

La funcionalidad de los linfocitos TCD8+ durante la tuberculosis pulmonar activa en la infección por VIH

The Functionality of CD8 + T Lymphocytes during Active Lung Tuberculosis in HIV Infection

**Alfonzo, Miguel^{1*}; Suárez, José¹;
Gomegna, Mario²; Valenzuela, Patricia²;
Hung, Alida³ y Hernández, Dimas²**

¹Laboratorio de Inmunofisiología Celular,
Dpto. de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina,
Universidad Central de Venezuela.

²Servicio de Infectología. Hospital Vargas, Caracas, Venezuela.

³Laboratorio de Bioquímica, Dpto. de Ciencias Fisiológicas,
Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.

* miguelacho1998@hotmail.com

Resumen

El papel de las células TCD4+ en la inmunidad contra la tuberculosis ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, la función de las células TCD8+ en la co-infección VIH-1 y *M. tuberculosis* (VIH/*Mtb*) no está bien comprendida. Para determinar la funcionalidad de estas células TCD8+ de pacientes VIH+ con TB (tuberculosis) pulmonar activa se usaron diferentes parámetros inmunológicos. Los resultados indican que ambos grupos de pacientes VIH+ (con o sin TB activa) con la misma carga viral y cantidad de linfocitos TCD4+ en sangre, presentaron diferentes alteraciones en la frecuencia *ex vivo* para las moléculas CD95 y CD127 en células TCD8+ totales, vírgenes y memoria positivas, mientras que para la molécula HLA-DR, las diferencias fueron observadas en la población celular total. Además, las células TCD8+ de los pacientes con TB activa cultivadas por 72 h en presencia de PPD, presentaron baja proliferación y alta frecuencia de apoptosis inducida, así como baja producción de IFN- γ IL-10 y TNF- α en comparación a los Controles sanos. Estos datos sustentan la hipótesis que las células T CD8+ pierden su funcionalidad contra el *Mtb* durante la infección con VIH-1, lo cual puede ser responsable de la activación de la TB en los pacientes co-infectados.

Palabra clave: VIH, Tuberculosis, linfocitos T CD8+, citocinas.

Recibido: 22-06-12 / Aceptado: 28-06-12

Abstract

The role of CD4+ T-cells in immunity against tuberculosis has been extensively studied. However, the function of CD8+ T-cells in co-infections of HIV-1 and *M. tuberculosis* (VIH/Mtb) is not well understood. To evaluate the functionality of CD8+ T-cells from HIV+ patients having active TB, several immunological parameters were assayed. Results indicate that both HIV+ groups (with and without active TB), having the same viral load and peripheral blood CD4+ T and amount of lymphocytes in the blood, displayed different alterations in the *ex vivo* frequency for CD95 and CD127 markers in CD8+ T-cells, naive and memory positive cells, while for the HLA-DR marker, differences were observed in the total cell population. Moreover, CD8+ T-cells from TB-active patients, cultured for 72 h in the presence of PPD, showed a low proliferation rate and a high frequency of induced apoptosis as well as lower production of IFN- γ IL-10 and TNF- α cytokines compared to healthy control cells. These results support the hypothesis that CD8+ T-cells lose their functionality against *Mtb* during an HIV-1 infection, which could be responsible for the activation of TB in VIH/Mtb co-infected patients.

Keywords: HIV, tuberculosis, CD8+ T lymphocytes, cytokines.

Introducción

La progresiva pérdida de linfocitos TCD4+ y la susceptibilidad a infecciones oportunistas tales como TB son características propias de la infección por VIH-1. Después de la seroconversión a VIH-1, el riesgo de una TB activa aumenta significativamente en personas que son crónicamente infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) sin sintomatología (1-2). Sin embargo, la infección activa (3), pero no la infección latente de TB (4), está asociada con el desarrollo de la fase SIDA. Además, al contrario de la mayoría de las otras infecciones oportunistas, el riesgo de desarrollar la TB está sustancialmente aumentado antes que ocurre una pérdida significativa de las células TCD4+ en sangre (5-6). En ausencia de la infección VIH o de otras inmunodeficiencias, la mayoría de los contactos cercanos de personas con TB activa que se infectan con *Mtb* y estimula una respuesta inmune adaptativa contra este patógeno, no se enferman, y sólo el 10% de los individuos expuestos al *Mtb* desarrollan la enfermedad (7). De este modo, el dramático incremento

de la TB activa asociada con la infección VIH sugiere que la inmunidad específica contra *Mtb* sea particularmente vulnerable al daño del sistema inmune asociado al VIH. Esto último ha sido confirmado en un reciente estudio longitudinal donde se demostró, que en la fase aguda de la infección viral ocurre una rápida eliminación de la respuesta inmune contra *Mtb* en personas que permanecían libre de síntomas de la TB (8).

