

VARIACION DE LAS SUBPOBLACIONES DE CELULAS T SEGUN LA PROGRESION CLINICA E INMUNOLOGICA EN NIÑOS INFECTADOS VERTICALMENTE POR HIV-1

SALVADOR RESINO GARCIA¹, JOSE M^a BELLON CANO¹, JOAQUIN NAVARRO CASPISTEGUI¹, DOLORES GURBINDO GUTIERREZ², JUAN ANTONIO LEON LEAL³, M^a ANGELES MUÑOZ-FERNANDEZ¹

¹Servicio de Inmunología; ²Sección de Inmuno-Pediatría, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid;

³Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, España

Resumen El objetivo de este trabajo es estudiar las subpoblaciones de células T vírgenes, memoria y activadas en sangre periférica de 65 niños infectados verticalmente por el HIV, considerando su categoría clínica, inmunológica y los valores de carga viral (CV). Todos los niños HIV fueron tratados con terapia antirretroviral (AR) (26 niños con terapia AR combinada y 39 en terapia AR altamente agresiva). Las subpoblaciones de linfocitos T se analizaron por citometría de flujo con marcaje triple y se expresaron en porcentaje. Las células T CD4+ vírgenes (CD45RA+CD62L+) estuvieron disminuidas en niños con bajo %CD4+, pero no en niños en estadios avanzados de la enfermedad o con CV elevadas. Por el contrario, las células T CD8+ vírgenes estuvieron disminuidas en niños con bajo %CD4+, en estadio avanzado de la enfermedad y con CV elevadas. Las células T CD4+ y CD8+ de memoria (CD45RO+) y activadas (CD38+, HLA-DR+ y CD38+HLA-DR+) estuvieron elevadas en niños con bajo %CD4+, en estadio avanzado de la enfermedad y con CV elevadas. Sin embargo, las células CD4+CD38+ estuvieron más elevadas en los niños HIV con CD4+>25% que en el grupo control ($p<0,001$) y más disminuidas en los niños con bajo %CD4+. El porcentaje de células T CD4+ y CD8+ vírgenes y memoria depende del %CD4+ más que de la categoría clínica o el valor de CV. Nuestros datos indican una asociación entre bajo %CD4+ y CV elevadas con la expresión elevada de marcadores de activación celular, pero no así en estadios clínicos avanzados, posiblemente debido al tratamiento antirretroviral.

Palabras claves: HIV-1, niños, subpoblaciones T, carga viral

Abstract *T-cell subsets distribution during clinical and immunological progression in vertically HIV-infected children.* We have investigated the relationship among peripheral blood T-cell subsets with immunological and clinical categories, and viral load (VL) in 65 HIV-1-infected children on stable antiretroviral therapy (ART): 26 (40%) children on combination therapy with 2 nucleoside inhibitors, and 39 (60%) children on highly active antiretroviral therapy (HAART). T-cell subsets were determined by flow cytometry. VL was quantified using a standardized molecular method. Naïve CD4+ T-cells (CD45RA+CD62L+) were lower in children with low %CD4+ T-cells, but neither in children with advanced stage of illness nor with high VL. By contrast, naïve CD8+ T-cells were lower in children with low %CD4+ T-cells, advanced stage of illness and high VL. Memory (CD45RO+) and activated (CD38+, HLA-DR+ and CD38+HLA-DR+) CD4+ and CD8+ T-cells were higher in children with low %CD4+ T-cells, advanced stage of illness and high VL. However, CD4+CD38+ T-cells were higher in HIV-children with CD4+>25% than in the control group ($p<0,001$) and were diminished in children with low %CD4+ T-cells. Naïve and memory CD4+ and CD8+ T-cells are more tightly dependent on the immunological category than on clinical category or plasma VL. Furthermore, our data indicate an association between low %CD4+ T-cells, high VL and high expression of cellular activation markers, although not with advanced clinical stage, possibly due to ART.

Key words: HIV-1, children, T-cell subsets, viral load

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) produce una desregulación en la dinámica de producción y la acción de los linfocitos T que origina la inmunodeficiencia

característica de esta infección¹. Los linfocitos T vírgenes o "naive" (CD45RA+CD62L+) maduran en el timo y emigran a los órganos linfoides periféricos estableciendo el repertorio de células T; es allí donde los linfocitos T pueden encontrar el antígeno extraño para el que tienen especificidad, activándose y proliferando hasta diferenciarse a células de memoria (CD45RO+)². El HIV tiene preferencia por los linfocitos T CD4+ de memoria³. Así, los linfocitos T CD4+ que se encuentran con antígenos específicos del HIV se activan, permitiendo la replicación

Recibido: 12-I-2001

Aceptado: 22-VI-2001

Dirección postal: Dra. M^a Angeles Muñoz-Fernández, Departamento de Inmunología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, C/ Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, España
Fax: (34-91) 586 8018 e-mail: Mmunoz@cbm.uam.es

del HIV⁴ que conduce a la destrucción de las células infectadas³, disminuyendo en número y dejando un repertorio de células sin especificidades suficientes para controlar la infección por el HIV⁵. En la infección por el HIV también hay una disminución de linfocitos T CD4+ vírgenes debido a su activación y paso a células de memoria^{6, 7} o por la infección directa por el HIV de los linfocitos progenitoras en el timo⁸.

