

**LOS LINFOCITOS T REGULADORES FoxP3⁺ (Treg) SON PARTE DE LA
RESPUESTA INMUNE A LAS INFECCIONES OPORTUNISTAS EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC) ASOCIADAS A SIDA**

ANDRÉS FELIPE ZEA VERA

**UNIVERSIDAD DEL VALLE FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Santiago de Cali
2013**

**LOS LINFOCITOS T REGULADORES FoxP3⁺ (Treg) SON PARTE DE LA
RESPUESTA INMUNE A LAS INFECCIONES OPORTUNISTAS EN EL
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC) ASOCIADAS A SIDA**

ANDRÉS FELIPE ZEA VERA

**Tesis doctoral presentada para optar al título de
Doctor en Ciencias Biomédicas**

**Tutora: BEATRIZ PARRA PATIÑO. MSc. PhD.
Profesora Departamento de Microbiología
Facultad de Salud**

**UNIVERSIDAD DEL VALLE FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA
Santiago de Cali
2013**

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
INTRODUCCIÓN.....	14
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo General	36
2.2 Objetivos Específicos	36
3. OBJETIVO ESPECIFICO 1	37
Determinar si los Linfocitos T Reguladores CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (Treg) infiltran el líquido cefalorraquídeo (LCR) y se asocian con un microambiente inflamatorio específico a nivel neurológico en las Infecciones Oportunistas asociadas a SIDA.	37
3.1 Raciocinio y Justificación.....	37
3.2 Metodología	42
3.2.1 Diseño del Estudio	42
3.2.2 Área del estudio:.....	43
3.2.3 Población de estudio y tamaño de muestra:	43
3.2.4 Definición de Caso.....	45
3.3 Metodología del Laboratorio	47
3.3.1 Fenotipificación de los linfocitos infiltrantes del LCR:	47
3.3.2 Cuantificación de Citoquinas/Quimioquinas por la tecnología de análisis múltiple o xMAP (Luminex®):	50
3.3.3 Determinación de la Carga Viral (CV) del VIH-1 en el LCR:.....	51
3.3.4 Análisis de los resultados:.....	51
3.4. Resultados	51
3.5. Discusión	65
4. OBJETIVO ESPECÍFICO 2:.....	74
Evaluar la frecuencia y características de la infiltración por Treg en el tejido cerebral en casos fatales de las infecciones oportunistas más comunes en neuroSIDA.	74
4.1 Raciocinio y Justificación.....	74
4.2 Metodología	80
4.2.1 Población de estudio y Tejido cerebral proveniente de Autopsias.....	80
4.2.1 Inmunohistoquímica.....	81

4.2.2 Análisis	84
4.3 Resultados	85
5. OBJETIVO ESPECÍFICO 3:.....	94
Determinar si la diversidad clonal V β del receptor del linfocito T (repertorio V β del TCR) en los Treg infiltrantes del LCR es indicador de su origen inmunológico inducido.	94
5.1 Raciocinio y Justificación.....	94
5.2 Metodología.....	101
5.2.1 Pacientes y muestras:.....	101
5.2.2 Evaluación de la diversidad clonal de las regiones variable V β del receptor del linfocito T (TCR) por tinción y análisis de citometría de flujo (V β FACS):.....	103
5.2.3 Plan de Analisis:	107
5.3 Resultados	109
6. OBJETIVO ESPECÍFICO 4:.....	126
Evaluar la actividad supresora de los Treg, aislados del LCR en meningitis criptocócica, sobre la proliferación in vitro de los linfocitos T.	126
6.1 Raciocinio y Justificación.....	126
6.2 Metodología.....	130
6.2.1. Pacientes y muestras:.....	130
6.2.2 Purificación de los Treg (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{dim}) del LCR:	132
6.2.3 Expansión <i>in vitro</i> de los linfocitos Treg purificados del LCR:	133
6.2.4 Ensayo de inhibición de la linfoproliferación (Cocultivo Treg-LCR/LT-LCR respondedores o Treg-LCR/PBMC respondedores:	134
6.2.5. Tinción y análisis por citometría de flujo (FACS) y presentación de datos:.....	137
6.2.6 Plan de análisis:.....	139
6.2.7 Consideraciones de bioseguridad:	139
6.3 Resultados	140
6.4 Discusión	148
7. CONCLUSIONES GENERALES	158
8. PERSPECTIVAS	160
Bibliografía.....	162
ANEXOS	180
ANEXO I: PROTOCOLO TINCIÓN TREG (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP ⁺) DEL LCR PARA ANÁLISIS POR FACS	180