Mtb es un patógeno intracelular facultativo que sobrevive y crece primariamente dentro de los macrófagos y células dendríticas en el hospedador (9). En ratones y humanos, la respuesta inmune tiene dificultad para eliminar la infección por *Mtb*, resultando en el establecimiento de una infección latente en humanos y un estado crónico de la enfermedad en ratones. Los mecanismos de esta inmunidad específica no están completamente comprendidos, pero se conoce que el control de la infección depende de la respuesta de los linfocitos T, en especial, las células T CD4+ (10-11). Estas células son cruciales para la respuesta inmune en la fase aguda de la infección por *Mtb* en el modelo murino (12), secretan IFN- γ y TNF- α las cuales acti-

van a los macrófagos infectados y contribuyen a contener el bacilo intraendosomal (5, 13-14) y a la formación de los granulomas bactericidas (15). Aunque las células TCD8+ han sido implicadas en el control de la TB en humanos (16-17), los mecanismos no están completamente claros y existen pocos datos que muestren qué papel están jugando estas células para contener la infección latente en pacientes VIH+. En este trabajo se propuso investigar el papel de estas células en la fase tardía de la infección por VIH, y cómo es afectada su funcionalidad durante la enfermedad por *Mtb*. Un mejor entendimiento de tal respuesta pudiera ayudar a elucidar los mecanismos inmunopatológicos de la co-infección VIH/ *Mtb*.

Materiales y métodos

Pacientes y diseño del estudio

Este trabajo es un estudio transversal de diferentes grupos de individuos, cuyo número total fueron 30 personas, de los cuales, 14 seropositivos para VIH-1 pertenecientes al Servicio de Infectología del Hospital Vargas (Caracas, Venezuela), clasificados en dos (2) grupos: pacientes VIH+ con TB pulmonar activa (grupo VIH+/TB+) con valores de células TCD4+ < 250/mL (n= 7); pacientes VIH+ sin TB activa (VIH+/TB-) con valores de células TCD4+ < 250/mL (n= 7). Un tercer grupo de adultos con un cuadro clínico de TB pulmonar activa pero seronegativos para el virus (TB; n= 5). El grupo Control fue el cuarto grupo conformado por individuos seronegativos a VIH y sin enfermedad de TB activada (n = 11). El estudio fue aprobado por la Comisión de Bioética local y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. El diagnóstico de TB pulmonar fue basado sobre radiografía de tórax y baciloscopia de esputo, y la confirmación fue por un cultivo po-

sitivo de *Mtb*. Ningún paciente recibió tratamiento anti-tuberculosis o terapia con corticosteroides en los 5 meses previos al estudio. Además, ninguno recibió previamente tratamiento antirretroviral. Mientras que el grupo de pacientes VIH+ sin diagnóstico de TB, fue indicado por examen físico, ausencia de cualquier síntoma sugestivo de TB y no tenían signos radiológicos de enfermedad pulmonar. Los adultos sanos, seronegativos para VIH ni con TB activa fueron invitados para participar después de asistir a asesoramiento y pruebas voluntarias para la detección de la infección por VIH, quienes resultaron negativo para esta infección.

Medición de la carga viral

Los niveles de ARN para VIH-1 fueron medidos en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" con un kit comercial de PCR cuantitativo de la transcriptasa reversa (Amplicor HIV Monitor Test; Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA) con un límite promedio de detección de 2-3 log₁₀ copias/mL.

Inmunofenotipaje

El número de células T circulantes y sus subpoblaciones fue determinado en muestra de sangre total mediante marcaje por fluorescencia, seguido por análisis por citometría de flujo, usando perlas fluorescentes como estándar interno (BD, USA) y anticuerpos monoclonales comerciales (AcMcs de BD, USA). Los siguientes AcMcs fueron usados: anti-CD3-PerCP, anti-CD4-APC, anti-CD8-APC, anti-CD45RA-FITC, anti-CD45RO-PE. Brevemente, 100 µL de muestra sanguínea fue incubada con AcMcs conjugados por 30 min en hielo, en la oscuridad y lavadas. Los glóbulos rojos fueron lisados con una solución de lisis FACS (BD, USA) y las muestras fueron inmediatamente adquiridas en un ci-

tómetro de flujo FACSCalibur (BD). Los eventos fueron seleccionados en la región de linfocitos vivos basados en los parámetros de forward y scatter y fueron analizados en el software Cell Quest (BD).

Análisis de la expresión *ex vivo* de FAS (CD95), HLA-DR e IL-7R α (CD127)

Para medir la frecuencia de linfocitos T CD8+ totales, vírgenes y memoria marcados positivamente para FAS (CD95) e IL-7R α (CD127), y positivos para HLA-DR en la población total, se usó marcaje directo de inmunofluorescencia con AcMcs tanto con FITC o PE, respectivamente. Brevemente, 100 μ L de sangre total fue marcada con anti-CD3-PerCP, anti-CD8-APC, anti-CD95-FITC, anti-HLA-DR-PE y anti-CD127-PE (BD) por 15 min en hielo en la oscuridad. Posteriormente, las muestras fueron lavadas y los glóbulos rojos fueron lisados usando con una solución de lisis FACS (BD, USA) y las muestras fueron inmediatamente adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD). Irrelevantes isotipos de anticuerpos de ratón fueron usados como controles negativos para determinar el fondo de fluorescencia. La expresión del antígeno fue cuantificada por citometría de flujo como porcentaje de células positivas en una población celular.