La hiperactivación de los linfocitos T es una de las características principales de la infección por el HIV y puede producir anergia y aumento de apoptosis de dichas células⁹. En individuos adultos, la activación del sistema inmune causada por el HIV se refleja en un aumento de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados que expresan CD38 y HLA-DR^{10, 11}. En niños, el 75% de los linfocitos T CD4+ y el 50% de T CD8+ expresan CD38, siendo un marcador de células inmaduras que disminuye conforme aumenta la edad del niño, alcanzando un 30% de expresión en individuos adultos¹², este hecho puede contribuir a una interpretación errónea en la utilización de este marcador en niños¹³. En individuos adultos, una alta proporción de células CD8+CD38+ predice la progresión de la enfermedad¹⁴ y menor supervivencia¹⁵. Otro marcador de progresión de la infección por HIV es la expresión alta de HLA-DR en linfocitos T, tanto en individuos adultos¹⁶ como en niños¹⁷. Además, en individuos adultos se ha observado que, con la terapia AR altamente agresiva (HAART) se disminuye el número de linfocitos T CD4+ y CD8+ activados, medido por la expresión de CD38 y HLA-DR^{18, 19}.

El objetivo de este estudio ha sido determinar las diferencias en las distintas subpoblaciones de linfocitos

T CD4+ y CD8+ de memoria, vírgenes y activadas en 65 niños infectados verticalmente por el HIV, según las distintas categorías clínicas e inmunológicas y utilizando como marcador virológico la carga viral plasmática (CV)²⁰.

Pacientes y métodos

Sujetos

Se realizó un estudio transversal en el que se incluyeron 65 niños infectados verticalmente por el HIV. El estudio se hizo entre Julio y Octubre de 1999 en la Sección de Inmuno-Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid y en el Servicio de Pediatría del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Se seleccionaron 65 niños con más de 2 años de edad, diagnosticados como infectados por el HIV, utilizando métodos de detección directa del HIV (ADN-PCR y cultivo viral), descritos previamente²¹. La clasificación clínica se realizó de acuerdo a la guía de 1994 del *Center for Disease Control and Prevention* (CDCP)²² y los tratamientos antirretrovirales (AR) se prescribieron por los pediatras de acuerdo a la guía de la CDCP²³; estando 26 (40%) niños en régimen de terapia combinada y 39 (60%) en HAART. Como grupo control se utilizaron 8 niños sanos no HIV (Tabla 1).

Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+

Los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en sangre periférica se cuantificaron por citometría de flujo, método descrito previamente²¹. El análisis de las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ memoria, virgen y activadas también se realizó en un citómetro de flujo FACScan (*Becton-Dickinson*) usando el programa de adquisición Lysis II (*Becton-Dickinson*)^{24, 25} y con los anticuerpos monoclonales que se describen en la Tabla 2. Los valores de las subpoblaciones se expresaron en porcentaje.

TABLA 1.— Resumen de los tratamientos antirretrovirales de los niños HIV participantes en el estudio.

	Terapia combinada		HAART	
	n	meses	n	meses
Estadio Clínico				
A	8	11.9±4.3	11	22.7±3.3
B	12	27.4±3.8	8	18.2±4.6
SIDA	5	19.9±5.5	20	15.3±1.9
Estadio inmunológico				
CI-1 (>25% células TCD4+)	20	18.0±3.2	24	18.5±2.0
CI-2 (15-25% células TCD4+)	4	26.7±5.8	7	18.5±3.2
CI-3 (<15% células TCD4+)	2	37.2±0.80	8	14.3±4.2
Carga viral				
<1 000 copias/ml	9	18.0±4.5	8	20.9±2.4
1 000-10 000 copias/ml	5	20.3±8.7	10	13.0±3.4
10 000-30 000 copias/ml	10	24.3±4.1	4	25.8±1.5
>30 000 copias/ml	1	16.3	15	16.3±2.5

HAART: terapia antirretroviral altamente agresiva

TABLA 2.– Combinaciones de anticuerpos monoclonales para el análisis fenotípico de linfocitos.

Tubo	FITC	PE	PerCP	Poblaciones analizadas
1	IgG ₁	IgG ₁	anti-CD4	Selección T CD4+
2	anti-HLA-DR	anti-CD45RO	anti-CD4	CD4 Memoria/Activadas
3	anti-CD45RA	anti-CD62L	anti-CD4	CD4 Virgen
4	anti-CD38	anti-HLA-DR	anti-CD4	CD4 Activadas
5	IgG ₁	IgG ₁	anti-CD8	Selección T CD8+
6	anti-CD38*	anti-CD45RO	anti-CD8	CD8 Memoria/Activadas
7	anti-CD45RA	anti-CD62L	anti-CD8	CD8 Virgen
8	anti-CD38*	anti-HLA-DR	anti-CD8	CD8 Activadas

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

PE: Ficoeritrina.

PerCP: Peridín clorofila.

(*) Immunotech (Marseille). El resto de los anticuerpos monoclonales se obtuvieron de Becton Dickinson (San José, Ca).

Cuantificación de RNA viral en plasma por RT-PCR.

Los valores de RNA viral en el plasma de los pacientes pediátricos se cuantificaron usando un ensayo comercial (Amplicor-HIV Monitor™ Test, Roche Diagnostic System), aprobado por la Federal Drug Administration (FDA) para monitorización de CV en Mayo de 1996.

Análisis estadístico

Se seleccionaron 65 niños infectados verticalmente por el HIV mayores de dos años de edad para evitar la variación en las subpoblaciones linfocitarias T CD4 y CD8 que se produce durante los primeros meses de vida del niño. Además, se realizó el análisis estadístico ajustando por edad.