ANEXO II: FRECUENCIA DE TREG INFILTRANTES DEL LCR (% DEL TOTAL DE LTCD4 ⁺) Y CARACTERÍSTICAS DEL CITOQUÍMICO DEL LCR EN LOS 76 CASO EVALUADOS.	182
ANEXO III: DOBLE TINCIÓN (CD3, FoxP3) PARA INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDO CEREBRLA PRESERVADO EN PARAFINA.	185
ANEXO IV: CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS EVALUADOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LOS MARCADORES CD3 Y FoxP3 EN MUESTRAS PROVENIENTES DE AUTOPSIAS DE PACIENTES FALLECIDOS POR INFECCIONES OPORTUNISTAS DEL SNC ASOCIADAS A SIDA.....	189
ANEXO V: PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE LAS FAMILIAS DEL TCR V β EN TREG Y LTCD4 ⁺ (CONVENCIONALES) EN 6 CASOS DE CRIPTOCOCOSIS MENINGEA ASOCIADA A SIDA.....	191
ANEXO VI: PROTOCOLO DE PURIFICACION DE LOS Treg (CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{dim}) DEL LCR.	196
ANEXO VII: PROTOCOLO DE EXPANSION DE TREG DEL LCR	198
ANEXO VIII: PROTOCOLO DE TINCION CON CFSE PARA EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR	201

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Mortalidad a Tres meses.....	54
Figura 2. Cinética de viabilidad ex vivo de los LTCD4 ⁺ del LCR.....	55
Figura 3. Acumulación de Linfocitos T Reguladores (Treg) en el LCR en infecciones oportunistas (IO) del SNC.....	59
Figura 4. Los Treg se correlacionan con la carga viral del VIH y los niveles de IL-10 en el LCR.....	61
Figura 5. La acumulación de Linfocitos T Reguladores (Treg) en el LCR se correlaciona con los niveles de linfocitos T activados infiltrantes.....	63
Figura 6. Control positivo de los Treg.....	86
Figura 7. Infiltración de Tregs de un caso con Toxoplasmosis cerebral.....	87
Figura 8. Frecuencia de los Treg en el Tejido cerebral de Infecciones oportunistas en NeuroSIDA.....	89
Figura 9. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de los Vβ del TCR en los linfocitos T del LCR y sangre en un ejemplo representativo de un paciente con Criptococosis meníngea (N146)...	106
Figura 10. Frecuencia de expresión de los TCR Vβ en los Treg del LCR.....	110
Figura 11. Frecuencia de expresión de las familias Vβ en los LTCD4 ⁺ (A) y en los Treg (B) del líquido cefalorraquídeo de 6 pacientes con criptococosis meníngea.....	112
Figura 12. Clonogramas de la variabilidad del TCR en los LTCD4 ⁺ convencionales (FoxP3-) en el LCR (barras azules) o en sangre periférica (barras rojas).....	114

Figura 13. Clonograma del Repertorio V β en los Treg del LCR (barras azules) y LTCD4 ⁺ del LCR (barras rojas).....	118
Figura 14. Clonograma de las familias V β del TCR en los Treg de LCR (barras azules) y Treg de Sangre (barras rojas) en casos de Criptococosis meníngea.....	119
Figura 15. Estrategia de análisis por Citometría de flujo (FACS) del ensayo de linfoproliferación de los LT respondedores (depletados de Treg)-del LCR de un paciente representativo con criptococosis meníngea e infección VIH/SIDA.....	138
Figura 16. Purificación de Tregs del LCR de pacientes con criptococosis meníngea.....	142
Figura 17. Pobre expansión <i>in vitro</i> de los Treg purificados del LCR...	143
Figura 18. Inhibición de la proliferación de los LTCD4 ⁺ (células respondedoras) del LCR en A, C, D y de sangre periférica en B mediado por los Treg del LCR autólogos.....	146
Figura 19. Los Treg del LCR suprimen la proliferación de LT CD4 ⁺ y CD8 ⁺ :.....	147