Ensayos de linfoproliferación (LPR) *in vitro*

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) fueron aisladas de muestras de sangre tratada con EDTA mediante centrifugación de un gradiente de densidad (Histopaque, Sigma, USA). Estas CMSP fueron crecidas en placas de 96 pozos en una densidad de 1×10^5 cel/pozo en 0,2 mL de medio RPMI-1640 (Gibco, Life Technology,

USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor, 2 mM L-Glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 mg/mL de sulfato de estreptomicina (Gibco, USA) en la presencia de uno de los siguientes estímulos: 5 μ g/mL de fitohemaglutinina (PHA, Sigma, USA), 1 μ g/mL de PPD (Staten Serum Institut, Suecia) y un combinado de péptidos de ENV viral superpuestos en 20-mer (cada péptido a 1 μ g/mL) (BD, USA). Las células no estimuladas fueron usadas como controles. La LPR fue determinada después de 72 h de cultivo por incorporación de BrdU (Sigma, USA), el cual fue agregado en las últimas 4-5 horas de cultivo. Posterior al lavado celular, los linfocitos fueron fijados, permeabilizados y marcados con anti-BrdU conjugados con FITC, anti-CD3-PerCP y anti-CD8-APC (BD, USA) por 30 min. Finalmente, las células fueron extensamente lavadas, resuspendidas en formaldehído (1%), adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD) y analizados los datos usando el software CellQuest de BD.

Ensayos de apoptosis inducida

Las CMSP purificadas de los individuos fueron crecidas en placas de 96 pozos en una densidad de 1×10^5 cel/pozo en las mismas condiciones de cultivo mencionada en el párrafo anterior. Las células no estimuladas fueron usadas como controles negativos. La apoptosis inducida fue cuantificada después de 72 h de cultivo. Las células fueron marcadas con anexina-V conjugada con FITC y yoduro de propidio usando un kit comercial (BD, USA), según las recomendaciones de los fabricantes. La apoptosis fue medida por citometría de flujo como porcentaje de las células positivas para anexina V en una población celular dada. Tanto las células vivas como las apoptóticas fueron incluidas en el análisis y el debris celular fue excluido.

Medición de la producción de citocinas

La producción de citocinas fue medida en los sobrenadantes de los cultivos de las CMSP por 72 h en la presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fitohemaglutinina (PHA, Sigma, USA), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PPD (Staten Serum Institut, Suecia) y un combinado de péptidos de ENV viral superpuestos en 20-mer (cada péptido a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (BD, USA), tal como se describió en párrafos anteriores. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados en -80°C hasta el análisis. Un equipo "Cytometric Bead array (CBA)" fue usado, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes (BD, USA). La metodología combina los principios de los inmunoensayos tipo sándwich con la habilidad de la citometría de flujo para medir las características de múltiples partículas, por lo cual, se pudo medir las concentraciones de tres citocinas humanas (IL-10, IFN- γ y TNF- α) simultáneamente en una simple muestra de sobrenadante.

Análisis estadístico

Los valores promedios fueron expresados como media \pm DS. Las diferencias (valores de P) fueron evaluadas usando las dos colas, de la prueba no paramétrica Mann-Whitney U. Las diferencias fueron consideradas significativas para una $P < 0,05$.

Resultados

Niveles de las subpoblaciones de linfocitos T en los grupos en estudio

Los resultados de las subpoblaciones de células T de los grupos estudiados son mostrados en la Figura 1. Los dos grupos de pacientes VIH⁺ presentaron una disminución significativa de los valores plasmáticos de linfocitos TCD4⁺ en comparación al grupo Control y al grupo TB⁺ ($P < 0,001$). En el caso

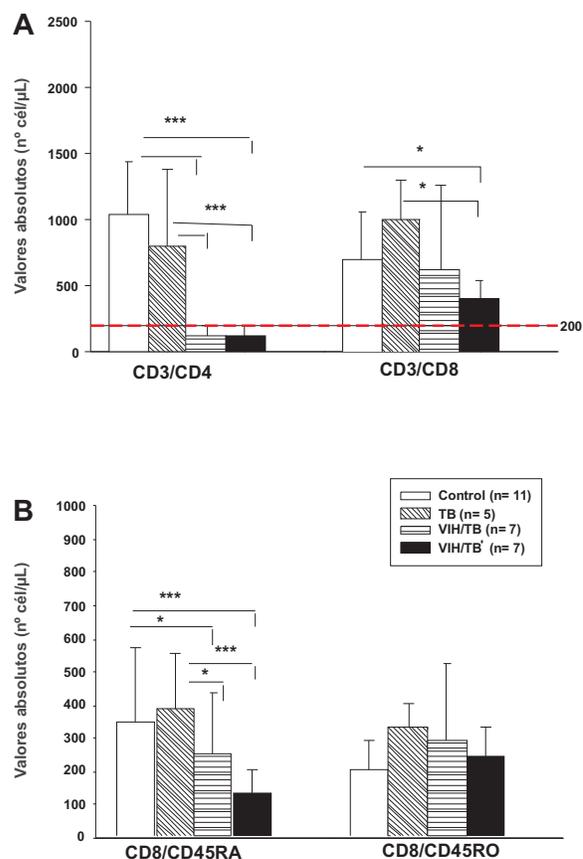


Figura 1. Subpoblaciones celulares. Los valores absolutos de las subpoblaciones celulares ($\text{n}^{\circ}/\mu\text{L}$ plasma), linfocitos T CD4 y CD8 totales (A) y linfocitos T CD8 vírgenes y memoria (B) son expresados como media \pm DS. Las diferencias en la media fueron comparadas por la prueba no paramétrica Mann-Whitney U con 2 colas. (*) $P < 0,05$ vs Control; (***) $P < 0,001$ vs Control.

de los linfocitos T CD8⁺, se puede observar que ambos grupos de pacientes VIH⁺ presentaron valores bajos en la población celular total, grupo VIH⁺/TB⁻ ($P < 0,05$) y el grupo VIH⁺/TB⁺ ($P < 0,001$) en comparación a los valores del grupo control y al grupo TB⁺; similarmente se obtuvo este comportamiento en la subpoblación de células vírgenes de am-

bos grupos de pacientes VIH+, donde el grupo de pacientes co-infectados VIH+/TB+ mostró mayor diferencia significativa ($P < 0,001$) vs grupo control y TB+. Mientras que los valores de las células TCD8+ memoria fueron similares entre todos los grupos, a pesar que en los grupos TB+ y VIH+/TB- hubo una tendencia a ser mayor vs Control; en los pacientes co-infectados presentaron menores valores vs grupo VIH+/TB- y al grupo TB, pero similares a los del grupo Control.

