

### Identificación y cuantificación de linfocitos T y citoquinas plasmáticas en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1

*Identification and quantification of T lymphocytes and plasma cytokines in patients infected with human immunodeficiency virus type 1*

Elizabeth Cervantes Aguilar<sup>1,2</sup>, Libertad Alzamora Gonzales<sup>1</sup> y César Sánchez Zúñiga<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Los objetivos fueron identificar y cuantificar subpoblaciones de linfocitos T para establecer el grado de inmunodeficiencia, y citoquinas plasmáticas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 para determinar su relación con el grado de inmunodeficiencia en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Se realizó un estudio transversal en el cual se incluyeron 73 pacientes del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen (EsSalud) con diagnóstico de infección por VIH-1 que fueron clasificados, según el conteo absoluto de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (LT CD4<sup>+</sup>) realizado por citometría de flujo, en 3 grupos: grupo 1, inmunosupresión baja ( $\geq 500$  LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l, n=19); grupo 2, inmunosupresión moderada (200 a 499 LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l, n=27) y grupo 3, inmunosupresión elevada (<200 LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l, n=27). Como grupo control se incluyeron 24 individuos saludables, VIH negativos ( $\geq 500$  LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l). Se determinó la concentración de citoquinas plasmáticas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 para cada grupo. Los pacientes del grupo 1 presentaron niveles de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-10 similares a los del grupo control. Los pacientes del grupo 3 mostraron mayor concentración de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-10 ( $p < 0.05$ ) respecto a los grupos 1, 2 y control. No se encontró correlación entre el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y la concentración elevada de IFN- $\gamma$  en los pacientes del grupo 3.

**PALABRAS CLAVE:** VIH-1, citoquinas en pacientes VIH<sup>+</sup>, linfocitos T y VIH-1, linfocitos T y citometría de flujo, citoquinas y citometría de flujo.

#### ABSTRACT

The objectives were to identify and quantify subpopulations of T lymphocytes to establish the degree of immunodeficiency, and plasma cytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10 to determine its relationship to the degree immunodeficiency in patients infected with HIV type 1 (HIV-1). We conducted a cross-sectional study in which 73 patients from Guillermo Almenara Irigoyen Hospital (EsSalud) with diagnosis of HIV type 1 were included, and they were classified according to the absolute CD4<sup>+</sup> T lymphocytes (CD4<sup>+</sup> TL) count by flow cytometry in 3 groups: group 1, less immunosuppression ( $\geq 500$  CD4<sup>+</sup> TL/ $\mu$ l, n=19); group 2, moderate immunosuppression (200 to 499 CD4<sup>+</sup> TL/ $\mu$ l, n=27) and group 3, higher immunosuppression (< 200 CD4<sup>+</sup> TL/ $\mu$ l, n=27). The control group included 24 healthy individuals, HIV negatives ( $\geq 500$  CD4<sup>+</sup> TL/ $\mu$ l). Plasma concentration of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 and IL-10 was determined in each group. Patients of group 1 showed similar levels of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 and IL-10 to those reported for control group. Patients of group 3 showed a higher concentration of IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 and IL-10 ( $p < 0.05$ ) in relation to groups 1 and 2, and the control group. No correlation between the count of CD4 + lymphocytes and the high concentration of IFN- $\gamma$  in patients in group 3 was found.

**KEYWORDS:** HIV-1, cytokines in HIV-1<sup>+</sup> patients, T lymphocytes and HIV-1, T lymphocytes and flow cytometry, cytokines and flow cytometry.

Recibido: 14/09/2015

Aprobado: 06/11/2015

1 Laboratorio de Inmunología. Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas "Antonio Raimondi". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

2 Unidad de Biomedicina Molecular y Celular, e Investigación del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen - EsSalud. Lima, Perú.

## Introducción

El funcionamiento y la integridad del sistema inmune humano dependen de la presencia de cantidades adecuadas de células competentes. Estas células y sus productos secretados interactúan conformando una red compleja que tiene la finalidad de proteger al individuo de los elementos nocivos para la salud. Uno de los parámetros para determinar la suficiencia de la respuesta inmunitaria humoral o celular es la identificación de citoquinas, proteínas que cumplen un importante rol en la inmunidad. Se ha demostrado que el comportamiento en la secreción de citoquinas es distinto entre individuos sanos y enfermos, por tanto, el hallazgo de perfiles de citoquinas que caractericen una patología permite entender el curso de la respuesta inmune frente al agente agresor.

La patogénesis de la infección del VIH y el SIDA está íntimamente relacionada a la activación del estado del sistema inmune del hospedero, aunque ésta es esencial para montar una efectiva respuesta, paradójicamente también puede proporcionar un ambiente inmunológico que propicie la replicación y la progresión de la enfermedad en personas infectadas con el virus (Lawn et al. 2001).

El conteo de linfocitos T cooperadores (LT CD4+) es usado como un marcador predictivo e indicador del grado de inmunodeficiencia y se recomienda no sólo para evaluar la progresión de la infección sino también para dar inicio a la terapia antiviral, monitorearla y empezar la profilaxis para varias enfermedades oportunistas que pueden surgir como consecuencia de la infección por VIH (CDC 1993). Cuando el organismo elimina un patógeno intracelular, se induce una respuesta inmune celular en la cual participan linfocitos T cooperadores 1 (respuesta Th1), cuando se destruye un patógeno extracelular se estimula una respuesta inmune humoral con participación de linfocitos T cooperadores 2 (respuesta Th2)

que es mediada por anticuerpos. Se ha sugerido que la calidad de los tipos de respuestas Th puede impactar en la patogénesis del SIDA; así, un cambio en la respuesta predominante Th1 a Th2 y la producción de las citoquinas características pueden estar relacionadas e incluso facilitar la progresión de la enfermedad (Clerice y Shearer, 1993, Vera et al. 2014); los conteos de LT CD4+ también se utilizan como indicadores del avance la infección hacia el estado de SIDA, investigadores como Ray et al. (2006) han reportado que un rango de 500 a 1000 LT CD4+/ $\mu$ l es normal para individuos sanos, mientras que un conteo  $< 200$  LT CD4+/ $\mu$ l corresponde al estado de SIDA.

Durante la respuesta inmune contra el VIH se activan una serie de señales moleculares con la consecuente producción de citoquinas, las células presentadoras de antígenos (CPA) activan a LT CD4+ o Th provocando su diferenciación a células efectoras secretoras de citoquinas, en este proceso de inducción participan las células dendríticas que producen interleuquina 12 (IL-12), la cual provoca el paso de células T nativas a Th1 que a su vez producen interleuquina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). La IL-2 es crucial para el crecimiento, proliferación y diferenciación de las células T, el IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos y es esencial para la eliminación de patógenos intracelulares.