Los 65 niños HIV se dividieron en distintos grupos según las características clínicas, inmunológicas y virológicas que tenían y con edades equivalentes²². Según las categorías clínicas se dividieron en: a) grupo-CC-A, 19 niños HIV asintomáticos; b) grupo-CC-B, 21 niños HIV con síntomas moderados; c) grupo-CC-C, 25 niños HIV que han evolucionado a SIDA. Según las categorías inmunológicas se dividieron en tres grupos: a) grupo-CI-1, 44 niños con más del 25% de linfocitos T CD4+; b) grupo-CI-2, 11 niños con linfocitos T CD4+ entre el 15% y 25%; c) grupo-CI-3, 10 niños con menos del 15% de linfocitos T CD4+. En el estudio de CV, dispusimos de datos de 63 de los 65 niños HIV y los dividimos en 4 grupos según puntos de corte de la CV: a) 17 niños con una CV menor de 1 000 copias/ml; b) 16 niños con CV entre 1 000-10 000 copias/ml; c) 14 niños con una CV entre 10 000-30 000 copias/ml y d) 16 niños con CV mayor de 30 000 copias/ml. Las diferencias estadísticas según las características clínicas, de %CD4+ y de CV de los niños HIV incluidos en el estudio se calcularon utilizando un análisis de la varianza multivariante ajustado por la edad de cada niño.

Resultados

Características generales de la población de niños HIV+

Se incluyeron 65 niños infectados verticalmente por el HIV con las características clínicas, inmunológicas y

virológicas descritas en la Tabla 3. También fueron incluidos 8 niños sanos con una edad media de 9.2±1.5 (rango 3.5; 15.8) años como grupo control no HIV. He-

TABLA 3.– Resumen de las características inmunológicas y virológicas de los niños HIV participantes.

Característica	Valores
Número de niños HIV	65
Edad ^a (años)	8.1±0.46 (2.0; 16.2)
Estadio Clínico	
A	19 (26.0%)
B	21 (28.8%)
SIDA	25 (34.2%)
Estadio inmunológico	
CI-1 (>25% células TCD4+)	44 (60.3%)
CI-2 (15-25% células TCD4+)	11 (15.1%)
CI-3 (<15% células TCD4+)	10 (13.7%)
Poblaciones linfocitarias	
% TCD4+ ^a	28.0±1.56 (1.2; 59.2)
% TCD8+ ^a	45.6±1.72 (17.9; 82.7)
TCD4+/mm ³ ^a	958±100 (9; 3.779)
TCD8+/mm ³ ^a	1.371±93 (267; 4.276)
Marcadores virológicos	
Log ₁₀ CV (copias/ml) ^a	3.72±0.14 (1.30; 5.80)
Carga viral	
<1 000 copias/ml	17 (23.3%)
1 000-10 000 copias/ml	16 (21.9%)
10 000-30 000 copias/ml	14 (19.2%)
>30 000 copias/ml	16 (21.9%)

^a Valores expresados como media±e.e.m. (min; max). AN: análogo de nucleósidos. IP: inhibidor de proteasas.

mos analizado la influencia del tratamiento antirretroviral, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en las subpoblaciones estudiadas entre el grupo de niños con terapia combinada y el grupo de niños con HAART.

Subpoblaciones linfocitarias T CD4+ y T CD8+ de memoria

En el grupo-CI-1, los linfocitos vírgenes (CD4+CD45RA+CD62L+) estuvieron más altos que en el grupo control ($p < 0.05$), mientras que los niños del grupo-CI-3 tuvieron valores más bajos de linfocitos vírgenes que en el resto de los grupos ($p < 0.001$) (Figura 1). Al disminuir los linfocitos T CD4+ observamos un aumento de los linfocitos T CD4+ de memoria (Figura 1). En los niños del grupo-CI-3, las células T CD4+ de memoria (CD4+CD45RO+) estuvieron más altas que en el grupo control ($p < 0.05$), CI-1 y CI-2 ($p < 0.001$). Sin embargo, el grupo-CI-1 fue el único que tuvo valores más bajos de CD4+CD45RO+ que el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 1). El grupo-CI-3 tuvo un porcentaje de células T CD4+ de memoria activadas (CD4+CD45RO+DR+) más alto que los demás grupos ($p < 0.001$). Realizamos el mismo análisis estadístico de las tres subpoblaciones linfocitarias en los niños divididos según sus categorías clínicas y observamos un comportamiento similar en la variación de células vírgenes, memoria y memoria activadas, aunque las diferencias no fueron significativas entre los grupos (Figura 1).

Al aumentar la CV observamos un incremento de linfocitos T CD4+ de memoria activadas. Los niños con CV > 30 000 copias/ml tuvieron un porcentaje más alto que el grupo control y que el grupo con CV < 1 000 copias/ml ($p < 0.05$) (Figura 2).

Con el deterioro inmunológico observamos un descenso de células T CD8+ vírgenes (CD8+CD45RA+CD62L+) (Figura 1), teniendo los grupos-CI-1, CI-2, CI-3 valores más bajos que el grupo control ($p < 0.001$). Además, el grupo-CI-1 tuvo valores más altos que el grupo-CI-2 y CI-3 ($p < 0.05$). Se observó que con la caída de linfocitos T CD4+ aumentaban los linfocitos CD8+CD45RO+ (Figura 1); el grupo-CI-2 y grupo-CI-3 tuvieron valores más altos que el grupo control ($p < 0.001$) y CI-1 ($p < 0.05$). Todos los niños HIV tuvieron valores más altos que el control de linfocitos T CD8+ de memoria activadas (CD8+CD45RO+CD38+) ($p < 0.05$) (Figura 1). El grupo-CI-1 tuvo un porcentaje de linfocitos de memoria activada más bajos que el grupo-CI-2 y CI-3 ($p < 0.05$). Desde un punto de vista clínico, los niños HIV tuvieron valores más bajos de linfocitos T CD8+ vírgenes que el grupo control ($p < 0.001$), siendo también más bajo en el grupo-CC-C que en el grupo-CC-A (Figura 1). También encontramos que el porcentaje de los linfocitos T CD8+CD45RO+ fue más alto en el grupo-CC-B que el

grupo-CC-A y grupo control ($p < 0.05$). Los niños de los grupos CC-B y CC-C tuvieron valores más altos de células TCD8+ de memoria activadas que el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 1).