La expresión *ex vivo* de FAS (CD95), IL-7R α (CD127) y HLA-DR y la carga viral en los grupos de estudio

La expresión *ex vivo* de diferentes moléculas asociadas a la inducción de apoptosis (CD95), a la sobrevivencia celular (CD127) y a la activación celular (HLA-DR) en las células T CD8+ y en sus subpoblaciones vírgenes y memoria, y la carga viral entre los diferen-

tes grupos de individuos estudiados fueron evaluados, cuyos resultados son resumidos en la Tabla 1. Todas las poblaciones de las células TCD8+ de ambos grupos de pacientes VIH+ presentaron altos valores de CD95 con respecto a los del grupo control ($P < 0,05$), pero la diferencia de los valores fue más alta entre los pacientes co-infectados y el grupo control ($P < 0,001$), especialmente en las poblaciones total y virgen. Los valores fueron similares entre el grupo TB+ y el grupo Control. Al analizar los resultados del porcentaje de linfocitos TCD8+ positivos para la molécula CD127, se encontró que los grupos infectados con VIH ($P < 0,05$) y coinfectados VIH+/TB+ ($P < 0,001$) presentaron valores más bajos con respecto a los del grupo control y al grupo TB+ en las poblaciones total y virgen de estas células, mientras que en la población de células memoria, se pudo observar que solamente hubo disminución del porcentaje de

Tabla 1 .Expresión de HLA-DR, CD95 y CD127 y carga viral.

| Grupos | CD8 (%) | | | CD8CD45RA (%) | | CD8CD45RO (%) | | Carga viral (copia/mL) |
|----------|---------|-------|--------|---------------|-------|---------------|-------|------------------------|
| | CD95 | CD127 | HLA-DR | CD95 | CD127 | CD95 | CD127 | |
| Control | 23 | 54 | 4 | 11 | 46 | 28 | 64 | - |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |
| TB | 16 | 8 | 2 | 9 | 27 | 16 | 14 | - |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |
| VIH+/TB- | 30 | 49 | 10 | 15 | 50 | 29 | 55 | 103.966 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |
| VIH+/TB+ | 13 | 15 | 3 | 7 | 20 | 10 | 24 | 34.285 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |
| VIH+/TB+ | 64(*) | 18(*) | 28(*) | 34(*) | 22 | 53(*) | 18(*) | 143.369 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |
| VIH+/TB+ | 28 | 7 | 12 | 17 | 17 | 26 | 10 | 75.235 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |
| VIH+/TB+ | 75(+) | 14(+) | 37(*) | 43(+) | 20(*) | 50(*) | 54 | 75.235 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |
| VIH+/TB+ | 8 | 7 | 14 | 27 | 12 | 30 | 24 | 75.235 |
| | ± | ± | ± | ± | ± | ± | ± | |

Los valores en porcentajes de las subpoblaciones de linfocitos TCD8+ totales, vírgenes y memoria marcadas positivamente para CD95, CD127 y HLA-DR y la carga viral (N^0 partículas virales/mL plasma) son expresados como media \pm DS. Las diferencias en la media fueron comparadas por la prueba no paramétrica Mann-Whitney U con 2 colas. (*) $P < 0,05$ vs Control; (+) $P < 0,001$ vs Control.

CD127+ en el grupo VIH+/TB- ($P < 0,05$). Los pacientes co-infectados no presentaron diferencia significativa en relación a los del grupo Control. El análisis de los resultados obtenidos del porcentaje de linfocitos TCD8+ totales marcados con la molécula HLA-DR, la cual es un marcador de superficie de activación celular, indica que ambos grupos de pacientes VIH+ muestran valores significativamente altos de activación de estos linfocitos en relación al grupo de individuos sanos ($P < 0,05$). En el caso del grupo TB, los valores fueron mayores pero no significativos al del grupo Control. A pesar que los pacientes co-infectados presentan una tendencia a tener mayores valores de activación celular en comparación a los pacientes infectados solamente con VIH, no hubo diferencia significativa. Finalmente, en relación a la carga viral, no fue observada una diferencia significativa entre ambos grupos de pacientes VIH+, a pe-

sar que hubo una tendencia de aumento en el grupo de pacientes co-infectados.

Los ensayos *in vitro* de linfoproliferación

Aunque todos los grupos de pacientes infectados con VIH presentaron un incremento significativo de la proliferación de sus linfocitos TCD8+ totales en presencia de PHA en relación a la condición de cultivo de no estimulación, la proliferación nunca llegó a alcanzar los valores del grupo Control, donde el grupo VIH+/TB- presentó los valores significativamente más bajos ($P < 0,05$), resultados mostrados en la Figura 2. Cuando las CMSP fueron cultivadas en presencia de PPD o el antígeno viral Env, no se observó incremento específico de la proliferación de los linfocitos TCD8+ en ninguno de los grupos de pacientes infectados con VIH, presentando valores similares a los del grupo Control.