Estudios anteriores han revelado que debido a la disminución de la población de LT CD4+ los individuos infectados por VIH poseen un sistema inmune débil y como consecuencia se producirá la disminución de los niveles de IL-12, lo que causa el decaimiento de IL-2 e IFN- $\gamma$ . Por lo tanto, se podría esperar que los niveles de citoquinas que estimulan la respuesta Th1 sean menores que las encontradas en personas sanas. En contraste, las citoquinas que estimulan la respuesta Th2 como la interleuquina 4 (IL-4), se producirán en mayor cantidad estimulando la respuesta inmune humoral que no es la más eficiente en la infección por el VIH, se han determinado

altos niveles de IgG e IgM no neutralizantes en el período de latencia de la enfermedad (Bedoya et al. 2003). En el estadio de SIDA simultáneamente se produce hiperactivación de los linfocitos B que conduce a una hipergammaglobulinemia policlonal, pero la capacidad de estas células para responder a los antígenos en forma específica está disminuida. Las células T activadas secretan niveles aumentados de TNF- $\alpha$  e IL-6 que promueven la replicación viral y exponen a las células infectadas al reconocimiento y ataque por los linfocitos T citotóxicos (Bedoya et al. 2003). Así mismo, las citoquinas con un rol importante en la supresión del sistema inmune, como las que se encuentran en individuos con enfermedades autoinmunes también están elevadas en una infección por VIH (Vera et al. 2014).

Las últimas estadísticas sobre el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), para el mundo entero y sus regiones, fueron publicadas por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Noviembre de 2013. Hasta el 2012, un estimado de 33.5 (32.2–38.8) millones de personas vivían infectadas con el VIH (WHO 2013). Por lo que esta pandemia sigue causando gran preocupación entre las autoridades de salud y la población mundial.

Es claro entonces que el sistema inmune es incapaz de asumir el control de la infección por el VIH-1 porque las células CD4<sup>+</sup> son el blanco del virus, se infectan en forma productiva y mueren rápidamente por diferentes mecanismos. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> o células citotóxicas son importantes en la respuesta inmune anti-VIH-1, con una gran correlación entre una respuesta vigorosa y el control inicial de la replicación del VIH-1 durante la infección primaria. La mayor actividad de estas células en los pacientes con progresión lenta de la enfermedad (progresores lentos) comparada con los progresores rápidos o típicos, sugiere un papel protector

de estas células tanto en la prevención como en el control de la infección (Bedoya et al. 2003).

Las citoquinas cumplen un papel inmunorregulador y modulan la expresión del VIH-1; pueden ser divididas en tres grupos considerando su efecto sobre la expresión y replicación del virus: (1) inductoras de expresión viral, las cuales incluyen IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-12, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (CSF-GM), el factor estimulador de colonias de macrófagos (CSF-M) y el TNF $\alpha/\beta$ ; (2) supresoras de la expresión del virus como IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IL-10; y (3) bifuncionales, como IFN- $\gamma$ , IL-4 y el factor de crecimiento de tumores (TGF- $\beta$ ). Durante el curso de la infección por VIH-1 se han descrito altos niveles de expresión constitutiva de citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$ , IL-10 y TNF- $\alpha$ , y de IL-1b e IL-6 en sangre periférica y en nódulos linfáticos que pueden contribuir a mantener un nivel constante de expresión y replicación viral. La secreción aumentada del IFN- $\gamma$  en las fases tempranas de la infección se correlaciona con la expansión oligoclonal de las células T CD8<sup>+</sup>, característica dominante de la respuesta inmune en la infección primaria. Por su parte la IL-10 inhibe la replicación del VIH-1 porque bloquea la secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 por los monocitos o macrófagos infectados lo que favorece que el virus permanezca en estado latente (Bedoya et al. 2003).

Los objetivos fueron identificar y cuantificar subpoblaciones de linfocitos T para establecer el grado de inmunodeficiencia, y citoquinas plasmáticas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 para determinar su relación con el grado de inmunodeficiencia en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1).

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio transversal en el cual se incluyeron 73 pacientes de 18 a 60 años de

edad, con diagnóstico positivo para la infección por el VIH-1, que acudían a su control médico en el Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. El grupo control estuvo formado por 24 individuos saludables, VIH-1 negativos (VIH-1<sup>-</sup>). En función al conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> se formaron 3 grupos en pacientes VIH-1<sup>+</sup> (CDC 1993, Bedoya et al. 2003, Ray et al. 2006, Vera et al. 2014).

### *Muestras de sangre*

Las muestras de sangre para la cuantificación de linfocitos procedieron de pacientes con diagnóstico positivo para VIH-1 y voluntarios saludables, previo consentimiento informado sobre la finalidad del uso de la sangre. Se consideraron las normas y recomendaciones de la Declaración de Helsinki sobre material biológico procedente de individuos voluntarios, el proyecto de investigación fue aprobado por la autoridad competente del Hospital Guillermo Almenara Irigoyen de EsSalud (Lima-Perú).

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por duplicado mediante punción intravenosa en tubos al vacío estériles conteniendo K3 EDTA (VACUTAINER; Becton Dickinson). Uno de los tubos fue utilizado para la inmunofenotipificación de linfocitos T a partir de sangre completa, realizando el marcaje con anticuerpos monoclonales para CD45, CD3, CD4 y CD8 dentro de las tres horas siguientes, según el protocolo de CDC (1993). El otro tubo fue centrifugado y el plasma obtenido se almacenó a -20°C hasta el proceso de marcación para las citoquinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 dentro de los veinte días siguientes. De la misma forma se procedió a tomar la muestra de sangre a 24 individuos saludables VIH-1<sup>-</sup>.

### *Identificación y cuantificación de linfocitos T*

El inmunofenotipaje se realizó usando el citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson, con un cóctel de anticuerpos:

CD3FITC/CD4PE/CD45PerCP para la determinación de Linfocitos T cooperadores, y CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP para Linfocitos T citotóxicos. El procedimiento de marcaje celular se realizó en 2 tubos que contenían perlas de referencia (BD TruCOUNT), se agregaron 20 $\mu$ l de los anticuerpos CD3/CD4/CD45 a un tubo y CD3/CD8/CD45 al otro, se añadió 50 $\mu$ l de sangre periférica a cada tubo, se mezcló y se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente por 15 minutos.