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características Socio-demográficas y Clínicas de los Pacientes VIH/SIDA.....	53
Tabla 2. Marcadores Inmuno-virológicos de la infección VIH/SIDA en la Sangre y el líquido cefalorraquídeo según el diagnóstico.....	55
Tabla 3. Subpoblaciones de linfocitos T (Treg, LT activados y relación CD4/CD8) en el Líquido Cefalorraquídeo y Sangre de pacientes VIH/SIDA con Infecciones Oportunistas del SNC.....	57
Tabla 4. Nivel de Expresión (MFI) de la Proteína FoxP3 en los Linfocitos T Reguladores (Treg) del LCR y sangre.....	60
Tabla 5. Correlación entre Marcadores Inmuno-Virológicos, Citoquinas y el Porcentaje de Treg en el LCR.....	65
Tabla 6. Composición del Kit para análisis FACS del TCR V β	104
Tabla 7. Variabilidad clonal del TCR V β en los linfocitos T CD4 ⁺ convencionales (CD4 ⁺ FoxP3-) infiltrantes del LCR (LTCD4 ⁺ LCR) o en PBMC (LTCD4 ⁺ sangre).....	115
Tabla 8. Expansión clonal de los Treg o LT CD4 ⁺ en el LCR.....	117
Tabla 9. Rendimiento de la purificación de Treg a partir del LCR y ensayos de expansión <i>in vitro</i> e inhibición de la proliferación con los Treg.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Aloficocianina
ARV: tratamiento antirretroviral
AZT: Zidovudina
BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes
CM: Criptococosis Meníngea
CMV: Citomegalovirus
DANE: Departamento Administrativo Nacional de Estadística
DC: Células dendríticas
DMSO: dimetil sulfoxido
EBV: Virus Epstein Barr
FACS: Citometría de flujo (Fluorescence-activated cell sorting)
FITC: isotiocianato de fluoresceína
FSC: forward scatter
GXM: glucuronoxylomannan
HAD: Demencia asociada a VIH
HSV: Virus Herpes Simple
HUV: Hospital Universitario del Valle
IFN- γ : Interferón-gamma
IL-10: Interleuquina 10
IL-4: Interleuquina 4
IO: Infecciones oportunistas
IPEX: Síndrome de inmunodesregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al X
IRIS: Síndrome de reconstitución inmunológica
iTreg: Linfocitos T reguladores inducibles
JCV: John Cunningham virus
LCR: Líquido Cefalorraquídeo
LT: Linfocitos T
LTCD4⁺: Linfocitos T CD4 positivos
LTCD8⁺: Linfocitos T CD8 positivos
MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MFI: intensidad media de fluorescencia
MMP-9: metaloproteínasa de la matriz -9
NFAT: factor nuclear de células T activadas
NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa

NIAID: instituto nacional de alergias y enfermedades infecciosas de Estados Unidos
NIMHANS: National Institute of Mental Health and Neurosciences
nTreg: Linfocitos T reguladores naturales
OMS: Organización mundial de la salud
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PE: ficoeritrina
PL: punción Lumbar
RMN: resonancia magnética nuclear
RPR: reagina plasmática rápida
SFB: Suero fetal bovino
SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIVIGILA: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Publica
SNC: Sistema nervioso central
SSC: Side Scatter
TAC: tomografía axial computarizada
TARGA: Terapia antirretroviral de gran actividad
TBM: Tuberculosis Meningea
TC: Toxoplasmosis Cerebral
TCR: receptor de células T
TGF- β : Factor Transformante Beta
TIGIT: Inmunoreceptor del linfocito T con dominios Ig e ITIM
Tr1: Linfocitos Reguladores T1
Treg: Linfocitos T reguladores
VDRL: Venereal Disease Research Laboratory
VIH: Virus de Inmunodeficiencia humana
3H-TdR: timidina tritiada

