

Comparación de poblaciones linfocitarias de sangre y lavado broncoalveolar en pacientes con sida

E. Fernández, P. León*, R. Blanquer, M. Marín, A. Artero** y A. Pinilla*

Servicio de Neumología. *Servicio de Hematología. **Servicio de Medicina Interna. Hospital Dr. Peset Aleixandre. Valencia.

La alteración de la inmunidad celular, manifestada por disminución de los niveles sanguíneos de linfocitos T CD4, es el principal indicador de progresión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se conoce la disminución de estos linfocitos y del cociente CD4/CD8 en muestras pulmonares obtenidas mediante lavado broncoalveolar (LBA), así como el aumento de los CD8 supresores o citotóxicos. Se ignora si la alta incidencia de enfermedades del aparato respiratorio en estos pacientes se debe a alteraciones inmunitarias locales o sistémicas. El objetivo de este estudio es comparar las alteraciones de la inmunidad celular sistémica, estudiada en muestras de sangre periférica, con la detectada en muestras de LBA de estos pacientes con enfermedad respiratoria aguda.

Estudiamos a 42 pacientes con sida avanzado (grupo C3 de la clasificación de los Centers for Disease Control) hospitalizados por enfermedad respiratoria aguda y sometidos, con fines diagnósticos, a fibrobroncoscopia y LBA. Se comparan la celularidad y las poblaciones linfocitarias analizadas mediante citometría de flujo en muestras obtenidas de sangre periférica y LBA.

El porcentaje de linfocitos CD4 y el cociente CD4/CD8 fueron menores en LBA, sobre todo en los pacientes que tenían cifras de CD4 sanguíneas inferiores al 12% de la celularidad total de linfocitos T o 20 células CD4/ μ l.

La alteración de la inmunidad celular de los pacientes con infección por VIH avanzada (grupo C3) y enfermedad respiratoria aguda es más manifiesta a nivel local pulmonar que en sangre periférica. Es posible prever la depleción pulmonar de linfocitos T CD4 a partir de sus valores sanguíneos.

Palabras clave: Lavado broncoalveolar. Poblaciones linfocitarias. Sida.

Arch Bronconeumol 1996; 32: 271-274

Introducción

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se caracteriza por afectación progresiva y

Comparison of lymphocyte populations in blood and bronchoalveolar lavage of AIDS patients

Changes in cell immunity made manifest by decreases in blood levels of CD4 T cells is the main indicator of progressing HIV infection. The decrease in these lymphocytes, as well as in the CD4/CD8 index and increases in suppressant or cytotoxic CD8 cells can be detected in bronchoalveolar (BAL) lung samples. It is not clear whether the high incidence of respiratory system diseases in HIV patients stems from local or systemic immune changes. The aim of this study was to compare changes in the systemic cell immunity studied in samples of peripheral blood with changes detected in BAL samples from HIV patients with acute respiratory disease.

We studied 42 patients in the advanced stages of AIDS (C3 by Centers for Disease Control classification) who were hospitalized for acute respiratory disease and who underwent diagnostic fiberoptic bronchoscopy and BAL. Cell counts and lymphocyte populations were analyzed by flow cytometry in samples of peripheral blood and BAL.

The percentage of CD4 lymphocytes and the CD4/CD8 index were lower in BAL, particularly in patients with blood CD4 levels below 12% of the total T cell population, or at a level of 20 CD4 cells/ μ l.

Changes in cell immunity in patients with advanced HIV infection (C3 classification) and acute respiratory disease are more manifest locally in the lung than peripherally in blood. Lung depletion of CD4 T cells in the lung can be predicted based on blood levels.

Key words: Bronchoalveolar lavage. Lymphocyte populations. AIDS.

grave de la respuesta inmune, manifestada por disminución de los linfocitos CD4, células colaboradoras/inducidas de la respuesta específica y la síntesis de mediadores linfocitarios. Las causas de esta inmunodeficiencia son, en parte, consecuencia del tropismo del VIH por las células que presentan la molécula CD4 en su membrana, que actúa como receptor del virus en la célula, y de la capacidad citolítica del virus sobre dichas células. Además de los linfocitos CD4, se infectan por el VIH

Correspondencia: Dra. E. Fernández Fabrellas.
Servicio de Neumología. Hospital Dr. Peset Aleixandre.
Avda. Gaspar Aguilar, 90. 46017 Valencia.

