

# Inmunofenotipo de progresión a sida: deficiencia, activación y disfunción de células T CD4 y CD8\*

J. Carbone<sup>a</sup>, J. M. Peña<sup>b</sup>, J. Gil<sup>a</sup>, J. M. Benito<sup>c</sup> y E. Fernández-Cruz<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

<sup>b</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario la Paz. Madrid. <sup>c</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Carlos III. Madrid.

**Introducción.** Uno de los elementos que mayor peso tiene en la decisión del momento de inicio de terapia antirretroviral es el riesgo de progresión a sida. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el perfil inmunofenotípico basal de pacientes que progresan a sida.

**Material y métodos.** Estudio transversal de la distribución de subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4+ y CD8+ en 85 pacientes adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se analizaron los valores observados a la entrada de los pacientes en un estudio prospectivo. Los valores de los pacientes progresores y no progresores se compararon con grupos control sin infección VIH. Las subpoblaciones linfocitarias se estudiaron mediante citometría de flujo incluyendo los marcadores CD3, CD4, CD7, CD8, CD45RO, CD38, HLA-DR y CD25.

**Resultados.** El perfil inmunofenotípico que precede a la progresión a sida se caracteriza principalmente por un aumento de células de memoria (CD45RO+) CD4+ y CD8+ activadas, aumento de células CD4+ y CD8+ totales activadas y por un incremento de células T CD4+ que han perdido la expresión de marcadores como el receptor de la IL-2 (CD25-) o del marcador de diferenciación CD7 (CD7-). Los pacientes que no reunían en el estudio basal criterios de laboratorio para iniciar tratamiento antirretroviral (> 350 células CD4+ y < 30.000 copias ARN-VIH-1/ml) mostraron también más activación sobre células CD4+ y CD8+ (CD4+CD38+DR+, CD8+CD38+).

**Discusión.** El que la activación inmunológica pueda contribuir al deterioro clínico e inmunológico de los pacientes es un elemento adicional que podría tenerse en cuenta a la hora de decidir cuándo iniciar terapia antirretroviral.

**PALABRAS CLAVE:** VIH, CD4+CD38+DR+, CD4+CD45RO+CD7-, CD4+CD45RO+CD25-, progresión, activación.

Carbone J, Peña JM, Gil J, Benito JM, Fernández-Cruz E. Inmunofenotipo de progresión a sida: deficiencia, activación y disfunción de células T CD4 y CD8. Rev Clin Esp. 2006;206(4):172-7.

Immunophenotype of progression to AIDS: deficiency, activation and dysfunction of CD4 and CD8 T-cells

**Introduction.** One key piece of information required when deciding whether to initiate antiretroviral therapy is the risk of AIDS. The aim of this study was to better characterize the baseline immunophenotypic profile of patients with progression to AIDS.

**Material and methods.** A cross-sectional analysis of the distribution of functional subpopulations of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in 85 intravenous drug addicts with HIV infection. The values observed on patient enrolment in a prospective study were analyzed. Those patients who progressed and did not progress were compared to the HIV-negative controls. Lymphocyte subpopulations were studied by flow cytometry, including the markers: CD3, CD4, CD7, CD8, CD45RO, CD38, HLA-DR and CD25.

**Results.** The immunophenotypic profile that precedes progression to AIDS was mainly characterized by an increase in memory (CD45RO) activated cells and total activated CD4+ and CD8+ cells, and by an increase of T CD4+ cells that have loss expression of markers as receptor or the differentiation marker CD7 (CD7-). Patients not meeting laboratory criteria to initiate antiretroviral therapy (>350 CD4+ T-cells and <30,000 HIV-ARN-copies/ml) also showed increased levels of CD4+ and CD8+ activation subsets (CD4+CD38+DR+, CD8+CD38+).

**Discussion.** The fact that immunological activation may contribute to immunological and clinical deterioration of HIV-positive patients might be an additional factor which should be taken into account when deciding whether to initiate antiretroviral therapy.

**KEY WORDS:** HIV, CD4+CD38+DR+, CD4+CD45RO+CD7-, CD4+CD45RO+CD25-, progression, activation.

Correspondencia: J. Carbone.  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón.  
C./ Dr. Esquerdo, 46.  
28007 Madrid.  
Correo electrónico: carbone@teleline.es

Aceptado para su publicación el 15 de junio de 2005.

\*Este estudio ha contado con ayudas de investigación de la Comunidad Autónoma de Madrid y del Fondo de Investigación Sanitaria a E.F.-C.

## Introducción

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) causa una activación inmunológica persistente que conduce a una situación de disfunción del sistema inmunológico<sup>1</sup>. Tal disfunción inmunológica

participa directamente en la patogénesis del sida<sup>1</sup>. Los cambios que se producen en la activación linfocitaria preceden en mucho tiempo a la progresión a sida<sup>2</sup>. Estudios previos han identificado subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ como marcadores de activación que añaden poder predictivo de progresión a sida a los dos marcadores clásicos: las cifras de células T CD4+ y la viremia ARN-VIH-1<sup>3-9</sup>.