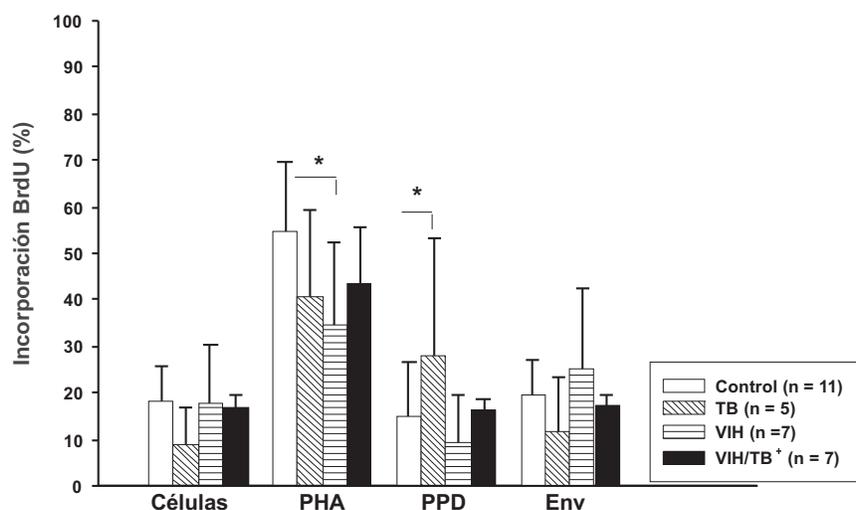


Figura 2 .Proliferación de Linfocitos TCD8+. Se determinó la proliferación de linfocitos TCD8+ totales en presencia de diferentes condiciones de estímulos [PHA: fitohematoglutinina (5 µg/mL), PPD (1 µg/mL) y Env (1 µg/mL)] con 72 h de cultivo de CMSP, a través de la medición de la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU), realizada por un anticuerpo monoclonal anti-BrdU-FITC y analizados los resultados por citometría de flujo. Las barras representan la media ± la desviación estándar. Las diferencias en la media fueron comparadas por la prueba no paramétrica Mann-Whitney *U* con 2 colas. (*) $P < 0,05$ vs Control.

Sin embargo, el grupo TB presentó altos valores ($P < 0,05$) en relación al grupo Control en presencia de PPD.

Los ensayos *in vitro* de la apoptosis inducida

Se cuantificó la frecuencia de la muerte celular asociada a la apoptosis inducida. Ambos grupos de pacientes infectados (VIH+/TB- y VIH+/TB+) presentaron altos valores de apoptosis de los linfocitos TCD8+ en la ausencia de estímulos y en la presencia de PHA, PPD y Env comparados con el grupo de pacientes sanos ($P < 0,05$). Sin embargo, los pacientes co-infectados presentaron los valores más altos de células apoptóticas en la presencia de estos estímulos (Figura 3). En el caso de los pacientes TB+ presentaron valores más altos que el grupo Control para todas las condiciones de estimulación, pero no fueron significativas las diferencias.

La cuantificación de la producción de citocinas

Las CMSP de los diferentes grupos de adultos estudiados fueron cultivadas por 72 h en distintas condiciones de estimulación y la producción de IL-10, TNF- α e IFN- γ fue cuantificada (Figura 4). Los resultados indican que en la presencia de PHA la producción de IL-10 fue más alta en los pacientes co-infectados comparada al grupo Control ($P < 0,05$), pero no hubo diferencias significativas con el resto de los grupos (VIH+/TB- y TB+) (Figura 4A). Mientras que en la presencia de PPD, la producción de esta citocina fue significativamente más alta en los pacientes TB+ ($P < 0,05$) y similar en los pacientes co-infectados vs Control; finalmente, los valores fueron similares entre todos los grupos, cuando se cultivaron las células en presencia del antígeno viral. Cuando analizamos la producción de TNF- α , se observó que en presencia de

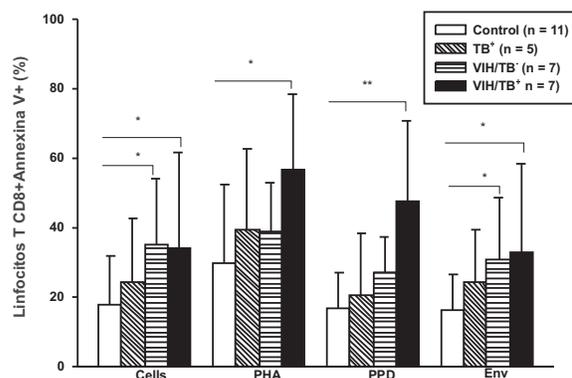


Figura 3. Apoptosis inducida de Linfocitos T CD8. Se determinó la frecuencia de apoptosis inducida *in vitro* de apoptosis en linfocitos T CD8, a través del marcaje con anexina V y yoduro de propidio y analizados los resultados por citometría de flujo. Las barras representan la media \pm la desviación estándar. Las diferencias en la media fueron comparadas por la prueba no paramétrica Mann-Whitney U con 2 colas. (*) $P < 0,05$ vs Control; (**) $P < 0,01$ vs

PHA, las CMSP presentaron una tendencia de incremento de los valores de concentración de esta citocina entre todos los grupos de pacientes en relación al grupo Control, sin embargo, fue observada diferencia significativa en el grupo de pacientes co-infectados VIH+/TB+ vs Control ($P < 0,05$) (Figura 4B). En la presencia de PPD, las células del grupo VIH+/TB+ mostraron significativamente los valores más bajos de concentración de esta citocina vs Control ($P < 0,05$), mientras que el resto de los grupos presentaron valores similares al grupo Control. En presencia del antígeno Env, los valores fueron similares entre todos los grupos con respecto al Control.