Recibido: 28-8-95; aceptado para su publicación: 19-12-95.



otras células como las endoteliales de capilares de plexos coroideos, leptomeninges, etc., que actúan como presentadoras de antígeno. La entrada del virus en estas células, que en el pulmón están representadas por los macrófagos alveolares, se produce por endocitosis mediada por el receptor Fc de las inmunoglobulinas (Ig) unidas al virus (anticuerpos facilitantes)¹. Sin embargo, como dichos mecanismos no explican suficientemente la profunda inmunosupresión detectada en estos pacientes, se han involucrado elementos propios de la respuesta inicial antiviral, como anticuerpos con acción linfocitotóxica y la activación repetida del sistema inmunológico por infecciones intercurrentes como citomegalovirus (CMV), tuberculosis, etc., que incrementan la activación de células citotóxicas CD8, mecanismo fundamental de la respuesta antiviral y, en consecuencia, la acción contra otras CD4 infectadas².

Se han descrito alteraciones de la inmunidad local en el pulmón de pacientes infectados por VIH-1 a partir de muestras obtenidas mediante lavado broncoalveolar (LBA). Se sabe que hay una disminución de linfocitos CD4 y del cociente CD4/CD8 en muestras de LBA de pacientes con sida, paralela al descenso en sangre periférica, y un incremento de CD8 que parecen corresponder a linfocitos citotóxicos específicos contra el VIH-1; las células asesinas (*natural killer* [NK]) también aumentan en número pero no tienen actividad *in vitro*³⁻⁵. Este descenso de linfocitos T colaboradores, de actividad local de las células NK y de función de los macrófagos podría explicar la alta incidencia de infecciones oportunistas, adquiridas en la comunidad o nosocomiales, en estos pacientes⁶.

El objetivo de este estudio es comparar las alteraciones de la inmunidad celular en muestras sanguíneas y de LBA, asumiendo que las poblaciones linfocitarias sanguíneas expresan la alteración inmunológica sistémica, mientras que las muestras de LBA pueden reflejar alteraciones inmunitarias locales pulmonares.

Pacientes y métodos

Pacientes

El estudio comprende 42 pacientes con sida avanzado (grupo C3). Se estudiaron inicialmente 62 enfermos consecutivos con infección por VIH-1 que fueron hospitalizados por presentar enfermedad respiratoria aguda y a los que se les practicaron fibrobroncoscopia y LBA con fines diagnósticos. Agrupados según la clasificación de los Centers for Disease Control (CDC)⁷, se excluyeron 20 que no pertenecían al grupo C3 o que cumplían alguno de los siguientes criterios: a) volumen de líquido recogido tras LBA inferior al 30% del volumen de líquido instilado; b) errores en el procesado de la muestra; c) porcentaje de células bronquiales en el líquido recuperado superior al 1% de su celularidad total, y d) escasa celularidad del líquido recuperado tras LBA (menos de 200 células en la extensión citológica).

Métodos

Se diseñó un estudio prospectivo observacional transversal. El mismo día de la técnica endoscópica, o en un plazo máximo de 48 horas, se extrajo muestra sanguínea para estudio de

poblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo utilizando técnica de doble marcado.

La fibrobroncoscopia y el LBA se realizaron según la Normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR)^{8,9} y de la European Society of Pneumology¹⁰, una vez descartadas contraindicaciones absolutas y subsanadas las relativas. Tras la exploración del árbol bronquial, y antes de realizar ningún otro procedimiento de obtención de muestras, salvo los aspirados, se escogió un bronquio segmentario para realizar el LBA. En todos los pacientes con enfermedad pulmonar difusa o con radiografía de tórax normal, se eligió el bronquio lobar del lóbulo medio; en los que tenían alteraciones locales, el LBA se hizo en el segmento más afectado.

Se instilaron 150-200 ml de suero salino al 0,9%, a temperatura ambiente, divididos en 3-4 alícuotas de 50 ml. Tras cada fracción instilada, se aspiró manualmente y el líquido recogido de cada alícuota se vertió en un frasco estéril de plástico no siliconado, manteniendo la fracción recogida tras la primera alícuota separada de las restantes. Concluido el LBA, se aspiró a través del fibrobroncoscopio el resto de fluido, sin mezclarlo con los broncoaspirados previos al LBA ni con éste.