La elevada prevalencia de complicaciones producidas por el tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha suscitado el debate sobre el momento más adecuado para iniciarlo. Uno de los elementos que tiene mayor peso en esta decisión es el riesgo de progresión a sida, siendo los marcadores clásicos antes mencionados los utilizados para definir este riesgo<sup>10,11</sup>.

Además de la activación linfocitaria, otros mecanismos patogénicos que se pueden estudiar a través del análisis de subpoblaciones linfocitarias incluyen la ausencia de marcadores de membrana en linfocitos T CD4+ (como antígenos de diferenciación del linfocito T o receptores de citocinas)<sup>12,13</sup>. Algunas de estas subpoblaciones se han asociado también con una mayor tasa de progresión a sida<sup>14,15</sup>.

No existen trabajos en los cuales se hayan analizado simultáneamente estos componentes distintos tratando de establecer un perfil inmunofenotípico asociado a progresión. La definición de este tipo de perfiles inmunofenotípicos puede ser útil para discriminar entre pacientes que, analizados desde la perspectiva de los niveles de linfocitos T CD4+ y viremia ARN-VIH-1, serían considerados similares. Igualmente podría ser útil en la evaluación del tratamiento antirretroviral y de nuevas aproximaciones terapéuticas<sup>10</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar el perfil inmunofenotípico basal de pacientes que progresan a sida, abarcando desde la activación linfocitaria hasta la pérdida de expresión de moléculas importantes en la superficie de los linfocitos T CD4+.

## Material y métodos

Los pacientes estudiados fueron 85 individuos infectados por VIH-1 pertenecientes a una cohorte de sujetos adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) en la Comunidad de Madrid. Los pacientes estaban incluidos en un estudio prospectivo para la identificación de subpoblaciones linfocitarias activadas con poder predictivo de progresión a sida. Las características demográficas y clínicas de los pacientes y los detalles del estudio prospectivo se han descrito con anterioridad y pueden verse resumidas en la tabla 1<sup>3</sup>. Mediante un análisis observacional transversal estudiamos la distribución y la correlación de diferentes subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4+ y CD8+ en el momento de entrada de los pacientes en el estudio prospectivo (estudio basal). Los pacientes fueron seguidos por una media de  $37 \pm 13$  meses. Diecinueve pacientes (22%) progresaron clínicamente a sida y 66 (88%) permanecieron libres de él. No había una diferencia significativa en el tipo de terapia antirretroviral utilizada en ambos grupos en el momento del estudio inmunológico. El tiempo medio de evolución a sida fue de  $7,78 \pm 0,8$  años desde el momento en que se diagnosticó la infección por VIH. Las condiciones específicas definitorias de sida y otras complicaciones observadas durante el seguimiento se presentan en la tabla 2. Teniendo en cuenta que el uso

TABLA 1  
**Características clínicas de los pacientes con infección VIH en el momento del estudio inmunológico inicial**

Antecedentes clínicos	Progresores (n = 19)	No progresores (n = 66)
Sexo		
Hombres; n (%)	18 (95)	49 (74)
Mujeres; n (%)	1 (5)	17 (26)
Edad		
Media (años)	34	34
Rango (años)	29-41	26-49
Enfermedades infecciosas		
Coinfección por VHC; n (%)	16 (84)	53 (80)
Coinfección por VHB; n (%)	12 (63)	37 (56)
Tratamiento ARV en el estudio basal; n (%)	11 (58)	26 (39)
Estadio clínico A de CDCP; n (%)	7 (37)	41 (62)
Estadio clínico B de CDCP; n (%)	12 (63)	25 (38)
Cifra de células T CD4+ Media, porcentaje (número absoluto)	13 (271)	24 (491)
Viremia ARN-VIH-1 Media, copias/ml ( $\log_{10}$ )	31.628 (4,16)	4.716 (2,53)

ARV: antirretroviral; TARGA: tratamiento antirretroviral de gran actividad; CDCP: Centers for disease control and prevention.

de drogas (heroína, cocaína, etc.) por vía parenteral podría afectar a los valores de linfocitos T y/o a algunas de sus subpoblaciones, se compararon los porcentajes de las diferentes subpoblaciones T CD4+ y CD8+ con los de un grupo de 27 sujetos ADVP no infectados por VIH. Ninguno de ellos presentaba enfermedad infecciosa activa en el momento del estudio. Como grupo control sano se incluyeron 39 sujetos no infectados por VIH y que nunca habían utilizado drogas (heroína, cocaína, etc.) por vía parenteral.

