL-22 and IL-23 in inflammatory disease. Clin Dev Immunol 2013; 968549.
31. Tsai H, Velichko S, Hung L, Wu R. IL17A and Th17 Cells in Lung Inflammation: An update on the role of Th17 differentiation and IL17R signaling in host defense against infection. Clin Dev Immunol 2013; 2013: 267971.
32. Chen Z, Ding J, Pang N, Du R, Meng W, Zhu Y, Zhang Y, Ma C, Ding Y. The Th17/Treg balance and the expression of related cytokines in Uygur cervical cancer patients. Diagn Pathol 2013; 8:1.
33. Clerici M, Wynn T, Berzofsky J, Blatt S, Hendrix C, Sher A, Coffman R, Shearer G. Role of interleukin-10

- in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. *J Clin Invest* 1994; 93(2): 768-775.
- 34.** Brockman M, Kwon D, Tighe D, Pavlik D, Rosato P, Sela J, Porichis F, Le Gall S, Waring M, Moss K, Jessen H, Pereyra F, Kavanagh D, Walker B, Kaufmann D. IL-10 is upregulated in multiple cell types during viremic HIV infection and reversibly inhibits virus-specific T cells. *Blood* 2009; 114(2): 346-356.
- 35.** Haij B, Leghmari K, Planes R, Thieblemont N, Bahraoui E. HIV-1 Tat protein binds to TLR-MD2 and signals to induce TNF- α and IL-10. *Retrovirol* 2013; 10:123.
- 36.** Sanchez A, Yang Y. The Role of Naturally Regulatory T cells in Infection. *Immunol Res* 2011; 49(0): 124-134.
- 37.** Suffia I, Reckling S, Piccirillo C, Goldszmid R, Belkaid Y. Infected site-restricted Foxp3+natural regulatory T cells are specific for microbial antigens. *J Exp Med* 2006; 203:777-788.
- 38.** Moreno-Fernández M, Rueda C, Rusie L, Chougnet C. Regulatory T cells control HIV replication in activated T cells through an AMPc-dependent mechanism. *Blood* 2011; 117: 5372-5380.
- 39.** Clark R, Kupper T. IL15 and dermal fibroblasts induce proliferation of natural regulatory T cells isolated from human skin. *Blood* 2007; 109(1): 194-202.
- 40.** Wang T, Sun X, Zhao J, Zhang J, Zhu H, Li C, Gao N, Jia Y, Xu D, Huang F, Li N, Lu L, Li Z. Regulatory T cells in rheumatoid arthritis showed increased plasticity toward Th17 but retained suppressive function in peripheral blood. *Ann Rheum Dis* 2014; doi:10.1136/annrheumdis-2013-204228.
- 41.** Du R, Zhao H, Yan F, Li H. IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate



differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cell. J Leukoc Bio 2014; doi:10.1189/jlb.1RU0114-010RRjlb.1RU0114-010RR.

42. Lang C, Wang M, Hung K, Hsu S, Chiang C, Lu K. Correlation of Interleukin-17-producing effector

memory T cells and CD4+CD25+Foxp3 regulatory T cells with the phosphate levels in chronic hemodialysis patients. TheScientificWorldJo 2014; 2014: 593170.