Después de la incubación, se agregó a cada tubo 450 $\mu$ l de una solución lisante hipotónica de glóbulos rojos (BD FACS Lysing), luego se procedió a la lectura o adquisición de un total de 10 000 leucocitos CD45<sup>+</sup> en todos los tubos. Se obtuvieron gráficas de puntos que representan a las poblaciones linfocitarias mostrando las combinaciones de anticuerpos empleados. La selección de las poblaciones dentro de las regiones determinadas por el software de análisis MultiSET versión 2.1.1 permitió realizar el cálculo automático de los conteos absolutos de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>), linfocitos T cooperadores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) y linfocitos T citotóxicos (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) (Figura 1).

### *Clasificación de los pacientes para el estudio*

Los pacientes infectados con el VIH-1 fueron agrupados empleando el criterio de clasificación de la CDC (1993) en función a la concentración de LT CD4<sup>+</sup> relacionado con el grado de avance de la infección con el VIH-1 (CDC 1993, Mandy et al. 2003, Ray et al. 2006, Vera et al. 2014). No se consideraron grupos etáreos a fin de no fraccionar demasiado el grupo general ya que el rango de edades fue amplio (18 a 60 años de edad), no se consideró la carga viral al momento del muestreo, el sexo del paciente, factores de riesgo (diabetes, cáncer, etc) o tratamiento antiretroviral. Los conteos absolutos de LT CD4<sup>+</sup> determinaron el grado de inmunosupresión, los valores obtenidos se emplearon para formar tres gru-

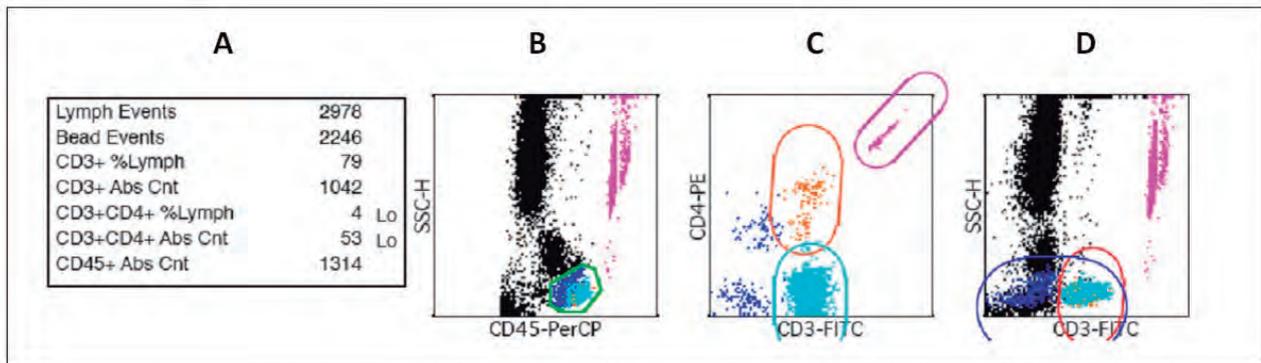


Figura 1. Patrón de referencia para el análisis de la población de linfocitos T en una muestra sanguínea de un paciente VIH-1+ usando la técnica de citometría de flujo. **A.** Cálculo relativo y de conteos absolutos de linfocitos T (CD3+) y linfocitos T cooperadores (CD3+CD4+), y detección de las perlas de referencia del tubo TruCOUNT. **B.** Población leucocitaria (CD45+) marcada con la fluorescencia PerCP. Los puntos dentro de la región verde representan a los linfocitos totales (CD45+) versus SSC. **C.** Población de linfocitos T y expresión de los anticuerpos CD3 marcada con la fluorescencia FITC, y CD4 con la fluorescencia PE. Los puntos en color naranja representan a los linfocitos T CD3+CD4+. En color lila se representa a las perlas de referencia. **D.** Población leucocitaria y la expresión del anticuerpo CD3 versus SSC. Los puntos encerrados en la región roja representan a los linfocitos T CD3+.