Al aumentar la CV, observamos una caída de linfocitos T CD8+ vírgenes, siendo los valores de ésta subpoblación en los niños HIV inferiores al grupo control ($p < 0.001$) (Figura 2). Los niños con CV menor de 10 000 copias/ml ($p < 0.05$) tuvieron valores más altos de células T CD8+ vírgenes que los niños con CV > 30 000 copias/ml. Al aumentar los valores de CV observamos que aumentaban los linfocitos T CD8+ de memoria (CD8+CD45RO+) (Figura 2), encontrando que los niños con CV mayor de 10 000 copias/ml ($p < 0.01$) tuvieron valores más altos que el grupo control. También encontramos que los valores de CV altos se acompañan de valores de linfocitos T CD8+ de memoria activados altos (Figura 2). Todos los niños HIV tuvieron valores más altos de ésta subpoblación que el grupo control ($p < 0.05$), excepto los niños con valores de CV < 1 000 copias/ml, que además tuvieron valores más bajos que los niños con una CV de más de 10 000 copias/ml ($p < 0.01$). Los niños con CV > 30 000 copias/ml tuvieron el porcentaje de esta subpoblación más alto, incluso más que los niños con CV entre 10 000-30 000 copias/ml ($p < 0.01$).

Subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y T CD8+ activadas

En el grupo-CI-1 encontramos valores más altos de linfocitos CD4+CD38+ que en el grupo control ($p < 0.001$). El grupo-CI-3 tuvo valores más altos de linfocitos CD4+HLA-DR+ y CD4+CD38+HLA-DR+ que los demás grupos ($p < 0.001$) (Figura 1). Al realizar un análisis de los niños por las tres categorías clínicas descritas, observamos que todos tenían valores más altos de linfocitos T CD4+CD38+ que el grupo control ($p < 0.01$) (Figura 1), no encontrando diferencias entre los distintos grupos HIV. Tampoco observamos diferencias entre los grupos, para el porcentaje de linfocitos CD4+CD38+HLA-DR+ (Figura 1).

Respecto a los grupos de CV, los niños HIV tuvieron valores más altos de linfocitos T CD4+CD38+ que los niños del grupo control ($p < 0.01$). Al aumentar la CV, el porcentaje de linfocitos T CD4+ activados fue más alto (Figura 2). Los niños del grupo control, y los niños con CV < 10 000 copias/ml tuvieron valores más bajos de linfocitos CD4+HLA-DR+ que los niños con CV > 10 000 copias/ml ($p < 0.05$). Los niños con CV > 30 000 copias/ml tuvieron un porcentaje de linfocitos CD4+CD38+HLA-DR+ más alto que los niños del grupo control, y que los niños con CV < 10 000 copias/ml ($p < 0.05$) (Figura 2).

No se encontró diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos CD8+CD38+ entre los tres grupos HIV. Todos los niños HIV tuvieron valores superiores de