RESUMEN

INTRODUCCION. Una de las principales causas de muerte en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en Colombia y en los países en desarrollo son las infecciones oportunistas (IO) del del Sistema Nervioso Central (SNC). A pesar de que existen tratamientos específicos para estas patologías tan comunes (toxoplasmosis, criptococosis y tuberculosis) los pacientes fallecen y no se conoce con exactitud los mecanismos de patogénesis asociados. Debido a que algunas IO a nivel sistémico en pacientes VIH⁺ también se han asociado con progresión de la enfermedad, es posible que estas infecciones en el SNC medien neuropatología alterando la respuesta inmune ya sea por una inflamación exagerada o a través de inmunosupresión. Los linfocitos T reguladores (Treg), representan una población celular importante a ser evaluada en el contexto de neuropatogénesis del VIH por su potencial inmunomodulador y por la relevancia que tienen en la patogénesis del VIH/SIDA. **OBJETIVO.** Con el propósito de explorar mecanismos patogénicos relacionados con neuroinflamación por Infecciones oportunistas durante SIDA, se determinó si los linfocitos T reguladores con un fenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) hacen parte de la respuesta inmune a estos patógenos en el SNC. **METODOLOGIA.** Se realizó un estudio descriptivo en el que se fenotipificaron subpoblaciones de LT en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con las IO del SNC mas frecuentes en pacientes con VIH/SIDA. La frecuencia (%) de Treg [CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺] en el LCR se determinó mediante el análisis por citometria de flujo (FACS) en 76 pacientes en fase de SIDA con y sin infecciones oportunistas (IO) del sistema nervioso central.

La infiltración del SNC por Treg también fue investigada por inmunotinción de linfocitos T FoxP3⁺ en tejido cerebral de autopsias. Se evaluó la especificidad antigénica de los Treg del LCR en criptococosis meníngea, determinada por la diversidad clonal Vβ del TCR comparativamente con su contraparte en los LT CD4⁺ convencionales. Finalmente se evaluó la capacidad supresora inmunológica *ex vivo* de los Treg del LCR sobre los LT convencionales en ensayos de proliferación en cultivo en respuesta a coestimulación CD3/CD28 e interleuquina 2 humana recombinante (hrIL-2). **RESULTADOS:** Los linfocitos T reguladores (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) se acumulan en el SNC de los individuos con neuroSIDA por Infecciones oportunistas. La magnitud de la infiltración por los Treg en el LCR fué mayor que en la sangre especialmente en toxoplasmosis cerebral y las meningitis criptocócica y tuberculosa. Los Treg en el tejido cerebral tienen un proceso activo de migración y localización específica a los sitios de infección oportunista reflejando el proceso patogénico. Los Treg infiltrantes del LCR en criptococosis meníngea comparten especificidad antigénica con los LTCD4⁺ convencionales de acuerdo a su repertorio Vβ del TCR y son incapaces de proliferar *in vitro* indicativo de su origen inducido por antígeno, por lo tanto al menos una fracción de estos linfocitos en el LCR corresponde a los iTreg. Muy importante, los Treg del LCR retienen *ex vivo* su capacidad supresora de la proliferación de los LT convencionales del foco de la infección, con un efecto inhibitorio más pronunciado sobre los LT CD8⁺,

CONCLUSION: Este estudio contribuye con evidencia soportando la hipótesis de que los Treg son parte de la respuesta inmune y el proceso neuropatológico de

las IO en el SNC asociadas a SIDA. Los resultados también soportan el origen inducido por antígeno de una fracción de estos Treg (iTreg) y revela su potencial inmunomodulador in vivo sobre los LT del foco de la patología. Por lo tanto, la co-infección con IO podría alterar la neuropatogénesis del VIH afectando el balance entre los mecanismos inmunológicos efectores y reguladores de inflamación en el sistema nervioso. Es la primera vez que se describe la presencia de los Treg en el proceso neuropatológico de las IO asociadas a SIDA pero su impacto biológico debe ser estudiado a futuro.

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) afecta alrededor de 34 millones de personas en el mundo, acorde al estimado de la Organización Mundial de la Salud (OMS)[1]. La mayoría de las personas viviendo con VIH habitan en países de bajos o medianos recursos haciendo mucho más compleja la situación de las personas infectadas. Desde la aparición de la epidemia, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) ha cobrado la vida aproximadamente 25 millones de personas, y se calcula que para 2011 cerca de 2 millones de personas murieron por esta causa[2]. Para Colombia en 2009 el promedio diario de casos nuevos de SIDA fue de 18[3], y en el año 2011 se registraron 5.650 casos de muerte por SIDA[1]. En el departamento del Valle del Cauca la mortalidad relacionada con SIDA fue de 1.6 x 100.000 habitantes en el 2009[3] mientras en la ciudad de Cali se reportaron 465 casos nuevos de infección por VIH en el año 2011, de los cuales el 20% fueron diagnosticados en etapa de SIDA y se reportaron 38 fallecimientos por esta causa[1], sin embargo el subregistro es evidente si se tiene en cuenta que solo en una institución de tercer nivel (sitio de realización del presente estudio) en 2008 se presentó una mortalidad similar a la reportada en toda la ciudad para 2011, además de una gran discordancia entre los datos reportados por el DANE y los registros del SIVIGILA. Las infecciones oportunistas (IO) del sistema nervioso central (SNC), son una de las causas más comunes de enfermedad neurológica y mortalidad en los