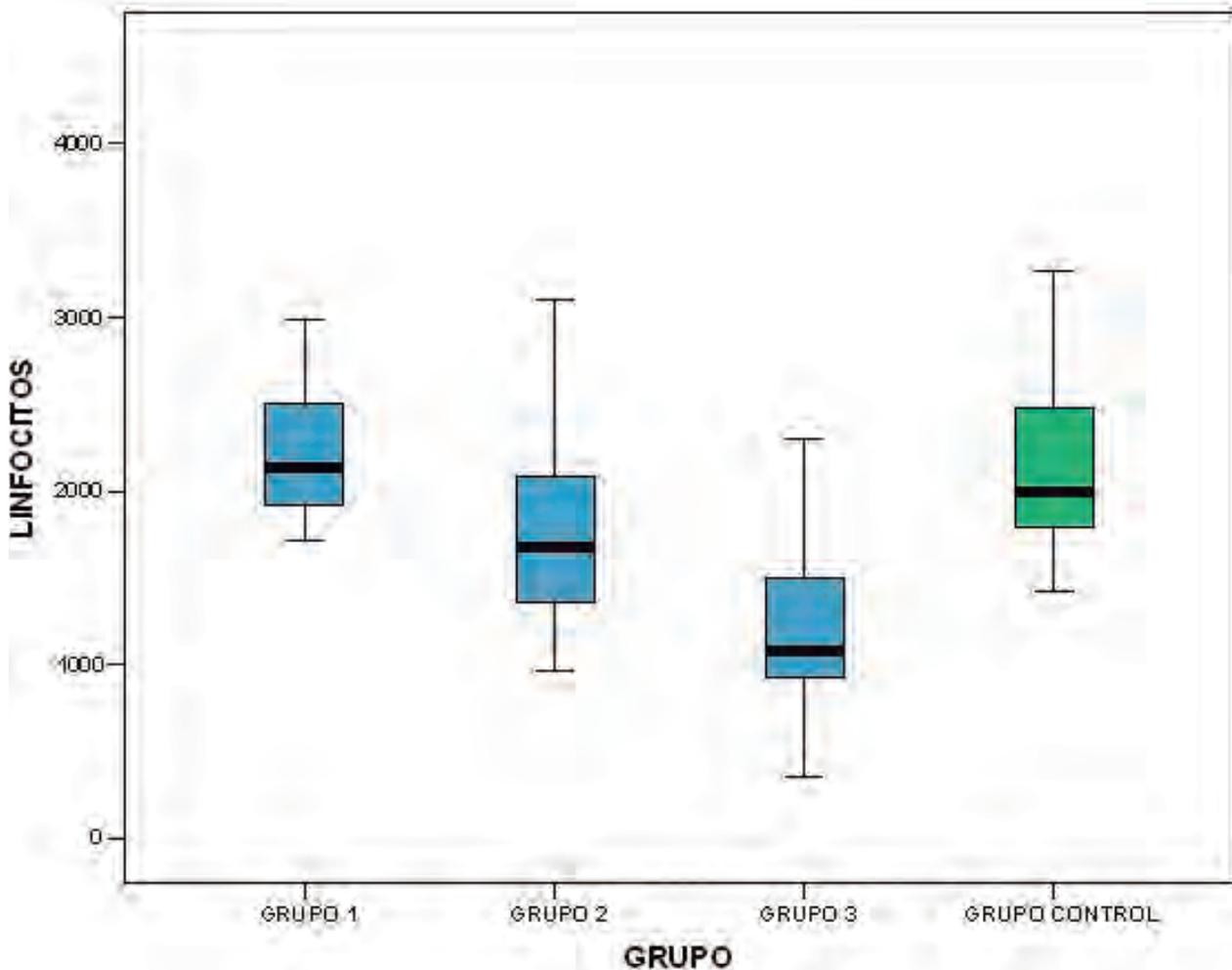


Figura 2. Comparación de la cantidad de linfocitos T entre los grupos de pacientes VIH-1+. El conteo de linfocitos T de los grupos 1 y 2 no difieren del grupo control; sin embargo, entre los grupos 3 y control, las diferencias son significativas siendo una evidencia que los pacientes del grupo 3 se encuentran en un estado de inmunosupresión severa.

pos, el grupo 1 (n=19) correspondiente a una inmunosupresión baja con  $LT\ CD4^+ \geq 500$   $LT\ CD4^+/\mu l$ , el grupo 2 (n=27) de inmunosupresión moderada con 200 a 499  $LT\ CD4^+/\mu l$ , y el grupo 3 (n=27) de inmunosupresión elevada con  $<200\ LT\ CD4^+/\mu l$ . En el grupo control se consideró como valores normales los conteos  $\geq 500\ LT\ CD4^+/\mu l$ . El conteo de linfocitos T se realizó con el marcador CD3.

#### *Determinación de las concentraciones de citoquinas plasmáticas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10*

El marcaje de citoquinas de las muestras y la curva de calibración, a partir de la cual son calculadas las concentraciones (pg/ml) de citoquinas de todos los individuos participantes, se realizó con el Human Th1/Th2 Cytokine CBA Kit II (Manual de Instrucción, 2004), que cuantifica simultáneamente, a partir de una sola muestra de plasma, niveles de Interleuquina-2 (IL-2), Interleuquina-4 (IL-4), Interleuquina-6 (IL-6), Interleuquina-10 (IL-10), Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ) e Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ).

Las muestras fueron analizadas por el método de inmunoensayo sandwich de citometría de flujo basado en perlas fluorescentes (CBA). El vial conteniendo los estándares liofilizados de las citoquinas humanas Th1/Th2 de concentración conocida fue reconstituido y luego se hicieron diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, y 1:256) obteniéndose las concentraciones de 2500 pg/ml, 1250 pg/ml, 625 pg/ml, 312.5 pg/ml, 156 pg/ml, 80 pg/ml, 40 pg/ml, y 20 pg/ml respectivamente. Como control negativo sólo se usó el diluyente (0 pg/ml).

Por otro lado, en un vial se hizo la mezcla de las seis perlas de captura de citoquinas humanas en cantidades proporcionales, transfiriendo una alícuota de esta mezcla a tubos de ensayo donde se agregó también el reactivo de detección ficoeritrina (PE).

Los estándares diluidos y las muestras de plasma de los individuos participantes del estudio se agregaron en cada tubo de ensayo de manera individual. Todos los tubos se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Se realizó un lavado con el buffer apropiado y se resuspendió la muestra de cada tubo y se procedió a la lectura y análisis de las citoquinas en el citómetro de flujo. Se empleó el software BD CBA para obtener y analizar la curva de calibración y las muestras de los participantes. El sistema CBA consta de una serie de partículas con intensidades discretas de fluorescencia para detectar simultáneamente múltiples analitos solubles. Cada perla en CBA proporciona una superficie de captura para una proteína específica y es análoga a un pocillo recubierto individualmente en una placa de ELISA (Becton Dickinson 2004).

#### *Comparación de los conteos de linfocitos T y las concentraciones de citoquinas plasmáticas*

La comparación de los conteos de Linfocitos T ( $CD3^+$ ), linfocitos T cooperadores ( $CD3^+CD4^+$ ) y linfocitos T citotóxicos ( $CD3^+CD8^+$ ) y las concentraciones de citoquinas plasmáticas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 entre los tres grupos de pacientes infectados con VIH y el grupo control seronegativo, se realizó empleando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores de p fueron de dos colas y se consideraron significativos cuando  $p < 0.05$ .

## **Resultados**

### *Identificación y cuantificación de leucocitos totales y linfocitos T*

Se evidenció que los conteos absolutos de leucocitos totales y linfocitos no difieren sustancialmente entre pacientes VIH-1<sup>+</sup> y perso-