TABLA 2  
**Criterios de sida y complicaciones observadas durante el seguimiento en 19 pacientes progresores**

Datos clínicos	Número (%)
<b>Criterio de sida según CDCP</b>	
Esofagitis por <i>Candida</i>	6 (32)
Neumonía recurrente	5 (26)
Tuberculosis	4 (21)
Neumonía por <i>Pneumocystis carinii</i>	3 (16)
Toxoplasmosis cerebral	3 (16)
Síndrome caquetizante debido al VIH	2 (11)
Retinitis por citomegalovirus	1 (5)
Sarcoma de Kaposi	1 (5)
Criptococosis extrapulmonar	1 (5)
Sepsis por <i>Salmonella</i>	1 (5)
Infección por <i>Mycobacterium avium</i> diseminada	1 (5)
Leucoencefalopatía multifocal progresiva	1 (5)
<b>Complicaciones no definitorias de sida</b>	
Hepatopatía crónica	14 (74)
Candidiasis oral	14 (74)
Trombocitopenia crónica	13 (68)
Herpes zoster	6 (32)
Pancitopenia	4 (21)
Septicemia	4 (21)
Tromboembolismo pulmonar	2 (11)

CDCP: Centers for disease control and prevention.

TABLA 3  
Combinaciones de anticuerpos monoclonales para el análisis fenotípico de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ y definición funcional

FL1-FITC	FL2-PE	FL3-PerCP	Inmunofenotipo	Definición funcional de células T CD4+ o CD8+
Anti-CD7	Anti-CD45RO	Anti-CD4	CD4+CD45RO-	No expuestas ( <i>naive</i> )
			CD4+CD45RO+	Memoria
			CD4+CD45RO+CD7-	Memoria sin expresión de CD7*
Anti-CD25	Anti-CD45RO	Anti-CD4	CD4+CD45RO+CD25-	Memoria sin expresión de CD25**
Anti-CD38	Anti-CD45RO	Anti-CD4	CD4+CD45RO+CD38+	Memoria activadas
Anti-HLA DR	Anti-CD45RO	Anti-CD4	CD4+CD45RO+DR+	Memoria activadas
Anti-CD38	Anti-HLA DR	Anti-CD4	CD4+CD38+DR+	Totales activadas***
			CD4+CD38-DR-	No activadas ( <i>resting</i> )
Anti-CD38	Anti-CD45RO	Anti-CD8	CD8+CD45RO-	No expuestas ( <i>naive</i> )
			CD8+CD45RO+	Memoria***
			CD8+CD45RO+CD38+	Memoria activadas***
			CD8+CD38+	Totales activadas***
Anti-HLA DR	Anti-CD45RO	Anti-CD8	CD8+CD45RO+DR+	Memoria activadas***
Anti-HLA DR	Anti-CD38	Anti-CD8	CD8+CD38+DR+	Totales activadas***
			CD8+CD38-DR-	No activadas ( <i>resting</i> )

\* CD7: uno de los primeros marcadores de diferenciación del linfocito T. Proliferan mal frente a estímulos *in vitro*<sup>18</sup>. \*\*: CD25: cadena alfa del receptor de la IL-2. Células con baja tasa de proliferación linfocitaria y tendencia a la apoptosis<sup>20</sup>. \*\*\* Subpoblaciones linfocitarias con poder predictivo independiente de la cifra de CD4 y viremia ARN-VIH-1<sup>3,9</sup>. FL: anticuerpos monoclonales marcados con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FL1-FITC), ficoeritrina (FL2-PE) o *peridinin chlorophyll protein* (FL3-PerCP).

### Estudio de subpoblaciones linfocitarias

Las muestras de sangre fueron estudiadas en fresco y marcadas con anticuerpos monoclonales frente a un amplio panel de marcadores de activación y diferenciación, permitiendo la identificación de células no expuestas (células *naive*), de memoria, activadas, no activadas y disfuncionales de linfocitos T CD4+ y CD8+. En este trabajo definimos como subpoblaciones disfuncionales aquellas subpoblaciones T CD4+ que no expresan marcadores de membrana, como la molécula de diferenciación CD7 (CD7-) o la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25-). La técnica utilizada fue la de inmunofluorescencia directa mediante citometría de flujo de tres colores. Los detalles de adquisición y análisis de las células se han descrito antes<sup>3</sup>. La definición funcional de las distintas subpoblaciones estudiadas se puede ver en la tabla 3.

### Cuantificación de la viremia ARN-VIH-1

Los niveles de viremia ARN-VIH-1 en plasma se determinaron mediante RT-PCR (Ultrasensitive Amplicor HIV Test, Roche Molecular Systems). El punto de corte de detección fue el de 50 copias/ml de ARN-VIH-1 (1,7 log<sub>10</sub>/ml). El límite superior de cuantificación fue de 75.000 copias/ml.