En el líquido recuperado tras la primera alícuota instilada, se realizó exclusivamente estudio microbiológico: cultivos de bacterias, micobacterias y hongos, búsqueda de *Pneumocystis carinii* y cultivo de CMV. De la mezcla de las restantes porciones, se hizo además recuento celular diferencial mediante microscopía óptica, utilizando aumentos $\times 40$ y $\times 100$, y estudio inmunofenotípico linfocitario mediante citometría de flujo utilizando el mismo panel de anticuerpos monoclonales que en la muestra de sangre periférica: CD2 (marcador de linfocito T), CD19 (marcador de linfocito B), CD4 (linfocito T colaborador-inductor), CD8 (linfocito T supresor o citotóxico) y CD3+CD56+ (NK).

El análisis estadístico de los datos, que se expresan como media \pm DE, se ha realizado mediante el test de la t de Student y la U de Mann-Whitney. El nivel de significación aceptado es $p < 0,05$.

Resultados

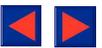
Los 42 pacientes, 36 varones (85,7%) y 6 mujeres (14,3%), tenían $31,1 \pm 7,3$ años de edad (18-55). Los factores de riesgo implicados para la infección por VIH-1 fueron: adicción a drogas por vía parenteral (ADVP) en 32 de ellos, 5 homosexuales, 2 heterosexuales promiscuos, 2 donantes de plasma remunerado, y sólo en un caso no pudo conocerse el factor de riesgo (tabla I).

El valor absoluto de linfocitos CD4 sanguíneos fue $43,19 \pm 43,80$ células/ μ l. El porcentaje de linfocitos y linfocitos B sobre el total de células hemáticas y linfo-

TABLA I
Edad, factores de riesgo y valores porcentuales de CD4 en sangre de pacientes con sida avanzado (media \pm DE)

Factor de riesgo	Número	Edad (media \pm DE)	Porcentaje CD4 (sangre)	CD4/ μ l (sangre)
ADVP	32	28,7 \pm 4,59	8,87 \pm 8,47	49,28 \pm 48,13
Homosexual	5	31 \pm 2,8	6,38 \pm 5,34	25,20 \pm 15,74
Otros	5	42,5 \pm 11	4,25 \pm 1,8	21,20 \pm 16,62
Total	42	31 \pm 7,3	7,97 \pm 7,78	43,19 \pm 43,80

ADVP: adicción a drogas por vía parenteral.



citosis, respectivamente, fue similar en sangre y LBA. Sin embargo, los porcentajes de linfocitos T y sus poblaciones, sobre todo CD4, fueron menores en LBA que en sangre (tabla II). La disminución en el porcentaje de CD4 del LBA se corresponde a la disminución sanguínea, pero es más intensa en los pacientes en los que los CD4 en sangre periférica son menos del 12% de los linfocitos T o de 20 células CD4/ μ l de sangre (tabla III).

Discusión

El LBA es el único medio incruento de acceso a la vía aérea distal y alveolo; el estudio de la celularidad de sus muestras equivale al estudio de la celularidad alveolar o intersticial¹¹. Creemos que la semejanza en porcentajes de linfocitos totales en sangre y LBA de los pacientes justifica la idoneidad del método (LBA) para el estudio de las poblaciones linfocitarias pulmonares y sus variaciones¹², máxime comparadas a las sanguíneas. Los pacientes con sida avanzado tienen menor proporción de linfocitos T y de sus poblaciones en el LBA que en sangre periférica; por contra tienen similar porcentaje de linfocitos B. La disminución de linfocitos T en el pulmón es significativa para la población CD4.

El linfocito T CD4 es la célula diana de la agresión por el VIH-1, por lo que su progresiva depleción en sangre periférica y tejidos marca el avance de la enfermedad^{13,14}. La disminución del número y función de linfocitos CD4 facilita la diseminación de otras infecciones intercurrentes, que condicionan a su vez la activación de nuevas células citotóxicas CD8 y, en consecuencia, su acción contra otras células CD4 infectadas, el establecimiento de un círculo vicioso y la caída progresiva de los linfocitos colaboradores hacia la inmunodeficiencia absoluta². No se ha precisado la importancia de esta depleción linfocitaria en el aparato respiratorio, aunque se ha relacionado el aumento de células CD8 a nivel pulmonar a la progresión de la enfermedad¹⁵⁻¹⁷, lo que hace suponer una importancia similar para la depleción de linfocitos CD4 y la progresiva disminución del cociente CD4/CD8 en el pulmón. Hemos observado en el LBA y en sangre periférica de los pacientes estudiados valores de linfocitos T CD8 superiores a los considerados normales.