La producción de IFN- γ en ambos grupos de los pacientes infectados VIH+ disminuyó en presencia del mitógeno y de PPD en

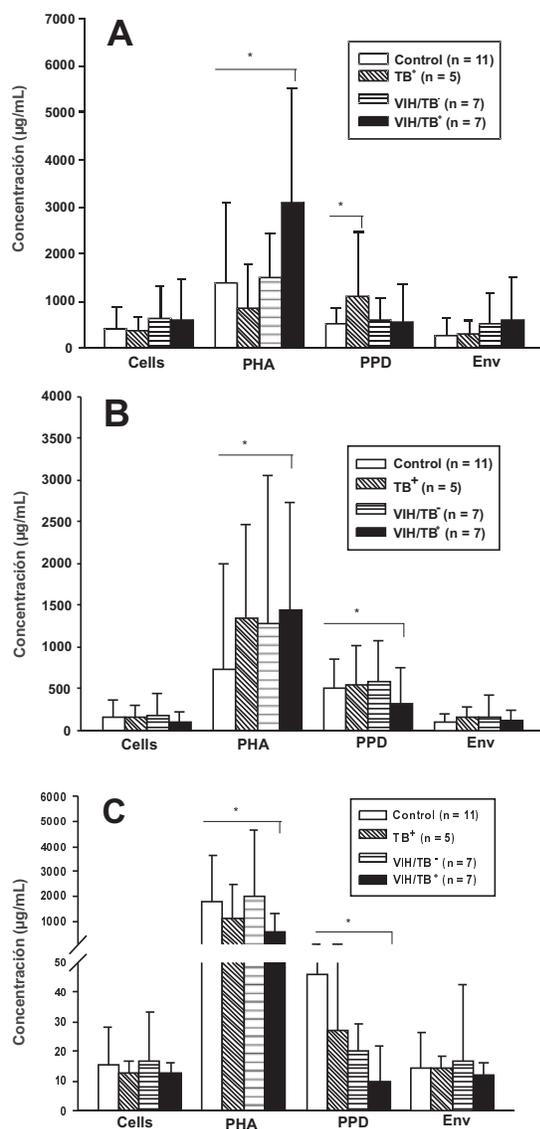


Figura 4. Medición de citocinas de cultivo de CMSP. A partir de CMSP se midió la producción de IL-10 (A), TNF- α (B) e IFN- γ (C), en presencia de diferentes condiciones de estimulación *in vitro*, fue evaluado a las 72 h de cultivo mediante citometría de flujo. Las barras representan el promedio \pm desviación estándar y las posibles diferencias entre grupos fueron investigadas mediante el uso de la prueba estadística no paramétrica Mann-Whitney *U* con 2 colas. (*) $P < 0,05$ vs Control.

relación a los individuos sanos. Sin embargo, el grupo de pacientes co-infectados fueron los que presentaron una diferencia significativa con respecto al Control ($P < 0,05$) en ambos casos. Nuevamente se observó valores similares de concentración de esta citocina entre todos los grupos, al cultivar las células en presencia del antígeno viral Env (Figura 4C).

Discusión

A pesar que es conocido el importante papel que juegan los linfocitos TCD4⁺ en la inmunidad contra la TB activa, aún no está bien comprendida la función que ejercen los linfocitos TCD8⁺. Mucho menos en la situación de un cuadro de co-infección VIH/TB en pacientes con TB pulmonar activa. Es por ello que en este trabajo se quiso evaluar la funcionalidad de la respuesta específica de linfocitos TCD8⁺ en este tipo de pacientes co-infectados VIH⁺/TB⁺ con TB pulmonar activa, factor conocido que acelera la progresión de la infección viral a la fase de SIDA (18).

En este trabajo, se encontró que los valores de células TCD4⁺ y CD8⁺ en sangre en los pacientes TB⁺ fueron similares al del grupo Control. Mientras que los pacientes VIH⁺ y co-infectados VIH⁺/TB⁺ estudiados no estaban en la fase aguda de la infección viral. Todo lo contrario, presentaron un cuadro de inmunosupresión muy marcado, reflejado en su número de linfocitos TCD4⁺ en sangre ($< 250/\mu\text{L}$). Sin embargo, por la similitud en los valores de linfocitos TCD4⁺ totales entre ambos grupos de pacientes, podemos afirmar que el grado de inmunodeficiencia es similar entre los mismos. A pesar de esto, se evidenció un mayor deterioro de la inmunidad celular en los pacientes co-infectados del resto de los grupos. Efectivamente, nuestros resultados indican claramente una mayor disminución de la cantidad sanguínea de linfocitos