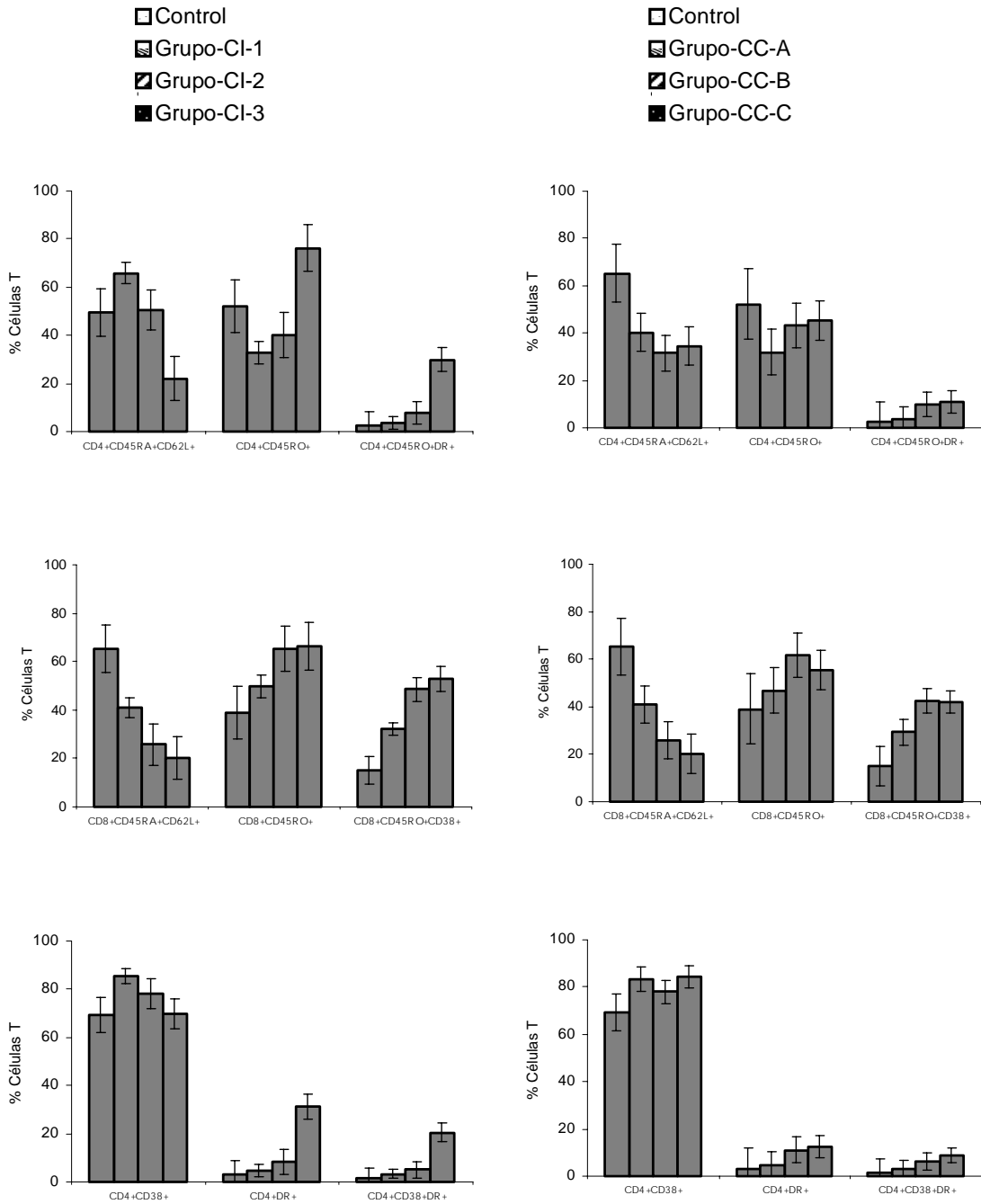


Fig. 1.- Características de las subpoblaciones linfocitarias de células TCD4+ y TCD8+ de memoria, vírgenes y activadas de los niños HIV+ según los estadios inmunológicos y clínicos.

linfocitos CD8+HLA-DR+ que el grupo control ($p < 0.001$); y además, el grupo-CI-3 tuvo valores más altos de linfocitos CD8+HLA-DR+ que el grupo-CI-1 ($p < 0.05$). También, los linfocitos CD8+HLA-DR+CD38+ estuvieron más elevados en estadios más avanzados de la enfermedad. Así, los niños del grupo-CI-3 y grupo-CI-2 tuvieron un porcentaje de linfocitos CD8+HLA-DR+CD38+ superior al grupo-CI-1 y grupo control ($p < 0.001$) (Figura

1). Por categorías clínicas, el grupo-CC-C tuvo valores más altos de linfocitos CD8+CD38+ que el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 1). El grupo-CC-B y grupo-CC-C tuvieron valores más altos de linfocitos CD8+HLA-DR+ que el grupo control ($p < 0.001$) y el grupo-CC-A ($p < 0.05$). Además, el grupo-CC-B y el grupo-CC-C tuvo valores más altos de linfocitos CD8+HLA-DR+CD38+ que el grupo control ($p < 0.01$) (Figura 1).

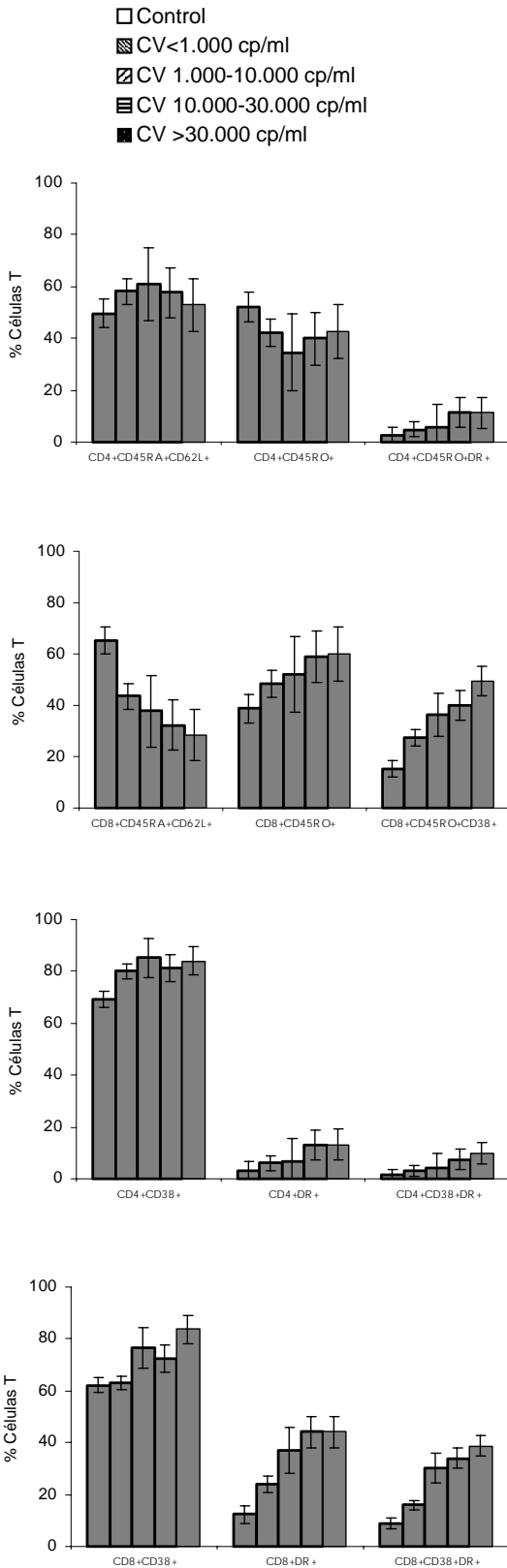


Fig. 2.- Características de las subpoblaciones linfocitarias de células TCD4+ y TCD8+ de memoria, vírgenes y activadas de los niños HIV+ según grupos de carga viral.

Los niños con CV mayor de 30 000 copias/ml tuvieron valores de linfocitos CD8+CD38+ más altos que el resto de los grupos, incluido el grupo control ($p < 0.05$) (Figura 2). Los niños con CV > 1 000 copias/ml tuvieron un porcentaje de linfocitos CD8+HLA-DR+ mayor que el grupo control y grupo CV < 1 000 ($p < 0.001$) (Figura 2). El mismo patrón y con las mismas diferencias entre grupos se encontró en el caso de las células CD8+CD38+DR+ (Figura 1).