La determinación de la relación existente entre subtipos de poblaciones linfocitarias de sangre y LBA puede ser interesante para valorar la alteración de la inmunidad local pulmonar en distintas complicaciones, infecciosas o no, de la infección por VIH-1^{12,14,17,18}; la presencia de células pulmonares infectadas o que expresan proteínas virales en su membrana induce el reclutamiento o expansión in situ de linfocitos T citotóxicos dirigidos selectivamente contra las células infectadas por VIH-1, según se deduce de la presencia de alveolitis linfocitaria en estos pacientes con acumulaciones de células citotóxicas en el pulmón desde estadios iniciales de la enfermedad¹⁹. Algunas de las moléculas con actividad inmunorreguladora liberadas por los macrófagos alveolares permiten la activación del sistema inmune local, la acumulación de células inmunocompetentes, incluidos linfocitos, monocitos y polimorfonucleares y,

TABLA II
Porcentaje de poblaciones y subpoblaciones linfocitarias de sangre y lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes con sida avanzado (media \pm DE)

Células	Sangre	LBA	p
Linfocitos	18,49 \pm 10,08	17,69 \pm 15,61	NS
Linfocitos T	70,74 \pm 15,58	59,98 \pm 31,67	NS
Linfocitos B	8,18 \pm 8,78	7,18 \pm 14,53	NS
CD4+	7,97 \pm 7,78	4,56 \pm 5,89	0,03
CD8+	56,20 \pm 16,53	51,10 \pm 24,11	NS
CD4+/CD8+	0,19 \pm 0,26	0,10 \pm 0,11	0,04
Natural killer	10,30 \pm 7,73	6,78 \pm 7,35	NS

TABLA III
Porcentaje de linfocitos CD4+ del lavado broncoalveolar (LBA) en pacientes con sida avanzado según valores absolutos (células/ μ l) y porcentuales de CD4+ sanguíneos (media \pm DE)

Sangre	Porcentaje CD4+ del LBA
CD4+ \geq 20/ μ l*	5,85 \pm 6,74
CD4+ < 20/ μ l*	1,80 \pm 1,36
CD4+ \geq 12%**	19 \pm 4,58
CD4+ < 12%**	2,59 \pm 1,9

*p = 0,028. **p = 0,023.

como efecto secundario, la reactivación del VIH-1. Aunque los factores que determinan la inoperancia de la respuesta inmune local pulmonar, y en particular de las células citotóxicas, son aún desconocidos, el progresivo descenso de células CD4 pulmonares es probablemente la razón principal de dicha inoperancia, ya que condiciona la total disregulación del sistema inmune pulmonar¹².

Desde un punto de vista clínico, el estudio epidemiológico de los datos obtenidos del LBA de una amplia población de pacientes infectados por VIH-1 ayudaría a verificar si la existencia de alveolitis predice la progresión clínica a sida. En esta línea, se ha postulado que las medidas preventivas de progresión de la infección por VIH-1 deberían instituirse según el recuento y tipo de poblaciones celulares del LBA¹².

El LBA, aunque es un procedimiento de mínima morbilidad, no puede efectuarse en exceso por su relativa incomodidad para el paciente, impidiendo el estudio seriado en un mismo enfermo. Sería idóneo, pues, poder relacionar las poblaciones linfocitarias del LBA con las sanguíneas de forma que éstas fueran predictoras o marcadores de las otras¹⁷. El diseño transversal del estudio y la pertenencia de los pacientes a fases avanzadas de sida (grupo C3), como casi todos los infectados por VIH que son hospitalizados, han imposibilitado un estudio de este tipo. Sin embargo, hemos observado en la disminución de la proporción de CD4 en el LBA, sin haberlo podido constatar con otros estudios, que puede establecerse un nivel de CD4 sanguíneo (12% de los linfocitos T o 20 células/ μ l) por debajo del cual la proporción de CD4 en el LBA es significativamente menor.