pacientes infectados por el VIH que desarrollan SIDA (NeuroSIDA), en los países en desarrollo[4, 5] y hasta en el 30% de los casos es la enfermedad trazadora del progreso a SIDA[6]. El escaso conocimiento de los mecanismos de enfermedad y patogénesis de las IO en el SNC ha dificultado su diagnóstico temprano y tratamiento, influyendo negativamente en el manejo y pronóstico de la enfermedad[7]. Uno de los problemas más difíciles en NeuroSIDA es la falta de claridad en los procesos patogénicos que conducen al desarrollo de IO y cómo la interacción de la inmunosupresión sistémica y la respuesta inmune local a nivel del sistema nervioso central (SNC) facilitan el desarrollo de tales infecciones. Una alta proporción de estos pacientes (hasta el 40%) fallece a pesar de la instauración oportuna de terapias antimicrobianas específicas y el manejo adecuado en unidades de cuidado crítico[8].

Una de las preguntas sin resolver en las afecciones neurológicas por IO en SIDA, es si estas complicaciones se originan a partir de las anomalías inmunológicas inducidas por el VIH en el cerebro, o por el microambiente inmunológico único del sistema nervioso central. El desarrollo preferencial de algunas infecciones oportunistas, al igual que la predilección de estos patógenos por ciertas áreas del cerebro, sugiere diferencias en la respuesta inmune a estos microorganismos en el SNC, o diferencias en las respuestas de protección o susceptibilidad en el SNC comparado con otros órganos. Por ejemplo, toxoplasmosis cerebral y criptococosis meníngea son las infecciones oportunistas más comunes en el SNC, mientras que la tuberculosis o los agentes virales como Citomegalovirus (CMV), Epstein-Barr virus (EBV), herpes simplex virus (HSV) o

John Cunningham virus (JCV), son agentes oportunistas menos frecuentes en SIDA a pesar de ser los patógenos que persisten mas comúnmente en los reservorios tisulares humanos. Por otra parte, la persistencia de ciertos patógenos tal como *Cryptococcus neoformans* en el SNC y su desenlace fatal, pueden ser la resultante de una respuesta inmunológica ineficiente en el SNC, que falla en el control de la infección al desviar la respuesta a un perfil anti-inflamatorio. A este respecto se conoce que una respuesta inmune efectora vigorosa, con producción del interferón gamma (IFN- γ), detectado en el liquido ceforraquídeo (LCR), se asocia con una mejor protección y mayor sobrevida en esta infección. Es de resaltar que un porcentaje importante de pacientes con IO del SNC fallecen durante el tratamiento, y la mayoría de los sobrevivientes desarrollan secuelas y complicaciones neurológicas crónicas que limitan la calidad de vida. Por todo lo anterior, es plausible que nuevas alternativas terapéuticas que busquen modular la respuesta inflamatoria, favoreciendo las respuestas inmunes benéficas, podrían ser una opción para mejorar el pronóstico.

La sobrevivencia a una infección en el sistema nervioso central, requiere un control estricto de la respuesta inmune inflamatoria. Mientras la falla en restaurar la homeóstasis inmune en el tejido cerebral después de una infección puede conducir a inmunopatología, una prematura o excesiva modulación de la respuesta inmune antes de la eliminación completa de los microorganismos podría favorecer su persistencia. El microambiente cerebral en condiciones de homeóstasis es esencialmente tolerogénico a la respuesta inmune, sin embargo no hay suficiente información acerca de la contribución del privilegio inmunológico

o de los mecanismos inmunomoduladores del sistema nervioso en la regulación de la inflamación inducida por las IO.