### Estadística

Los pacientes infectados por VIH fueron estratificados en dos grupos según la progresión a sida observada en el estudio de seguimiento. La normalidad de la distribución de las variables en cada grupo se estableció mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Las diferencias en las medias de los porcentajes de las subpoblaciones estudiadas de los distintos grupos de pacientes y controles se evaluó mediante las pruebas de análisis de la varianza (ANOVA) o mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando se encontró una diferencia significativa global entre grupos se identificaron dichas diferencias mediante la prueba de Bonferroni. La asociación entre las variables se realizó mediante las pruebas de Pearson o la prueba no paramétrica de Spearman (en los casos de variables con distribución no normal). Se identificó el punto de corte más óptimo de las subpoblaciones linfocitarias, que

mostraron valor pronóstico independiente del recuento de CD4 y de la viremia ARN-VIH-1 en estudios previos. Para ello se utilizó el método de curvas operativas para el receptor (ROC). Todos los cálculos estadísticos se hicieron con el paquete informático SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

### Resultados

En las tablas 4 y 5 se presentan los porcentajes de las subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4+ y CD8+ de los pacientes infectados por VIH en comparación con los de los controles no infectados. El perfil inmunofenotípico que precede a la progresión

TABLA 4  
Análisis cuantitativo de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ en pacientes con infección VIH y controles sin infección VIH

Linfocitos T CD4+**	Pacientes con infección VIH*		Controles sin infección VIH	
	Progresor	No progresor	ADVP	Sujetos sanos
CD45RO-	20 ± 4 <sup>a, c, d</sup>	37 ± 2 <sup>b</sup>	39 ± 2 <sup>b</sup>	36 ± 2 <sup>b</sup>
CD45RO+	79 ± 4 <sup>a, c, d</sup>	62 ± 2 <sup>b</sup>	61 ± 2 <sup>b</sup>	64 ± 2 <sup>b</sup>
CD45RO+CD38+	45 ± 4 <sup>a, c, d</sup>	28 ± 1 <sup>b, c, d</sup>	13 ± 1 <sup>a, b</sup>	17 ± 2 <sup>a, b</sup>
CD45RO+DR+	40 ± 5 <sup>a, c, d</sup>	17 ± 1 <sup>b, c, d</sup>	6 ± 1 <sup>a, b</sup>	6 ± 1 <sup>a, b</sup>
CD38+DR+	34 ± 6 <sup>a, c, d</sup>	11 ± 1 <sup>b, c, d</sup>	2 ± 0,2 <sup>a, b</sup>	4 ± 1 <sup>a, b</sup>
CD38-DR-	23 ± 3 <sup>a, c, d</sup>	32 ± 1 <sup>b, c, d</sup>	48 ± 2 <sup>a, b</sup>	50 ± 2 <sup>a, b</sup>
CD45RO+CD25-	71 ± 4 <sup>a, c, d</sup>	49 ± 2 <sup>b</sup>	49 ± 2 <sup>b</sup>	51 ± 2 <sup>b</sup>
CD45RO+CD7-	22 ± 3 <sup>a, c, d</sup>	12 ± 1 <sup>b</sup>	14 ± 1 <sup>b</sup>	12 ± 1 <sup>b</sup>

\* Pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) estratificados según progresión posterior a sida. Cifras basales de las subpoblaciones T CD4+ en pacientes con infección VIH a la entrada del estudio. \*\* Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ expresados como porcentaje del total de linfocitos T CD4+. <sup>a</sup>: valores significativamente distintos a los de los pacientes no progresores; <sup>b</sup>: valores significativamente distintos a los de los pacientes progresores; <sup>c</sup>: valores significativamente distintos a los de los controles adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) sin infección VIH; <sup>d</sup>: valores significativamente distintos a los de los controles sanos.

TABLA 5  
**Análisis cuantitativo de las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en pacientes con infección VIH y controles sin infección VIH**

Linfocitos T CD8+**	Pacientes con infección VIH*		Controles sin infección VIH	
	Progresor	No progresor	ADVP	Sujetos sanos
CD45RO-	30 ± 4 <sup>c, d</sup>	35 ± 2 <sup>c, d</sup>	57 ± 3 <sup>a, b</sup>	55 ± 2 <sup>a, b</sup>
CD45RO+	70 ± 4 <sup>c, d</sup>	63 ± 2 <sup>c, d</sup>	43 ± 3 <sup>a, b</sup>	45 ± 2 <sup>a, b</sup>
CD45RO+CD38+	54 ± 4 <sup>a, c, d</sup>	37 ± 2 <sup>b, c, d</sup>	5 ± 1 <sup>a, b</sup>	7 ± 1 <sup>a, b</sup>
CD45RO+DR+	50 ± 5 <sup>a, c, d</sup>	40 ± 2 <sup>b, c, d</sup>	10 ± 1 <sup>a, b</sup>	10 ± 1 <sup>a, b</sup>
CD38+	81 ± 2 <sup>a, c, d</sup>	64 ± 2 <sup>b, c, d</sup>	28 ± 3 <sup>a, b</sup>	33 ± 3 <sup>a, b</sup>
CD38+DR+	55 ± 4 <sup>a, c, d</sup>	40 ± 2 <sup>b, c, d</sup>	7 ± 2 <sup>a, b</sup>	6 ± 1 <sup>a, b</sup>
CD38-DR-	10 ± 2 <sup>a, c, d</sup>	20 ± 1 <sup>b, c, d</sup>	62 ± 3 <sup>a, b</sup>	54 ± 2 <sup>a, b</sup>

\*Pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) estratificados según progresión posterior a sida. Cifras basales de las subpoblaciones T CD8+ en pacientes con infección VIH a la entrada del estudio.