Discusión

Una de las características más importantes de la infección por el HIV es la pérdida progresiva de linfocitos T CD4+²⁶. De hecho, el recuento de linfocitos T CD4+ en sangre periférica es uno de los marcadores predictivos de progresión a SIDA más potente utilizado en la clínica habitual^{21, 22}. Hemos observado una discordancia entre las categorías clínicas e inmunológicas, ya que hay niños asintomáticos o con síntomas moderados que tienen linfocitos T CD4+ < 15% y niños con SIDA y con linfocitos T CD4+ > 25%, sugiriendo que hay otros marcadores que influyen en la evolución clínica de la infección por el HIV en los niños. Además, en el grupo-CC-A o asintomáticos, y en el grupo-CI-1 o con porcentaje de linfocitos T CD4+ > 25%, encontramos niños con CV altas así como niños tratados con terapias HAART con dificultades para controlar de forma continuada la CV²³. Estas discordancias entre la evolución clínica y los marcadores inmunológicos y virológicos pueden deberse al impacto que tienen los nuevos tratamientos AR. El hecho de evolucionar clínicamente a SIDA no es indicativo de progresión rápida a muerte, porque con los nuevos tratamientos AR, se puede dar el caso en el que los síntomas de la enfermedad reviertan hasta alcanzar en el paciente un estado asintomático o con síntomas leves. Estos cambios en la evolución de la enfermedad nos llevan a plantearnos el objetivo de estudiar de forma más detallada las diferentes subpoblaciones de linfocitos T en distintos estadios de la enfermedad.

En diferentes estudios se han encontrado valores distintos de subpoblaciones de linfocitos T en niños no infectados e infectados verticalmente por el HIV^{13, 27, 28}. Estas discrepancias pueden deberse a las diferentes condiciones experimentales utilizadas o al diferente criterio de inclusión de los niños en los estudios. Respecto al primer punto, el método de citometría utilizado es el más adecuado y nuestros resultados del grupo control no HIV concuerdan con los publicados previamente utilizando la misma metodología^{13, 17}. Respecto al segundo punto, hemos incluido niños HIV, mayores de 2 años de edad, para evitar las fluctuaciones de subpoblaciones linfocitarias que se producen durante los primeros años de vida²⁹⁻³¹ y hemos realizado un análisis estadístico ajustado.

tado por la edad de cada niño porque las subpoblaciones celulares *vírgenes*, de memoria, y activadas no alcanzan valores estables y normales hasta la pubertad^{30, 32}.

Observamos una disminución de las subpoblaciones *vírgenes* y memoria de linfocitos T CD4+ con estadios avanzados de la enfermedad posiblemente debido a que dependen únicamente de los valores absolutos de linfocitos T CD4+ o al efecto del tratamiento AR, que al producir un bloqueo de la replicación del HIV, disminuye la presentación antigénica, la activación del sistema inmunológico y produce un aumento del número de linfocitos T CD4+.

En la infección por el HIV existen varios mecanismos que podrían explicar un incremento en el paso de linfocitos T CD4+CD45RO- a linfocitos T CD4+CD45RO+, como son la estimulación crónica de los linfocitos T por antígenos del HIV o por otros agentes y una expansión periférica antígeno-independiente de linfocitos T CD4+CD45RO+ debido a una disfunción tímica causada por la infección de timocitos y de células epiteliales del timo³³. Este aumento de linfocitos T CD4+CD45RO+ ocurre preferentemente en los estadios avanzados de la infección por el HIV, que es cuando existe una involución real de la arquitectura normal de los ganglios linfáticos y se produce un reequilibrio en la replicación viral entre los órganos linfoides y la sangre periférica³⁴. Así mismo, en los estadios iniciales de la infección, cuando el número de linfocitos T CD4+ está dentro de un rango normal, una destrucción de linfocitos T CD4+ preferente de memoria podría producir un aumento relativo de linfocitos T CD4+ *vírgenes* debido a la mayor susceptibilidad de los linfocitos T CD4+CD45RO+ para infectarse por el HIV³⁵ y para sufrir apoptosis inducida por una activación celular anómala^{36, 37}. A pesar del aumento de células de memoria, se ha descrito que los linfocitos T anérgicos tienen fenotipo CD45RO+³⁸, de tal forma que la población global de linfocitos T CD45RO+ incluiría poblaciones de células con diversa capacidad funcional, algunas de las cuales serían anérgicas a los estímulos antigénicos³⁹. Además, hay que tener presente las alteraciones producidas en el repertorio de linfocitos por el HIV^{40, 41}.

Las alteraciones observadas en poblaciones de linfocitos T CD4+ *vírgenes* a lo largo de la infección por el HIV, podrían estar relacionadas con una destrucción preferente de linfocitos T CD4+ *vírgenes* que se infectan por el HIV en la fase de precursores tímicos, (linfocitos que coexpresan las moléculas CD4 y CD8^{8, 33}) o también podrían deberse a la falta de generación de dichas células por el agotamiento del potencial de replicación del reservorio de células vivas no infectadas por el HIV⁴². La no generación de células T CD4+ con fenotipo *vírgenes* se podría deber a la alteración y disfunción de la arquitectura intra-tímica como consecuencia de la infección por el HIV, siendo un mecanismo de gran relevancia

en niños porque el proceso de timopoyesis es muy activo^{43, 44}.