En resumen, la alteración inmunitaria pulmonar de pacientes con infección avanzada por VIH, detectada



mediante LBA, parece mayor de lo que puede deducirse del estudio de muestras sanguíneas; además, por debajo de cierto nivel sanguíneo de CD4 la depleción pulmonar de estas células es prácticamente total. Estos resultados pueden ser importantes para planificar la profilaxis de complicaciones, principalmente infecciosas, si se confirman en estudios posteriores de LBA de pacientes infectados por VIH en distintos estadios evolutivos de la infección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Clarke JR, Krishnan V, Bennett J, Mitchell D, Jeffries DJ. Detection of HIV-1 in human lung macrophages using the polymerase chain reaction. *AIDS* 1980; 4: 1.113-1.136.
2. Español T, Sauleda S. Respuesta inmunológica frente a la infección por el VIH. *Arch Bronconeumol* 1992; 28: 27-31.
3. Young KR, Rankin JA, Naegel GP, Paul ES, Reynolds HY. Bronchoalveolar lavage cells and proteins in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. An immunologic analysis. *Ann Intern Med* 1985; 103: 522-533.
4. Agostini C, Poletti V, Zambello R, Trentin L, Sivieso F, Spiga L et al. Phenotypical and functional analysis of bronchoalveolar lavage lymphocytes in patients with HIV infection. *Am Rev Respir Dis* 1988; 138: 1.609-1.615.
5. Johnson JE, Anders GT, Hawks CE, LaHatte LJ, Blaton HM. Bronchoalveolar lavage findings in patients seropositive for the human immunodeficiency virus (HIV). *Chest* 1990; 97: 1.066-1.071.
6. Marcy TW, Reynolds HY. Pulmonary consequences of congenital and acquired primary immunodeficiency states. *Clin Chest Med* 1989; 10: 503-519.
7. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case. Definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992; 41: 1-19.
8. Castella J. Lavado alveolar en la clínica neumológica. *Arch Bronconeumol* 1986; 22: 274-281.
9. Castella J, Llorente JL, Puzo MC, Sanchís J, Xaubet A. Normativa sobre la práctica del lavado broncoalveolar. Recomendaciones SEPAR n.º 8. Barcelona: Ediciones Doyma, 1989.
10. Klech H, Pohl W. Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL). Report of the European Society of Pneumology Task Group on BAL. *Eur Respir J* 1989; 2: 561-585.
11. Hunninghake GW, Gadek JE, Kawanami O, Ferrans VJ, Crystal RG. Inflammatory and immune processes in human lung in health and disease: evaluation by bronchoalveolar lavage. *Am J Pathol* 1979; 97: 149-206.
12. Agostini C, Trentin L, Zambello R, Semenzato G. State of the Art. HIV-1 and the lung. Infectivity, pathogenic mechanisms and cellular immune response taking place in the lower respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 1.038-1.041.
13. Taylor JMG, Fahey JL, Detels R, Giorgi JV. CD4 percentage, CD4 number and CD4:CD8 ratio in HIV infection: which to choose and how to use. *JAIDS* 1989; 2: 114-124.
14. Turner BJ, Hecht FM, Ismail RB. CD4+ T-lymphocyte measures in the treatment of individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1.561-1.573.
15. Guillon JM, Autran B, Denis M, Fouret P, Plata F, Mayaud Ch et al. Human immunodeficiency virus-related lymphocytic alveolitis. *Chest* 1988; 94: 1.264-1.270.
16. Agostini C, Zambello R, Trentin L, Poletti V, Spiga L, Gritti F et al. Prognostic significance of the evaluation of bronchoalveolar lavage populations in patients with HIV-1 infection and pulmonary involvement. *Chest* 1991; 100: 1.601-1.606.
17. Agostini C, Semenzato G. Does analysis of bronchoalveolar lavage fluid provide a tool to monitor disease progression or to predict survival in patients with HIV-1 infection? *Thorax* 1994; 49: 848-851.
18. Baughman RP. Use of bronchoscopy in the diagnosis of infection in the immunocompromised host. *Thorax* 1994; 49: 3-7.
19. Wallace JM, Barbers RG, Oishi JS, Prince H. Cellular and T-lymphocyte subpopulation profiles in bronchoalveolar lavage fluid from patients with acquired immunodeficiency syndrome and pneumonitis. *Am Rev Respir Dis* 1984; 130: 787-790.