\*\*Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T CD8+ expresados como porcentaje del total de linfocitos T CD8+. <sup>a</sup>: valores significativamente distintos a los de los pacientes no progresores; <sup>b</sup>: valores significativamente distintos a los de los pacientes progresores; <sup>c</sup>: valores significativamente distintos a los de los controles adictos a drogas por vía parenteral (ADVP) sin infección VIH; <sup>d</sup>: valores significativamente distintos a los de los controles sanos.

a sida se caracteriza por: a) aumento de células T CD4+ y CD8+ de memoria (CD45RO+) y disminución del porcentaje de células T CD4+ no expuestas (vírgenes o *naive*); b) aumento de células de memoria CD4+ y CD8+ activadas, identificadas porque expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (HLA-DR) o de la ectoenzima de membrana CD38; c) aumento del porcentaje de células T CD4+ y CD8+ totales activadas (CD4+CD38+DR+, CD8+CD38+, CD8+CD38+DR+); d) disminución de células T CD4+ y CD8+ no activadas (CD4+CD38-DR-, CD8+CD38-DR-); e) aumento en el porcentaje de células T CD4+ de memoria que no ex-

presan la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD4+CD45RO+CD25-), y f) aumento del porcentaje de células T CD4+ de memoria que han perdido la expresión del marcador de diferenciación CD7 (CD4+CD45RO+CD7-). Tales alteraciones no estarían en relación con la exposición a drogas en estos pacientes, ya que el grupo de adictos no infectados por VIH mostró un patrón inmunofenotípico indistinguible del otro grupo control no ADVP sano.

En la tabla 6 se muestran las correlaciones entre el número absoluto de linfocitos T CD4+, el de subpoblaciones seleccionadas activadas T CD4+ y CD8+ que han mostrado poder predictivo de progresión a sida independiente de CD4 y viremia en estudios previos<sup>3</sup> y el resto de subpoblaciones T CD4+ y CD8+ analizadas. En los pacientes que progresaron a sida, porcentajes más altos de marcadores que suponen un mayor estímulo antigénico de las células T CD4+ y CD8+ (aumento de células de memoria, activadas y disfuncionales) se asocian a cifras más bajas de células T CD4+; mientras que un nivel aumentado de células CD4+ no expuestas (*naive*) y no activadas CD4+ y CD8+ (*resting*) se asocia a un mayor número de linfocitos T CD4+. Cuando analizamos la correlación entre los distintos tipos de alteración funcional observamos que la activación de linfocitos T CD4+ se correlaciona positivamente con la activación de linfocitos T supresores/citotóxicos (CD8+). Además, la disfunción de los linfocitos T CD4+ (definida como la pérdida de expresión de las moléculas CD25 y CD7) se correlaciona positivamente con la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+. A su vez, los dos componentes de disfunción estudiados se encuentran relacionados entre sí, de tal manera que el porcentaje de células CD4+ de memoria que son CD7- (CD4+CD45RO+CD7-) se asocia positivamente con el de células de memoria que no expresan la molécula CD25 (CD4+CD45RO+CD25-,

TABLA 6  
**Coefficientes de correlación del recuento de células T CD4+ y de los porcentajes de subpoblaciones activadas T CD4+ y CD8+ con diferentes subpoblaciones T CD4+ y CD8+**

Inmunofenotipo	Pacientes con infección VIH					
	Progresores			No progresores		
	CD4+	CD4+CD38+DR+	CD8+CD38+	CD4+	CD4+CD38+DR+	CD8+CD38+
<b>Células T CD4+</b>						
CD45RO+	-0,817**	0,582*	0,414	-0,449**	0,246	0,189
CD45RO+CD38+	-0,634**	0,826**	0,866**	-0,394**	0,578**	0,493**
CD45RO+DR+	-0,703**	0,666**	0,547*	-0,432**	0,699**	0,258
CD38+DR+	-0,514*	—	0,803**	-0,522**	—	0,524**
CD38-DR-	0,406	-0,773**	-0,739**	0,305*	-0,574**	-0,583**
CD45RO+CD25-	-0,631*	0,486*	0,479	-0,191	0,13	-0,031
CD45RO+CD7-	-0,552*	0,563*	0,480*	-0,208	0,167	0,092
<b>Células T CD8+</b>						
CD45RO+	-0,484*	0,16	0,204	-0,459**	0,306*	0,379**
CD45RO+CD38+	-0,531*	0,465	0,563*	-0,493**	0,554**	0,845**
CD45RO+DR+	-0,294	0,229	0,232	-0,381**	0,424**	0,492**
CD38+	-0,486*	0,803**	—	-0,405**	0,524**	—
CD38+DR+	-0,445	0,519*	0,508*	-0,414**	0,528**	0,742**
CD38-DR-	0,483*	-0,621*	-0,619**	0,314*	-0,378**	-0,812**