En oposición a otros autores que han observado que los linfocitos TCD8+ *vírgenes* disminuían muy poco o no cambiaban con la progresión de la enfermedad^{45, 46}, en niños hemos encontrado una disminución de los mismos con la progresión clínica. Estas diferencias pueden ser debidas a factores como: a) los criterios utilizados para identificar células *vírgenes*, ya que muchos estudios asumen que todos los linfocitos T CD8+CD45RA+ son de fenotipo *virgen*, por lo que sobrevaloran el número de esta subpoblación linfocitaria en estadios avanzados de la enfermedad; b) nuestros datos indican que los linfocitos de memoria y memoria activados (CD8+CD45RO+ y CD8+CD45RO+CD38+) se incrementan con el desarrollo de la inmunosupresión; c) antes de emigrar del timo a sangre periférica como células T CD8 *vírgenes*, la pérdida de células T CD8+ podría deberse a la infección directa por el HIV de los linfocitos progenitoras del timo doble positivas⁸, siendo un mecanismo bastante importante en niños porque la timopoyesis es muy activa antes de la adolescencia^{43, 44} y d) la disminución de células T CD8 *vírgenes* en niños podría ser debida a complicaciones secundarias que son comunes a todas las infecciones crónicas o estados de inflamación^{47, 48}. Nuestros datos demuestran que las subpoblaciones celulares TCD8+ *vírgenes* correlacionan con una disminución de linfocitos TCD4+, de tal forma que la inmunodeficiencia causada por la infección por el HIV se puede deber a bajo número de células TCD4+, bajo número de células TCD8+ *vírgenes* o más fácilmente a una combinación de ambos en conjunción con otros factores.

La activación del sistema inmunológico es una característica de la infección por el HIV⁴⁹. Desde el punto de vista del fenotipo linfocitario, esta activación se manifiesta por el aumento de la expresión de determinados marcadores de activación, como CD38+ y HLA-DR+^{16, 50}. Este incremento se observa desde los estadios de inmunosupresión más tempranos (CI-1) y se acentúa a medida que se produce un descenso de los linfocitos TCD4+. Además, teniendo en cuenta la evolución de los niños por categorías clínicas también observamos un incremento en la expresión de estos marcadores de activación (CD38+ y HLA-DR+) con la progresión de la infección.

Los linfocitos TCD8+ activados (CD8+CD38+HLA-DR+) mostraron valores más altos en los niños en estadios más avanzados de la enfermedad y con CV altas confirmando un incremento de subpoblaciones CD8+CD38+ y CD8+ HLA-DR+ en niños HIV^{27, 28}. Estos datos hacen pensar que el porcentaje de células CD8+CD38+ meramente reflejan la CV plasmática, o que la expansión de esta población celular refleja las alteraciones inflamatorias causadas por el incremento de la

replicación viral⁵¹. La coexpresión de CD38 y HLA-DR siempre estuvo asociada en los niños HIV a progresión clínica, inmunosupresión y a CV altas, en concordancia con lo descrito en trabajos previos^{14, 19}. Además, un incremento de la coexpresión de CD38 y HLA-DR pueden producir activación celular e incrementar la susceptibilidad de la muerte celular por apoptosis o anomalía funcional^{52, 53}. El comportamiento de la población CD4+CD38+ está menos claro en niños que en individuos adultos HIV⁵⁴, donde la alta expresión de esta molécula es un marcador predictivo potente de progresión clínica e inmunológica de la enfermedad; en niños, esta población sólo ofrece información cuando el niño tiene una inmunosupresión avanzada.

Nuestro estudio demuestra una asociación entre bajo porcentaje de linfocitos T CD4+ y CV elevada con la expresión de marcadores de activación celular, que contribuye a un mejor conocimiento de la patogénesis de la infección por el HIV⁵⁵. Así, si los nuevos tratamientos AR producen una disminución o supresión de la replicación del HIV en los niños, también se produce una disminución de la presentación antigénica que lleva consigo una disminución de la activación del sistema inmunológico⁵⁶. Por esto, las diferencias encontradas en las subpoblaciones activadas son menos acusadas.

Agradecimientos: A Dolores García Alonso y Consuelo Muñoz por su excelente labor técnica.

Este trabajo se ha realizado con financiación de la Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE 3008/99), Fondo de Investigación Sanitaria (00/0207), Programa Nacional de Salud (SAF 99-0022), Comunidad de Madrid y Bristol-Myers, S.A. (Grupo Bristol-Myers Squibb).

Bibliografía

1. Roederer M. Getting to the HAART of T cell dynamics. *Nat Med* 1998; 4: 145-6.
2. 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.
3. Sleasman JW, Aleixo LF, Morton A, Skoda-Smith S, Goodenow MM. CD4+ memory T cells are the predominant population of HIV-1-infected lymphocytes in neonates and children. *AIDS* 1996; 10:1477-84.
4. Muñoz-Fernandez MA, Navarro J, García A, Punzon C, Fernandez-Cruz E, Fresno M. Replication of human immunodeficiency virus-1 in primary human T cells is dependent on the autocrine secretion of tumor necrosis factor through the control of nuclear factor-kappa B activation. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100: 838-45.
5. Soudeyns H, Rebai N, Pantaleo GP, et al. The T cell receptor V beta repertoire in HIV-1 infection and disease. *Semin Immunol* 1993;5:175-85.
6. Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, Herzenberg LA. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest* 1995; 95: 2061-6.
7. Connors M, Kovacs JA, Krevat S, et al. HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med* 1997; 3:533-40.
8. Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, et al. HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* 1993; 363(6431):728-32.
9. Meynard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; 257: 217-9.
10. Phillips AN, Sabin CA, Eford J, Bofill M, Lee CA, Janossy G. CD8 lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years of follow-up. *AIDS* 1993; 7: 975-80.
11. Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocardo JJ, Bach BA. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 376-82.
12. Jackson DG, Bell JI. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol* 1990; 144: 2811-5.
13. Plaeger-Marshall S, Isacescu V, O'Rourke S, Bertolli J, Bryson YJ, Stiehm ER. T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: three-color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71: 27-32.
14. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, 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.
15. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, et al. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179: 859-70.
16. Kestens L, Vanham G, Vereecken C, et al. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 436-41.
17. de Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Viorucci A. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res* 1998; 43: 752-8.
18. Bouscarat F, Levacher M, Landman R, et al. Changes in blood CD8+ lymphocyte activation status and plasma HIV RNA levels during antiretroviral therapy. *AIDS* 1998; 12: 1267-73.
19. Burgisser P, Hammann C, Kaufmann D, Battegay M, Rutschmann OT. Expression of CD28 and CD38 by CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. The Swiss HIV Cohort Study. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 458-63.
20. Resino S, Gurbindo MD, Bellón JM, Sanchez-Ramón S, Muñoz-Fernández MA. Predictive markers of clinical outcome in vertically HIV-1 infected infants. A prospective longitudinal study. *Pediatr Res* 2000; 47: 509-15.
21. Muñoz-Fernandez MA, Obregon E, Navarro J, et al. Relationship of virologic, immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 1996; 40: 597-602.
22. CDCP. Center for Diseases Control Prevention. Revised classification system for HIV-1 infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994; 43: 1-13.