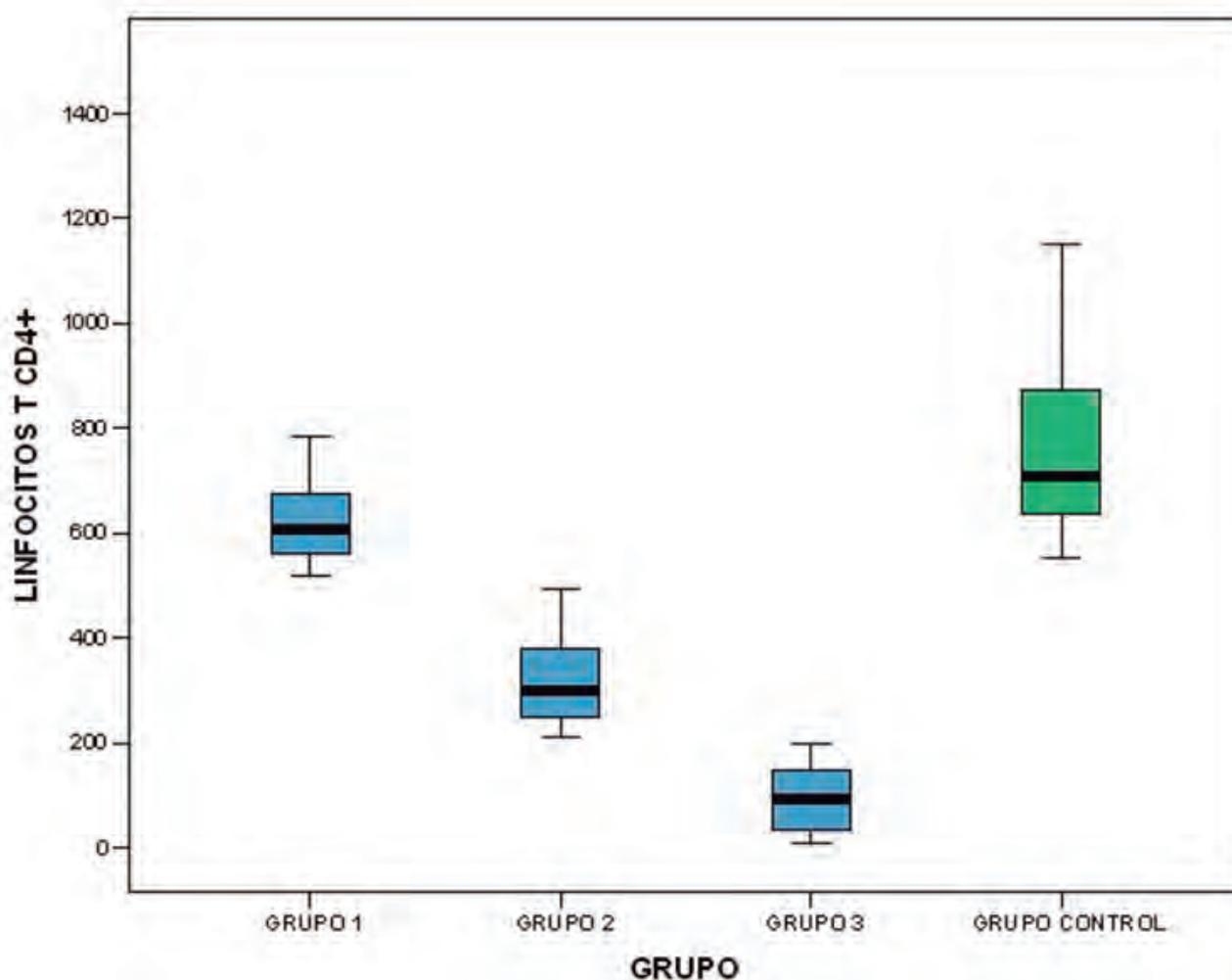


Figura 3. Distribución de pacientes VIH-1+ de acuerdo al conteo de linfocitos T CD4+. Las células blanco del VIH-1+ son los linfocitos T CD4+ por lo que los datos obtenidos en los conteos fueron utilizados para formar tres grupos con los pacientes VIH-1+. En el grupo 1 se ubicaron los pacientes con conteos  $\geq 500$  LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l, en el grupo 2 con 200 a 499 LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l y en el grupo 3 con  $< 200$  LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l. El grupo control (individuos saludables) tuvo conteos  $\geq 500$  LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l. Se encontraron diferencias significativas entre los conteos de linfocitos T CD4+ de los tres grupos de pacientes con el grupo control.

nas sanas; pero, a mayor grado de inmunosupresión ambos conteos decaen. La media del conteo de leucocitos CD45<sup>+</sup> en los pacientes del grupo 1 (inmunosupresión baja) fue de 6127 células/ $\mu$ l, similar al que presentaron los individuos del grupo control (6508 células/ $\mu$ l). En el grupo 2 fue de 5117 células/ $\mu$ l (inmunosupresión moderada) y en el grupo 3 fue de 4833 células/ $\mu$ l (inmunosupresión elevada) (Tabla 1).

Con respecto al conteo de linfocitos T CD3<sup>+</sup>, los grupos 1 y 2 no difieren del grupo control; sin embargo, el conteo absoluto de

linfocitos T CD3<sup>+</sup> del grupo con inmunosupresión elevada fue menor que el determinado en el grupo control (Figura 2) (Tabla 1).

Los grupos 1 y 2 no difieren del grupo control; pero entre los grupos 3 y control, el conteo absoluto de linfocitos T CD3<sup>+</sup> presentó diferencias significativas, siendo menor el del grupo 3 (Figura 3). Esto indica que los conteos de leucocitos totales y linfocitos no difieren sustancialmente entre pacientes VIH-1+ de los grupos 1 y 2, y el de personas saludables; pero, si la inmunosupresión es mayor ambos conteos decaen (Tabla 1).

### *Inmunofenotipo de linfocitos T CD4<sup>+</sup>*

Se determinó que en el grupo control los conteos fueron normales con LT CD4<sup>+</sup> superior a 500 células/ $\mu$ l y una relación de CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> entre 1.0-3.6 (Commans et al. 1997) (Figura 2). Los valores encontrados permiten confirmar la relación directa entre el grado de inmunodeficiencia en los pacientes VIH-1<sup>+</sup> y el conteo de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que decae significativamente en el grupo 3 (Figura 3) (Tabla 1).

### *Inmunofenotipo de linfocitos T CD8<sup>+</sup>*

Los conteos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los grupos 1 y 2 son mayores con respecto al de los grupos 3 y control. No se encontraron diferencias significativas entre el conteo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los grupos 3 y control. En los pacientes del grupo 1 (inmunosupresión baja) el conteo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> supera al del grupo control (personas sanas) para luego estabilizarse y finalmente decaer de manera significativa cuando la inmunosupresión es evidente (Tabla 1).

### *Determinación de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 E IL-10 en el plasma*

Las concentraciones de IL-2 y TNF- $\alpha$  fueron similares entre los 3 grupos de pacientes y el grupo control ( $p > 0.05$ ). En los pacientes con inmunosupresión baja (grupo 1) se determinaron concentraciones de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-10 similares al grupo control, y se mantuvieron estables en los pacientes con inmunosupresión moderada; sin embargo, en los pacientes con inmunosupresión elevada los niveles de éstas citoquinas también se elevaron de manera significativa ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2).