Nivel de significación: \*<0,05; \*\*<0,01; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.



coeficiente de correlación +0,658 [ $p < 0,0001$ ]). Cuando analizamos estas mismas correlaciones en los pacientes infectados por VIH no progresores observamos una asociación entre activación en linfocitos T CD4+ y CD8+ y el nivel de células T CD4+, pero la ausencia de antígenos de membrana en las células T CD4+ no se asoció a pérdida de células T CD4+ ni a la activación de células T CD4+ y CD8+. Globalmente, la relación negativa entre activación o disfunción y nivel de CD4 no se observó en los controles VIH-1 negativos (datos no mostrados).

Finalmente estratificamos a los pacientes según su situación inmunológica y virológica en el momento del estudio inicial, utilizando para ello parámetros recomendados por directrices para el empleo de fármacos antirretrovirales en adultos y adolescentes sugeridas por el Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos<sup>16</sup> (pacientes con valores de células T CD4+  $> 350$  células/mm<sup>3</sup> y viremia ARN-VIH-1  $< 30.000$  copias/ml frente a pacientes con recuento de células T CD4+  $< 350$  células/mm<sup>3</sup> o viremia ARN-VIH-1  $> 30.000$  copias/ml). Una vez estratificados, 43 pacientes (51%) no reunían criterios para iniciar tratamiento antirretroviral en el momento de su entrada en el estudio y 42 (49%) sí reunían criterios para iniciar el tratamiento utilizando los mencionados criterios. El 12% de los pacientes que no reunían los criterios para iniciar el tratamiento evolucionó a sida en comparación con un 33% de los pacientes que sí los reunían ( $p = 0,015$ ). En la tabla 7 se presentan los porcentajes de distintas subpoblaciones linfocitarias en los pacientes estratificados, según los cri-

terios antes mencionados, y en los controles sanos. Se observó que incluso los pacientes que no reunían en ese momento los criterios de laboratorio para iniciar tratamiento antirretroviral tenían globalmente más activación sobre células T CD4+ y CD8+, y este hecho se asoció negativamente con el nivel de células T CD4+ (coeficientes de correlación entre células CD4+CD38+DR+, CD8+CD38+ y número de linfocitos T CD4+:  $-0,411$  [0,013] y  $-0,424$  [0,005], respectivamente). Por otro lado, estos pacientes eran indistinguibles de los controles sanos en cuanto al nivel de células T CD4+ y CD8+ con pérdida de expresión de antígenos de membrana y el porcentaje de estas subpoblaciones no se correlacionó con el nivel de células T CD4+ (datos no mostrados).

En la tabla 8 se muestran los puntos de corte óptimos para las subpoblaciones linfocitarias T CD4+CD38+DR+ y CD8+CD38+. En la cohorte estudiada el riesgo de progresar a sida se asoció con la presencia de porcentajes mayores del 21% de células CD4+CD38+DR+ y mayores del 77% de células CD8+CD38+.

## Discusión

En el momento actual nos encontramos aún lejos de tener una solución terapéutica eficaz para el control de la infección por el VIH. Entre diversos factores que condicionan esta situación está la compleja interacción que se establece entre el virus y el sistema inmunológico<sup>1</sup>. El conocimiento del perfil inmunofenotípico que presentamos puede ayudar a entender parte de esta compleja interacción<sup>17</sup>.

Como se ha comentado antes, algunos parámetros de activación inmunológica pueden predecir la progresión clínica a lo largo de la infección por el VIH<sup>3,9</sup>. Porcentajes aumentados de las subpoblaciones activadas de linfocitos se asocian con procesos de localización de los linfocitos en tejidos<sup>18</sup>, con fenómenos de apoptosis de linfocitos<sup>19</sup> o con defectos proliferativos de los linfocitos T de memoria<sup>20</sup>.

La regulación negativa de marcadores de membrana ha sido poco estudiada en la infección VIH. Se ha asociado con un estadio disfuncional de anergia y con la incapacidad de los linfocitos para proliferar normalmente en respuesta a diversos estímulos antigénicos<sup>20-22</sup>.