Los linfocitos T reguladores (Treg) caracterizados por el fenotipo $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ modulan las respuestas inflamatorias mediante la supresión de la activación y proliferación de otros linfocitos T, en tejido linfoide y presumiblemente en otros tejidos con un ambiente tolerogénico como el tracto gastrointestinal. La evidencia actual sugiere que los Treg juegan un papel dual (protección y patogénesis) importante durante las infecciones virales crónicas como el VIH. Una hipótesis sugiere que los Treg pueden controlar la activación inmunológica “aberrante” en la fase crónica de la infección por VIH (función protectora) evitando el daño tisular y la pérdida por sobreactivación de clonas de LT específicos al VIH. Contradictorio con los anteriores resultados, se ha encontrado que la presencia de Treg en estadios avanzados de enfermedad se asocia a cargas elevadas del VIH, posiblemente por el efecto supresor de los Treg sobre las respuestas específicas al virus (efecto patogénico). El fenotipo, la frecuencia y función de los linfocitos T reguladores en la infección VIH parece depender de la fase de la enfermedad y del órgano donde se evalúen. Por lo tanto, para resolver la contradicción existente acerca del papel dual de los Treg en la infección VIH/SIDA es crucial caracterizar y evaluar los Treg en los tejidos y compartimentos asociados a la patogénesis del VIH. En este sentido, a pesar de que el SNC es un reservorio del virus desde la infección aguda por el VIH, y las complicaciones neurológicas asociadas a esta infección persistente son muy

frecuentes en inmunosupresión (NeuroSIDA), no se ha examinado aún el papel de los Treg en la neuropatogénesis del VIH/SIDA.

Los Treg parecen ser factores cruciales en la patogénesis de otras enfermedades neurológicas como neoplasias de alto grado (glioblastoma multiforme) o trastornos autoinmunes tipo esclerosis múltiple, además existe alguna evidencia en modelos murinos de NeuroSIDA que sugiere que pudieran tener un papel en la neuropatogénesis del VIH[9]. Por lo tanto, es factible pensar que los Treg juegan un papel inmunológico importante en el sistema nervioso central en SIDA.

La hipótesis general de este estudio propone que los Treg son parte de los mecanismos de inmunomodulación en las infecciones oportunistas del SNC y la caracterización de esta respuesta inmune sería importante en el futuro para proponer alternativas terapéuticas basadas en la manipulación de su función reguladora. Con el propósito de encontrar evidencia de la participación de los Treg con fenotipo $CD4^+ CD25^+ FoxP3^+$, en la neuropatogénesis de las IO asociadas a SIDA, esta tesis doctoral buscó, en los objetivos 1 y 2, determinar primero la factibilidad de su detección a nivel del sistema nervioso central (LCR o tejido) en NeuroSIDA por las IO más comunes, utilizando análisis FACS e inmunohistoquímica; y segundo, evaluar si estos Treg ($FoxP3^+$) se acumulaban en el foco de la infección oportunista concurrentemente con un microambiente de inmunosupresión o tenían una distribución específica en el tejido. Posteriormente se intentó caracterizar si los Treg detectados en el SNC son parte de la respuesta inflamatoria específica a la coinfección VIH/IO, evaluando la diversidad clonal $V\beta$

de los receptores del Linfocito T (TCR) en los Treg y LT CD4⁺ convencionales del LCR en el Objetivo 3. Finalmente, en el objetivo 4 se examinó la capacidad funcional de los Treg, aislados *ex vivo* del LCR en las criptocosis meníngeas, para suprimir *in vitro* la proliferación de los linfocitos T, como una aproximación preliminar a predecir su función inmunoreguladora *in vivo*.