## **Discusión**

La cuantificación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> permitió categorizar a los pacientes infectados con

el VIH-1 y mantuvo relación con las condiciones clínicas presentadas por ellos. Mediante el estudio inmunofenotípico de los linfocitos T CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> se demostró la disminución del número de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los pacientes infectados con VIH-1, siendo el más afectado el grupo 3 en el que se incluyeron los pacientes con inmunodeficiencia severa, se ha demostrado que esta disminución también afecta las características cualitativas de la subpoblación de linfocitos T cooperadores/inductores (Alcamí y Coiras 2011).

La determinación de citoquinas plasmáticas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6 e IL-10 de los pacientes infectados con VIH-1 no mostró un perfil polarizado hacia Th1 o Th2, ya que se elevaron las concentraciones de citoquinas relacionadas con la activación tanto de la respuesta para LTh1 (IFN- $\gamma$ ) como de LTh2 (IL-4, IL-6 e IL-10). Esto indica que la infección con VIH-1 altera la producción de las citoquinas características de la inmunidad celular (IFN- $\gamma$ ) y de la inmunidad humoral (IL-4, IL-10) (Facoya et al. 1997, Onlamoon 2003, Bedoya et al. 2003); sin embargo, llama la atención el incremento de IFN- $\gamma$  en el grupo 3, siendo que la cantidad de LT CD4<sup>+</sup> ha decaído, esto podría ser el resultado de la activación de células NK (natural killer) que también producen esta citoquina. Además, si algunos pacientes de este grupo estuvieron enfermos con tuberculosis, es probable que la población residual de linfocitos haya sido estimulada (in vivo) para la producción de IFN- $\gamma$ , un reporte de Torres et al. (2008) indica que en cultivos de linfocitos T, estimulados por antígeno de *M. tuberculosis*, procedentes de individuos con tuberculosis latente se incrementó la producción de esta citoquina.

En experimentos in vitro se ha demostrado que la producción de citoquinas no es exclusividad de los linfocitos Th1 o Th2 (Magombedze et al. 2013, Kelso A. 1995) y que estos productos de activación dependen principalmente de la replicación diferencial

	<b>Leucocitos</b> (células/ $\mu$ l)	<b>Linfocitos</b> (células/ $\mu$ l)	<b>Linfocitos T</b> (células/ $\mu$ l)	<b>LT CD4+</b> (células/ $\mu$ l)	<b>LT CD8+</b> (células/ $\mu$ l)
<b>Grupo 1</b>	6127	2264	1570	631	861
<b>Grupo 2</b>	5117	1831	1311	320	930
<b>Grupo 3</b>	4833	1215	784	95	624
<b>Grupo control</b>	6508	2146	1348	792	480

Tabla 1. Comparación de los valores alcanzados por conteos absolutos de leucocitos, linfocitos T, linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> de los grupos 1, 2, 3 de pacientes VIH-1<sup>+</sup> y el grupo control (células/ $\mu$ l). Grupo 1 ( $\geq$ 500 LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l), grupo 2 (200 a 499 LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l) y grupo 3 (< 200 LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l), grupo control ( $\geq$ 500 LT CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l).

	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/ml)	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> (pg/ml)	<b>IL-2</b> (pg/ml)	<b>IL-4</b> (pg/ml)	<b>IL-6</b> (pg/ml)	<b>IL-10</b> (pg/ml)
<b>Grupo 1</b>	2.15	14.07	2.92	6.74	4.26	2.88
<b>Grupo 2</b>	2.11	13.69	2.87	9.49	5.33	3.30
<b>Grupo 3</b>	2.48	21.03	3.35	9.24	10.22	3.94
<b>Grupo control</b>	1.78	12.23	3.81	5.43	4.05	2.50

Tabla 2. Niveles de citoquinas plasmáticas (pg/ml) en los tres grupos de pacientes VIH-1<sup>+</sup> y el grupo control. Se evidenció mayor concentración de IFN- $\gamma$  e IL-6 en el grupo 3 (infección en estado avanzado), estas son citoquinas características de respuesta inmune celular. En los grupos 2 y 3 también se observó incremento de IL-4 e IL-10 que modulan la respuesta inmune humoral.

del VIH en la subpoblación CD4<sup>+</sup> (Maggi et al. 1994, Vyakarnam et al. 1995, Bedoya et al. 2003). Otra posible explicación está relacionada con las anomalías en la función celular de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>, causadas por el VIH (Maggi et al. 1994, Bedoya et al. 2003, Alcamí y Coiras 2011).

Algunos reportes indican que la progresión de la enfermedad por VIH está asociada con el incremento en la secreción de IL-10 (Srikanth et al. 2000, Stylianou et al. 1999), probablemente facilitando la replicación viral en pacientes infectados o también promoviendo la persistencia viral mediante la

inactivación del mecanismo inmune efector (Bedoya et al. 2003). En un ensayo se observó que una disminución o bloqueo de la vía de IL-10 puede acentuar la respuesta inmune celular T, dando como resultado la rápida eliminación del virus y el desarrollo de una respuesta antiviral de las células T de memoria (Mahajan et al. 2010). Los monocitos que son afectados sólo en los últimos estadios de la infección por VIH-1, pueden ser responsables de la presencia de los altos niveles de IL-10 observados (Mosmann et al. 1991, Maggi et al. 1994, Bedoya et al. 2003). En otro estudio también se encontró que la IL-4 favorecía la

replicación del VIH en los monocitos/macrófagos (Kothari y Deshmukh 2006).

Por otro lado, en estudios anteriores a la era de la terapia antiretroviral se encontraron asociaciones entre IL-10 y TNF- $\alpha$  y mortalidad (Macías et al. 2001, Ostrowski et al. 2003). El TNF- $\alpha$  es una citoquina de "alerta" junto con la IL-1 y la IL-6, y estimula la producción de proteínas de fase aguda (Streetz et al. 2001). Niveles incrementados de IL-6 y fibrinógeno, una proteína de fase aguda, están asociados con altos niveles de ARN (Eastburn et al. 2011) de VIH y una infección avanzada por VIH (Wolf et al. 2002). Además, se ha observado que la sobreproducción de IL-6 por células mononucleares de pacientes infectados con VIH contribuye con la activación de las células B (Nakajima et al. 1989).