TABLA 7  
**Análisis cuantitativo de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes con infección VIH estratificados según cifras basales de linfocitos T CD4+ y viremia ARN-VIH-1 en comparación con controles sin infección VIH**

Subpoblaciones**	Pacientes con infección VIH*		Controles sin infección VIH	
	CD4 $> 350$ y viremia $< 30.000$	CD4 $< 350$ o viremia $> 30.000$	ADVP	Sujetos sanos
CD4+CD38+DR+	11 $\pm$ 2 <sup>a, c, d</sup>	23 $\pm$ 3 <sup>b, c, d</sup>	2 $\pm$ 0,2 <sup>a, b</sup>	4 $\pm$ 1 <sup>a, b</sup>
CD4+CD38-DR-	34 $\pm$ 2 <sup>a, c, d</sup>	26 $\pm$ 2 <sup>b, c, d</sup>	48 $\pm$ 2 <sup>a, b</sup>	50 $\pm$ 2 <sup>a, b</sup>
CD4+CD45RO+CD7-	11 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 2 <sup>b, c, d</sup>	14 $\pm$ 1 <sup>b</sup>	12 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
CD4+CD45RO+CD25-	48 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	59 $\pm$ 3 <sup>b, c, d</sup>	49 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	51 $\pm$ 2
CD8+CD38+	62 $\pm$ 2 <sup>a, c, d</sup>	73 $\pm$ 2 <sup>b, c, d</sup>	28 $\pm$ 3 <sup>a, b</sup>	33 $\pm$ 3 <sup>a, b</sup>
CD8+CD38+DR+	37 $\pm$ 2 <sup>a, c, d</sup>	50 $\pm$ 3 <sup>b, c, d</sup>	7 $\pm$ 2 <sup>a, b</sup>	6 $\pm$ 1 <sup>a, b</sup>
CD8+CD38-DR-	21 $\pm$ 2 <sup>c, d</sup>	15 $\pm$ 1 <sup>c, d</sup>	62 $\pm$ 3 <sup>a, b</sup>	54 $\pm$ 2 <sup>a, b</sup>

\*Cifras basales de las subpoblaciones T CD4+ y CD8+ en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a la entrada del estudio. \*\*Porcentajes de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ expresados como porcentaje del total de linfocitos T CD4+ o CD8+. <sup>a</sup>: valores significativamente distintos a los de los pacientes con recuento de linfocitos T CD4+  $< 350$  células/mm<sup>3</sup> o viremia ARN-VIH-1  $> 30.000$  copias/ml en el estudio basal; <sup>b</sup>: valores significativamente distintos a los de los pacientes con recuento de linfocitos T CD4+  $> 350$  células/mm<sup>3</sup> y viremia ARN-VIH-1  $< 30.000$  copias/ml en el estudio basal; <sup>c</sup>: valores significativamente distintos a los de los controles adictos a drogas por vía parenteral sin infección VIH; <sup>d</sup>: valores significativamente distintos a los de los controles sanos.

TABLA 8  
**Puntos de corte asociados al riesgo de progresar a sida de subpoblaciones seleccionadas de linfocitos T CD4+ y CD8+ en 95 pacientes VIH+ ADVP\***

Subpoblación	Área**	IC 95%***	Punto de corte	Especificidad	Sensibilidad
CD4+CD38+DR+	0,874	0,762-0,987	21%	90%	70%
CD8+CD38+	0,819	0,730-0,909	77%	77%	70%
CD4+CD45RO+CD7-	0,779	0,648-0,909	21%	90%	60%
CD4+CD45RO+CD25-	0,866	0,758-0,974	66%	90%	60%

\*Establecidos mediante curvas operativas para el receptor (ROC). \*\*Área bajo la curva. \*\*\*Intervalo de confianza al 95%.

El correlato inmunofenotípico que hemos definido es coherente, especialmente en lo relacionado con la activación linfocitaria, con el propuesto en diversos estudios realizados previamente en pacientes con infección por VIH-1 adquirida por otras vías<sup>4,9</sup>. Este estudio amplía además el correlato de progresión a sida hacia el componente de disfunción de los linfocitos T CD4+, definido como pérdida de antígenos de membrana, y demuestra que existe una vinculación entre los componentes de inmunodeficiencia, activación y disfunción linfocitaria. Estudios complementarios son necesarios para caracterizar funcionalmente este correlato inmunológico de progresión a sida. Una limitación del presente trabajo radica en que la correlación entre activación y pérdida de expresión de antígenos de membrana se ha observado sólo en individuos ADVP VIH+, debiéndose verificar en pacientes VIH+ con otros factores de riesgo. Curiosamente, la activación inmunológica y otros componentes de disfunción de los linfocitos reflejan un deterioro inmunológico, incluso en aquellos pacientes que tienen una situación inmunológica y virológica que no los haría tributarios de tratamiento con directrices recientemente publicadas<sup>16</sup>. La medición de estos marcadores complementarios podría, por tanto, ser de utilidad para una indicación más precisa de tratamientos, especialmente en aquellos casos de más difícil decisión terapéutica por presentar datos límites con los marcadores clásicos. Los porcentajes de distintas subpoblaciones linfocitarias han mostrado poder predictivo independiente de progresión a sida utilizando para ello el análisis de supervivencia<sup>3,9</sup>. Algunas de estas subpoblaciones, como la de linfocitos T CD8+CD38+, tienen poder predictivo independiente en pacientes con distintos factores de riesgo<sup>3,6</sup>. En la cohorte estudiada de pacientes VIH+ ADVP hemos identificado puntos de corte orientativos asociados al riesgo de progresar a sida de esta última y otras subpoblaciones funcionales de linfocitos T CD4+ y CD8+. Son necesarios estudios con un mayor número de pacientes y con distintos factores de riesgo de infección para validar las distintas subpoblaciones funcionales linfocitarias como posibles marcadores con utilidad clínica. Un especial interés debiera tener el estudio de pacientes que no reúnen criterio para iniciar tratamiento antirretroviral con las recomendaciones actuales<sup>23</sup>.