TCD8+ total y virgen en el grupo de pacientes co-infectados VIH+/TB+ en relación al grupo de pacientes VIH+, los pacientes TB+ y los individuos sanos, significativamente en estos dos últimos grupos (Figura 1). Además, al evaluar la expresión de CD95, HLA-DR y CD127 y la frecuencia de apoptosis inducida en los linfocitos TCD8+ de los grupos estudiados, se pudo constatar que los pacientes co-infectados presentaron las mayores diferencias (Figura 2 y Tabla 1). A pesar que en los pacientes con TB activa se observaron valores intermedios, no hubo diferencia significativa en las cantidades de las subpoblaciones celulares, ni en las células apoptóticas, ni mucho menos en los valores de la expresión de Fas, HLA-DR y CD127 con respecto a los individuos sanos. Todo esto pareciera indicar que la presencia de la TB pulmonar activa afecta mucho más estos parámetros inmunológicos en la presencia de la infección con VIH, hecho que confirma resultados previos donde los autores demuestran, incluso, que desde las tempranas fases de la infección viral puede ocurrir una rápida eliminación de la respuesta inmune contra *Mtb* en personas que permanecían libre de síntomas de la TB (8). Además, la mayor pérdida de los linfocitos TCD8+ que encontramos en los pacientes co-infectados indica una mayor progresión de la enfermedad viral, tal como ha sido descrito previamente (19).

Los linfocitos TCD8+ no son afectados de manera directa por la infección del VIH pero mostraron alteraciones que son consecuencias indirectas de la infección por el VIH, el cual incrementa la susceptibilidad a la apoptosis a través de la vía Fas/FasL, disminuye la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL (20-21), aumenta la expresión de HLA-DR (22), y disminuye la expresión de la molécula CD127 (22-23), todo esto ocasionado por el aumento de la carga viral (22, 24-25).

Por otra parte, al estudiar diversos mecanismos efectores, tales como la producción de IFN- γ , TNF- α e IL-10 por las CMSP y la respuesta proliferativa de los linfocitos TCD8+ con la estimulación de PHA, de un derivado específico de *M. tuberculosis* (PPD) y de un antígeno del virus (Env), los resultados obtenidos indican que los pacientes co-infectados exhibieron una pérdida total de las respuestas estudiadas contra el antígeno bacteriano, comparado con el grupo de individuos con TB activa (TB+), quienes presentaron respuestas específicas, excepto por la producción de TNF- α en presencia de PPD, cuyos valores fueron similares a los del grupo Control (Figuras 2 y 4). Esta pérdida de la funcionalidad específica de estas células en los pacientes co-infectados puede ser explicada por: a) deterioro gradual de la funcionalidad de los linfocitos TCD4+ específicos para *Mtb* que ocurre por la infección directa del VIH (26). Esto conduciría a una falta de activación por parte de estas células colaboradoras a los linfocitos TCD8+ específicos para la bacteria; b) las infecciones virales crónicas, tales como las del VIH, producen "agotamiento" de los linfocitos TCD8+ perdiendo su funcionalidad y conllevando a la fase de SIDA (27). Este mismo fenómeno recientemente ha sido observado en modelos animales con toxoplasmosis, demostrando que ocurre un "agotamiento" funcional de estas células TCD8+ y provocando la toxoplasmosis cerebral (28). Se puede pensar que la presencia de la co-infección VIH/TB puede provocar agotamiento de células TCD8+ específicas para ambos patógenos, conllevando a un cuadro de TB activa y a la fase de SIDA en los pacientes co-infectados.

El desequilibrio de la producción de citocinas que se encontró en los pacientes co-infectados puede comprometer la inmunidad celular contra la infección bacteriana. En

efecto, es bien conocido que la IL-10 induce el reclutamiento, la actividad citotóxica y la proliferación de los linfocitos TCD8⁺ (29). Además, IFN- γ y TNF- α son requeridos para generar y mantener las respuestas antiviral (30) y contra *Mtb* (10-11). La habilidad de las células TCD4⁺ para producir IFN- γ y TNF- α , los cuales activan a los fagocitos para contener al patógeno intracelular, es crucial en la protección contra la enfermedad micobacteriana. La pérdida de la producción de estas citocinas agrava más la ya deteriorada inmunidad celular contra *Mtb* ocasionando la reactivación de la TB, tal como se ha descrito (10-11). Por otra parte, esta pérdida de la inmunidad contra *Mtb* observada en los pacientes co-infectados puede explicar el cuadro de tuberculosis activa que presentaron, hecho que es frecuente encontrar en pacientes en fase de SIDA con reactivación de la infección bacteriana (8). Finalmente, en presencia del mitógeno PHA y el antígeno Env, ambos grupos de pacientes VIH⁺ perdieron su capacidad productiva de estas citocinas, mientras que la proliferación específica al Env no se dio en ninguno de los pacientes VIH⁺ de estos grupos. Estos resultados pueden ser explicados por el efecto inhibitorio que se ha observado de proteínas virales y/o por la pérdida total de clones específicos contra el virus durante la progresión de la infección viral (31).

En conclusión, la co-infección VIH/TB conduce a una pérdida mayor de la funcionalidad de los linfocitos TCD8⁺ específicos para *Mtb* y para el virus en comparación a la infección única de VIH o de TB, conduciendo al paciente a una mayor progresión de la fase de SIDA.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, CDCH-UCV (Proyectos N° 09-11-519103 y 09-11-5424-2004).