Las complejas redes de acción de las citoquinas se ponen en evidencia en los distintos procesos infecciosos, así en las infecciones con el virus de la hepatitis B, el aumento de la IL-6 puede potenciar los efectos de otras citoquinas (IL-1, TNF- $\alpha$ ), estimulando la respuesta de fase aguda y la producción de anticuerpos de la clase IgG, al actuar factores involucrados en la amplia red de citoquinas. El incremento de la IL-6 compensa el descenso cuantitativo del TNF- $\alpha$ ; y la disminución de la IL-10 podría afectar la respuesta ante cualquier proceso inflamatorio inducido por agentes etiológicos diversos, lo cual ha sido demostrado en estudios realizados en niños con trastornos anémicos y deficiencia de Vitamina A, y en procesos asmáticos (Leal et al. 2004, Lee et al. 1999, Matsumoto 2004, Stelmach et al. 2002).

Los resultados obtenidos en las investigaciones acerca de la cantidad de citoquinas Th1/Th2 en individuos infectados con VIH son contradictorios debido al uso de diferentes métodos para evaluar la expresión de citoquinas por ejemplo: ELISA, reacción en cadena de la polimerasa -transcriptasa reversa (RT-PCR) o clonamiento de células T, a esto se

suma la fuente de procedencia de las poblaciones T que pueden ser de sangre periférica o nódulos linfáticos. Ninguno de los métodos convencionales para medir la expresión de citoquinas usados en trabajos anteriores facilita la caracterización directa de la producción de citoquinas de células T (Klein et al. 1997). Para resolver este problema, en el presente trabajo se empleó la técnica de citometría de flujo, usando el CBA Kit II Citoquinas Humanas Th1/Th2 BD<sup>TM</sup>; este sistema es flexible y efectivo en costos porque requiere menos tiempo en operación manual en comparación de las pruebas de ELISA, y se evita hacer diluciones adicionales para muestras con altas concentraciones de citoquinas (Bencton Dickinson 2004).

Es importante recalcar que en el presente estudio se determinaron las concentraciones de citoquinas plasmáticas en pacientes infectados con VIH-1 sin realizar procedimientos de cultivo de linfocitos que son de alto riesgo para el operador. En otros estudios, los resultados obtenidos *in vitro*, utilizando mitógenos como activadores de células mononucleares o por medio de diferentes técnicas de cultivo y aislamiento, y con estimulantes, crearon discrepancias en cuanto al perfil de citoquinas que se presentaba en los pacientes infectados con VIH. Debe tomarse en cuenta que debido a factores que se encuentran en el organismo y no en los trabajos *in vitro* la producción de citoquinas no concuerda si se hacen comparaciones entre ambos sistemas.

Se ha demostrado que la citometría de flujo, usando el CBA Kit II Citoquinas Humanas Th1/Th2 BD<sup>TM</sup>, es una alternativa flexible y efectiva en costos que requiere menos tiempo en operación manual en comparación de las pruebas de ELISA, y no se necesita realizar diluciones adicionales para muestras con altas concentraciones de citoquinas. También pueden adicionarse otros marcadores para incrementar la capacidad diagnóstica o los mar-

cadadores que no son útiles en una situación específica pueden ser removidos para reducir costos (Tárnok et al. 2003).

El presente trabajo, aporta datos que pueden tener importantes implicancias en el entendimiento de la patogénesis de la inmunodeficiencia por VIH-1, ya que se ha encontrado una clara asociación entre un estado de inmunosupresión severa y la concentración elevada de IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-6 e IL-10 en pacientes infectados con VIH-1, los resultados con relación a IL-6 e IL-10 son similares a los reportados por Vera et al. (2014) pero difieren en cuanto a la concentración de IFN- $\gamma$  e IL-2, podría ser debido a que para el dosaje de estas citoquinas en el plasma de 7 pacientes VIH-1<sup>+</sup> emplearon el método de ELISA, el número de pacientes fue menor que en el presente estudio (7 pacientes), por lo que no se podría establecer una comparación homogénea de los resultados, ellos no determinaron IL-4.

También se ha demostrado que el comportamiento en la producción de citoquinas es distinto entre individuos no infectados e individuos infectados con VIH-1, específicamente en el grado avanzado de la enfermedad, por tanto, es un aporte que servirá para considerar que el hallazgo de perfiles de citoquinas que caracterizan la patología de la infección por VIH-1 mantiene estrecha relación con el curso de la respuesta inmune frente al agresor. Se espera que como resultado del estudio para la cuantificación adecuada de citoquinas se diseñen ensayos que permitan el monitoreo individual de los pacientes a fin de establecer esquemas de comportamiento en la producción de estas citoquinas y su evaluación mediante un determinado método, que podría ser citometría de flujo, y que a futuro se pueda emplear en el desarrollo de nuevas estrategias en el diagnóstico, prevención y tratamiento de personas infectadas por el VIH-1.

## Conclusión

Se concluye que la identificación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T es útil para establecer el grado de inmunodeficiencia que presenta relación directa con las concentraciones plasmáticas de IL-4, IL-6 e IL-10 en los pacientes VIH-1<sup>+</sup> ( $p < 0.05$ ). No se encontró correlación entre el recuento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y la concentración elevada de IFN- $\gamma$  en los pacientes del grupo 3.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los pacientes que voluntariamente han participado en el estudio proporcionando el material biológico (sangre) que ha sido utilizado para la evaluación de linfocitos T por citometría de flujo en la Unidad de Biología Molecular y Celular, e Investigación del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen (EsSalud).

*Conflicto de interés.* Los autores declaran no tener conflictos de interés.

## Referencias bibliográficas

- ALCAMÍ, José y COIRAS, Mayte (2011). "Immunopathogenesis of HIV infection". En: *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol. 29, N° 3: 216-226. Madrid.
- BECTON DICKINSON AND COMPANY (2004). "Human Th1/Th2 Cytokine Kit II". En: Instruction Manual. California.
- BEDOYA, Victoria Inés, et al. (2003). "Inmunología del virus de la inmunodeficiencia humana". En: *Acta Med Colomb*. Vol. 28: 23-35. Bogotá.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (1993). "Revised classification system for the HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and