### Agradecimientos

Los autores desean agradecer a la doctora María Muñoz-Fernández su contribución a la realización de la viremia ARN-VIH-1 de los pacientes. También agradecen a los técnicos de laboratorio Dolores de Marcos y Ana Hernández la realización de las técnicas de citometría de flujo para el recuento de células T CD4+.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Lawn SD, Butera ST, Folks TM. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):753-77.
2. Fahey JL, Taylor J, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med.* 1990;322:166-72.
3. Carbone J, Gil J, Benito JM, Navarro J, Muñoz A, Bartolomé J, et al. Increased levels of activated subsets of CD4+ T-cells add to the prognostic value of low CD4+ T-cell counts in a cohort of HIV-infected drug users. *AIDS.* 2000;14:2823-9.
4. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Kaplan AH, Detels R, Giorgi JV. CD8+ T lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998;18:332-40.
5. Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocidal JJ, Bach BA. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognosis value. *Clin Exp Immunol.* 1992;90:376-82.
6. Giorgi J, Liu Z, Hultin L, Cumberland W, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38+CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1993;6:904-12.
7. Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, et al. Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-infected patients. *AIDS.* 1996;10:827-34.
8. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A, et al. CD8+ CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1 infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997;14:158-62.
9. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, Giorgi JV. Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the multi-center AIDS cohort study than CD4+ cell count, soluble activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1997;16:83-92.
10. De Milito A, Titanji K, Zazzi M. Surrogate markers as a guide to evaluate response to antiretroviral therapy. *Curr Med Chem.* 2003;10:349-65.
11. Benito JM, González-Lahoz J. Lymphocyte subpopulations in HIV infection. *Med Clin (Barc).* 2004;122:24-6.
12. Wraitham M, Schimpf A, Pennington H, Walker F, Sewell H. HIV induces modulation of functionally important cellular antigens. *Clin Exp Immunol.* 1991;85:75-9.
13. Meroni L, Varchetta S, Manganaro D, Moscatelli G, Moroni M, Galli M. CD4+CD7- lymphocyte subset is expanded in HIV-infected patients with low CD4 cell count rescue during highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* 1999;13:621-2.
14. Carbone J, Gil J, Rodríguez-Sáinz C, Fernández-Cruz E. Expansion of CD4+CD45RO+CD25- T cells in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden. *AIDS.* 2004;18:1609-10.
15. Carbone J, Gil J, Benito JM, Muñoz-Fernández A, Fernández-Cruz E. Elevated levels of CD4+CD7- T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels and HIV-1-RNA quantification. *AIDS.* 2001;15:2459-560.
16. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos. Directrices para el empleo de fármacos antirretrovirales en adultos y adolescentes VIH+. Febrero de 2001.
17. Mildvan D, Landay A, de Gruttola V, Machado SG, Kagan J. An approach to the validation of markers for use in AIDS clinical trials. *Clin Infect Dis.* 1997;24:764-74.
18. Hengel RL, Jones BM, Kennedy MS, Hubbard MR, McDougal JS. Markers of lymphocyte homing distinguish CD4 T cell subsets that turn over in response to HIV-1 infection in humans. *J Immunol.* 1999;163:3539-48.
19. Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol.* 1995;154:5555-66.
20. Janossy G, Borthwick N, Lomnitzer R, Medina E, Squire SB, Phillips AN, et al. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. I. Predominant proliferative defects among CD45RO+ cells of the CD4 and CD8 lineages. *AIDS.* 1993;7:613-24.
21. Autran B, Legac E, Blanc C, Debre P. A Th0:Th2-like function of CD4+CD7- T helper cells from normal donors and HIV infected patients. *J Immunol.* 1995;154:1408-17.
22. Iyasere C, Tilton JC, Johnson AJ, Younes S, Yassine-Diab B, Sekaly RP, et al. Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J Virol.* 2003;77:10900-9.
23. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos. Directrices para el empleo de fármacos antirretrovirales en adultos y adolescentes VIH+. Octubre de 2004.