23. CDCP. Guidelines for use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. *MMWR* 1998; 47: RR-4.
24. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* 1996; 26 (3): :227-30.
25. Navarro J, Resino S, Bellón JM, et al. Association of CD8+ T lymphocyte subsets with the most commonly used markers to monitor HIV-1 infection in children treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* (in press).
26. Miedema F. Immunological abnormalities in the natural history of HIV infection: mechanisms and clinical relevance. *Immunodeficiency Rev* 1992; 3: 173-93.
27. Ibegbu C, Spira TJ, Nesheim S, et al. Subpopulations of T and B cells in perinatally HIV-infected and noninfected age-matched children compared with those in adults. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7: 340-8.
28. Schlesinger M, Peters V, Jiang JD, Roboz JP, Bekesi JG. Increased expression of activation markers on CD8 lymphocytes in children with human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatr Res* 1995; 38: 390-6.
29. Aldhous MC, Raab GM, Doherty KV, Mok JY, Bird AG, Froebel KS. Age-related ranges of memory, activation, and cytotoxic markers on CD4 and CD8 cells in children. *J Clin Immunol* 1994; 14: 289-98.
30. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1997; 130: 388-93.
31. de Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, et al. Longitudinal follow-up of blood lymphocyte subpopulations from birth to 1 year of age. *J Pediatr* 1998; 133: 586-8.
32. Erkeller-Yuksel FM, Deneys V, Yuksel B, et al. Age-related changes in human blood lymphocyte subpopulations. *J Pediatr* 1992; 120: 216-22.
33. Stanley SK, McCune JM, Kaneshima H, et al. Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J Infect Dis* 1993; 168: 810-7.
34. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev* 1994; 140: 105-30.
35. Spina CA, Prince HE, Richman DD. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* 1997; 99: 1774-85.
36. Janossy G, Borthwick N, Lomnitzer R, et al. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. I. Predominant proliferative defects among CD45RO+ cells of the CD4 and CD8 lineages. *AIDS* 1993; 7: 625-31.
37. Gougeon ML, Lecoer H, Dulioust A, et al. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 1996; 156: 3509-20.
38. Tary-Lehmann M, Saxon A. Human mature T cells that are anergic in vivo prevail in SCID mice reconstituted with human peripheral blood. *J Exp Med* 1992; 175: 503-16.
39. Jenkins MK, Miller RA. Memory and anergy: challenges to traditional models of T lymphocyte differentiation. *Faseb J* 1992; 6: 2428-33.
40. Soudeyns H, Champagne P, Holloway CL, et al. Transient T cell receptor beta-chain variable region-specific expansions of CD4+ and CD8+ T cells during the early phase of pediatric human immunodeficiency virus infection: characterization of expanded cell populations by T cell receptor phenotyping. *J Infect Dis* 2000; 181: 107-20.
41. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Cell* 1994; 78: 373-87.
42. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, et al. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373: 117-22.
43. Rodewald HR. The thymus in the age of retirement. *Nature* 1998; 396 (6712): 630-1.
44. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol* 1986; 75: 43-88.
45. Borkowsky W, Moore T, Krasinski K, Ajuang-Simbiri KO, Holzman R. Evolution of phenotypic memory T cells in HIV-1 infected infants and children. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 63: 280-4.
46. Froebel KS, Doherty KV, Whitelaw JA, Hague RA, Mok JY, Bird AG. Increased expression of the CD45RO (memory) antigen on T cells in HIV- infected children. *AIDS* 1991; 5: 97-9.
47. Cook RT, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, et al. Fine T-cell subsets in alcoholics as determined by the expression of L-selectin, leukocyte common antigen, and beta-integrin. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 71-80.
48. Smerdon RA, Peakman M, Hussain MJ, et al. Increase in simultaneous coexpression of naive and memory lymphocyte markers at diagnosis of IDDM. *Diabetes* 1993; 42: 127-33.
49. Bass HZ, Nishanian P, Hardy WD, et al. Immune changes in HIV-1 infection: significant correlations and differences in serum markers and lymphoid phenotypic antigens. *Clin Immunol Immunopathol* 1992; 64: 63-70.
50. Zaunders J, Carr A, McNally L, Penny R, Cooper DA. Effects of primary HIV-1 infection on subsets of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *AIDS* 1995; 9: 561-6.
51. Autran B, Carcelain G, Li TS, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *J Med Chem* 1997; 40: 2164-76.
52. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373: 123-6.
53. Bienzle D, Smaill FM, Rosenthal KL. Cytotoxic T-lymphocytes from HIV-infected individuals recognize an activation-dependent, non-polymorphic molecule on uninfected CD4+ lymphocytes. *AIDS* 1996; 10: 247-54.
54. 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 Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 16: 83-92.
55. Mahalingam M, Peakman M, Davies ET, Pozniak A, McManus TJ, Vergani D. T cell activation and disease severity in HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6: 1013-6.
56. Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA. Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996; 173: 321-9.