Referencias bibliográficas

- (1) Whalen C, Horsburgh CR, Hom D, Lahart C, Simberkoff M, Ellner J. Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:129-135.
- (2) Whalen CC, Nsubuga P, Okwera A, Johnson JL, Hom DL, Michael NL et al. Impact of pulmonary tuberculosis on survival of HIV-infected adults: a prospective epidemiologic study in Uganda. *AIDS* 2000; 14:1219-1228.
- (3) Chaisson RE, Gallant JE, Keruly JC, Moore RD. Impact of opportunistic disease on survival in patients with HIV infection. *AIDS* 1988; 12:29-33.
- (4) Manoff SB, Farzadegan H, Munoz A, Astemborski JA, Vlahov D, Rizzo RT et al. The effect of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection on human immunodeficiency virus (HIV) disease progression and HIV RNA load among injecting drug users. *J Infect Dis* 1996; 174:299-308.
- (5) Kaufmann, SH., and McMichael, AJ. Annuling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med* 2005; 11:S33-S44.
- (6) Sonnenberg P, Glynn JR, Fielding K, Murray J, Godfrey-Faussett P and Shearer S. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *J. Infect. Dis* 2005; 191: 150-158.
- (7) Cailleaux-Cezar M, de A Melo D, Xavier GM, de Salles CL, de Mello FC, Ruffino-Netto A et al. Tuberculosis incidence among con-

- tacts of active pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009; 13:190-195.
- (8) Geldmacher C, Schuetz A, Ngwenyama N, Casazza JP, Sanga E, Saathoff E, et al. Early depletion of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T helper 1 cell responses after HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2008; 198(11): 1590-8.
- (9) Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G et al. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol* 2001; 15; 166(12):7033-41.
- (10) Caruso AM, Serbina N, Klein E, Triebold K, Bloom BR and Flynn JL. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J. Immunol* 1999; 162:5407-5416.
- (11) Gallegos AM, Pamer EG and Glickman MS. Delayed protection by ESAT-6-specific effector CD4+ T cells after airborne *M. tuberculosis* infection. *J. Exp. Med* 2008; 205:2359-2368.
- (12) Mogues T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R and North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Exp. Med* 2001; 193:271-280.
- (13) Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, and Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J. Exp. Med* 1993; 178: 2243-2247.
- (14) Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R et al. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; 2:561-572.
- (15) Ray JC, Flynn JL, and Kirschner DE. Synergy between individual TNF-dependent functions determines granuloma performance for Controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol* 2009; 182:3706-3717.
- (16) Day CL, Abrahams DA, Lerumo L, Janse van Rensburg E, Stone L, O'rie T et al. Functional capacity of *Mycobacterium tuberculosis*-specific T cell responses in humans is associated with mycobacterial load. *J Immunol* 2011; 187(5):2222-32.
- (17) Commandeur S, Lin MY, van Meijgaarden KE, Friggen AH, Franken KL, Drijfhout JW et al. Double- and monofunctional CD4+ and CD8+ T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR antigens and peptides in long-term latently infected individuals. *Eur J Immunol* 2011; 41(10):2925-36.
- (18) Lawn SD, Bekker LG, Wood R. How effectively does HAART restore immune responses to *Mycobacterium tuberculosis*? Implications for tuberculosis Control. *AIDS* 2005; 19:1113-24.
- (19) Moretti S, Marcellini S, Boschini A, Famularo G, Santini G, Alesse E et al.. Apoptosis and apoptosis associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors. *Clin Exp Immunol* 2000; 122:364-373.
- (20) Cossarizza A, Stent G, Mussini C, Paganelli R, Borghi V, Nuzzo C et al. Deregulation of the CD95/CD95L system in lymphocytes from patients with primary acute HIV infection. *AIDS* 2000; 14:345-55.
- (21) Petrovas C, Mueller YM, Dimitriou ID, Bojczuk PM, Mounzer KC, Witek J, et al. HIV-specific CD8+ T cells exhibit markedly reduced levels of Bcl-2 and Bcl-xL. *J Immunol* 2004; 172:4444-53.
- (22) Alfonzo M, Suárez J, Díaz A, Comegna M, Valenzuela P, Sánchez M, Hernández D, Hung A. Altered expression of survival (CD127) and death (Fas) receptors in total, naïve and memory CD8 T lymphocytes from human immunodeficiency virus infected patients: possible implications for progression of infection. *Invest Clin* 2008; 49(2): 151-68.
- (23) Boutboul F, Puthier D, Appay V, Pelle O, Ait-Mohand H, Combadiere B et al. Modulation of interleukin-7 receptor expression

- characterizes differentiation of CD8 T cells specific for HIV, EBV and CMV. *AIDS* 2005; 19:1981-1986.
- (24) Fauci, A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996; 384:529-34.
- (25) Graziosi C, Soudeyns H, Rizzardì GP, Bart PA, Chapuis A, Pantaleo G.. Immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14 Suppl 2:S135-42.
- (26) Geldmacher C, Ngwenyama N, Schuetz A, Petrovas C, Reither K, Heeregrave EJ et al. Preferential infection and depletion of *Mycobacterium tuberculosis*-specific CD4 T cells after HIV-1 infection. *J Exp Med* 2010; 207(13):2869-81.
- (27) Mueller SN and Ahmed R. High antigen levels are the cause of T cell exhaustion during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:8623-8628.
- (28) Bhadra R, Gigley JP, Weiss LM, Khan IA. Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8+ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(22):9196-201.
- (29) Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol* 1998; 160:3188-93.
- (30) Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *J Exp Med* 2005; 201: 1053-1059.
- (31) Jowett JB, Planelles V, Poon B, Shah NP, Chen ML, Chen IS. The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle. *J Virol* 1995; 69:6304-6313.