- adults". En: *MMWR Recomm Rep*. Vol. 18, N° 41: 1-19. Atlanta.
- CLERICI, Mario y SHEARER, Gene (1993). "Th1 to Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection". En: *Immunol Today* Vol. 14, N° 3: 107-11. Atlanta.
- COMANS-BITTER, Marieke et al. (1997). "Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood". En: *J Pediatrics* Vol. 130, N° 3: 388-93. Cincinnati.
- DEL PRETE, Gianfranco et al. (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production". En: *J Immunol*. Vol. 150, N° 2: 353-360. Maryland.
- EASTBURN, Abigail et al. (2011). "Association of low level viremia with inflammation and mortality in HIV- infected adults". En: *PLoS One*. Vol. 6, N° 11: 26320. California.
- FACOYA, Ade et al. (1997). "HIV infection alters the production of both type 1 and 2 cytokines but does not induce a polarized type 1 or 2 state". En: *AIDS* Vol. 11, N° 12: 1445-1452. Geneva.
- KELSO, Anne (1995). "Th1 and Th2 subsets: Paradigms lost". En: *Immunol Today* Vol. 16, N° 8: 374-379. Atlanta.
- KLEIN, Stefan et al. (1997). "Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry". En: *AIDS* Vol. 11, N° 9: 1111-1118. Geneva.
- KOTHARI, Sweta y DESHMUKH, Ranjana (2006). "Estimation of mRNA levels of (IL)-10, tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , IL-4 and interferon gamma (IFN)- $\gamma$  in HIV infected children in Mumbai". En: *Indian J Clin Biochem*. Vol. 21, N° 1: 15-26. New Delhi.
- LAWN, Stephen et al. (2001). "Contribution of Immune Activation to the Pathogenesis and Transmission of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection". En: *Clin Microbiol Rev*. Vol. 14, N° 4: 753-777. Washington DC.
- LEAL, Jorymar Y. et al. (2006). "Serum levels of interferon-gamma and interleukine-10 in anemic children with vitamin A deficiency". En: *Arch Latinoam Nutr*. Vol. 56: 329-334. Caracas.
- LEE, Millina et al. (1999). "Expression of Th1 and Th2 type cytokines responding to HBsAg and HBxAg in chronic hepatitis B patients". En: *J Korean Med Sci*. Vol. 14: 175-181. Seúl.
- MACÍAS, Julia et al. (2001). "Usefulness of route of transmission, absolute CD4+ T-cell count, and levels of serum tumor necrosis factor alpha as predictors of survival of HIV-1-infected patients with very low CD4+ T cell counts". En: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. Vol. 20, N° 4: 253-259. Berlin.
- MAGGI, Enrico et al. (1994). "Ability of HIV to promote a Th1 to Th0 shift and to replicate preferentially in Th2 and Th0 cells". En: *Science* Vol. 265, N° 5169: 244-248. Washington DC.
- MAGOMBEDZE, Gesham et al. (2013). "Cellular and plasticity of helper CD4(+) T cell responses". En: *Front Physiol*. Vol. 16, N° 4: 206. Lausanne.
- MAHAJAN, Supriya et al. (2010). "Role of chemokine and cytokine polymorphisms in the progression of HIV-1 disease". En: *Biochem Biophys Res Commun*. Vol. 396, N° 2: 348-52. Amsterdam.
- MANDY, Francis et al. (2003). "Guidelines for performing CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus". En: *Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep*. Vol. 31, N° 52: 1-13. Atlanta.
- MATSUMOTO, Koichiro et al. (2004). "Decrease of interleukin-10-producing T cells in the peripheral blood of severe unstable atopic asthmatics". En: *Int Arch Allergy Immunol*. Vol. 134: 295-302. Basel.
- MOSMANN, Tim y MOORE, Kevin (1991). "The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses". En: *Immunol Today* Vol. 12, N° 3: A 49-53. Atlanta.
- NAKAJIMA, Koichi et al. (1989). "Induction of IL-6 (B cell stimulatory factor-2/IFN-beta 2) production by HIV". En: *J Immunol*. Vol. 142, N° 2: 531-536. Atlanta.
- ONLAMOON, Nattawat et al. (2003). "Intracellular production of type I and type II cytokines during

- HIV-1 progression in Thai patients". En: *Asian Pac J Allergy Immunol*. Vol. 21, N° 1: 43-48. Bangkok.
- OSTROWSKI, Sisse et al. (2003). "Impaired production of cytokines in an independent predictor of mortality in HIV-1-infected patients". En: *AIDS* Vol. 17, N° 4: 521-530. Geneva.
- RAY, Krishna et al. (2006). "CD4/CD8 lymphocyte counts in healthy, HIV-positive individuals and AIDS patients". En: *Indian J Med Res*. Vol. 124, N° 3: 319-330. New Delhi.
- SAVILLE, Wayne et al. (1994). "Interleukin-10 supresses human immunodeficiency virus-1 replication in vitro in cells of the monocyte/macrophage lineage". En: *Blood* Vol. 83, N° 12: 3591-3599. Washington DC.
- SRIKANTH P. et al. (2000). "Increase in plasma IL-10 levels and rapid loss of CD4<sup>+</sup> T cells among HIV-infected individuals in south India". En: *Int J STD AIDS* Vol. 11, N° 1: 49-51. London.
- STELMACH, Iwona et al. (2002). "IL-10 serum levels in children with moderate asthma". En: *Pneumonol Alergol Pol*. Vol. 70: 25-33. Varsovia.
- STREETZ, Konrad et al. (2001). "Mediators of inflammation and acute phase response in the liver". En: *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* Vol. 47, N° 4: 661-673. Poitiers.
- STYLIANOU, Eleny et al. (1999). "IL-10 in HIV infection: increasing serum IL-10 levels with disease progression down-regulatory effect of potent anti-retroviral therapy". En: *Clin Exp Immunol*. Vol. 116, N° 1: 115-120. London.
- TÁRNOK, Attila et al. (2003). "Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum". En: *Clin Chem*. Vol 49, N° 6: 1000-1002. Washington DC.
- TORRESA, Héctor et al. (2008). "Aplicación clínica de una prueba de producción de interferón gamma para el diagnóstico de tuberculosis latente en poblaciones hospitalarias de riesgo". En: *Med Clin (Barc)* Vol. 130, N° 20: 761-766. Barcelona.
- TUDELA, Enrique et al. (2014). "Cytokine levels in plasma samples of individuals with HIV infection". En: *Austin J Clin Immunol*. Vol. 1, N° 1: 1003. New Jersey.
- VYAKARNAM, Annapurna et al. (1995). "Th1 cells specific for HIV-1 gag p24 are less efficient than Th0 cells in supporting HIV replication, and inhibit virus replication in Th0 cells". En: *Immunology* Vol. 86, N° 1: 85-96. London.
- WOLF, Katja et al. (2002). "Antiretroviral therapy reduces markers of endothelial and coagulation activation in patients infected with human immunodeficiency virus type 1". En: *J Infect Dis*. Vol. 185, N° 4: 456-462. Oxford.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2013). "Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013". *UNAIDS / JC2502/1/E*. Geneva.