1. MARCO TEORICO Y REVISIÓN DE LA LITERATURA

1.1 Complicaciones Neurológicas asociadas a VIH/SIDA

La infección por VIH produce complicaciones clínicas en el sistema nervioso central que causan deterioro de las funciones mentales superiores, discapacidad física y mental en los pacientes afectados. Estos problemas neurológicos se denominan NeuroSIDA y son el resultado de: 1) Infecciones Oportunistas (IO) asociadas a la inmunosupresión severa por depleción sistémica de los $LTCD4^+$ durante el progreso a SIDA, 2) Alteraciones motoras y cognitivas, denominado el complejo HAND, que incluyen desde alteraciones neuropsicológicas asintomáticas hasta la forma más grave de demencia asociada a VIH (HAD); causados por la desregulación inmunológica de la microglía/macrófago perivascular infectados o activados por el VIH y 3) Complicaciones de la terapia antirretroviral que pueden ser: directas como el efecto neurotóxico del tratamiento antirretroviral, asociado principalmente con neuropatía periférica o indirectas relacionadas con el síndrome de reconstitución inmunológica (IRIS)[10, 11]. Contrario a la situación actual en países europeos o Norteamérica, donde el uso de antirretrovirales ha modificado la epidemiología del NeuroSIDA, con una disminución marcada en la incidencia de infecciones oportunistas y aumento de la prevalencia de otras complicaciones asociadas directamente al virus, (como demencia o neuropatía), en los países en vías desarrollo, las IO aún son las complicaciones neurológicas más comunes del SIDA [4, 5].

Antes de la disponibilidad de terapia antirretroviral de gran actividad (era pre-TARGA) las infecciones neurológicas oportunistas eran la enfermedad trazadora de SIDA en el 20% de los casos. Hoy día se estima que en ausencia de terapia antirretroviral hasta el 40% de las personas infectadas con VIH desarrollarán alguna complicación neurológica, por infecciones oportunistas o atribuibles al virus de inmunodeficiencia humana per se[12-14]. En Colombia hay cerca de 170.000 personas infectadas con VIH, y se estima una prevalencia de 0.52% en población joven. Debido al diagnóstico tardío de la infección por el VIH y a la baja cobertura antirretroviral, existe un riesgo alto de desarrollar complicaciones neurológicas e infecciones oportunistas en el sistema nervioso central.

Se entiende por IO a las infecciones causadas por microorganismos que usualmente no causan enfermedad en individuos inmunocompetentes. La toxoplasmosis cerebral (TC) y la criptococcosis meníngea (CM) son las infecciones más frecuentes del SNC, seguidas por tuberculosis meníngea (TBM), neurosífilis (NS) u otras complicaciones asociadas a virus como la leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML) asociada al virus JC o el linfoma primario del SNC asociado al virus Epstein-Bar (EBV)[15, 16]. La TC se manifiesta frecuentemente como lesiones de los ganglios basales u otras áreas supratentoriales, que producen diversas manifestaciones clínicas de acuerdo a la localización y compresión de estructuras nerviosas (efecto masa); estas manifestaciones son principalmente déficit motor (hemiplejia o hemiparesia), síndromes convulsivos, trastornos cognoscitivos y síndrome de hipertensión intracraneana[17]. La CM es la manifestación más común de infección por

Cryptococcus neoformans en pacientes VIH⁺, y se caracteriza por ser una meningitis crónica no exudativa, pero en ocasiones se pueden desarrollar microabscesos o criptococomas en los ganglios de la base; aproximadamente el 90% de los casos se presentan con cefalea intensa, asociada al incremento de la presión intracraneana[18]. Hasta el 60% de los casos de CM presentan recaídas después del tratamiento antimicótico, requiriendo terapias prolongadas de mantenimiento[19]. La TBM, tiene una mortalidad de hasta el 60% en las personas infectadas con el VIH; se caracteriza por compromiso meníngeo y de ganglios de la base, pero también puede producir lesiones tipo “masa” denominadas tuberculomas, en cualquier región cerebral[20]. La NS resulta de la infección del SNC por el *Treponema pallidum*; la infección con el VIH-1 altera la historia natural de la sífilis, aumentando el riesgo de progreso a neurosífilis, mayor severidad, una respuesta inadecuada al tratamiento y dificulta el diagnóstico. Las manifestaciones clínicas más comunes de neurosífilis asociadas al VIH-1 son meningitis aguda y enfermedad meningovascular[21].

El pronóstico y sobrevida de los individuos con IO del sistema nervioso es muy pobre, inclusive con disponibilidad de tratamiento antimicrobiano específico y manejo en una unidad de cuidado intensivo de las complicaciones cerebrovasculares y de la hipertensión endocraneana[8]. Las tasas de mortalidad alcanzan el 50%[16] y los sobrevivientes tienen una alta morbilidad[22].

1.2 Inmunopatogénesis mediada por las IO del SNC

El desarrollo preferencial de ciertas IO en el SNC, sugiere que tanto la susceptibilidad como la respuesta inmune del cerebro a los patógenos es diferente si se compara con otros órganos o tejidos. Es llamativo que aunque una gran cantidad de patógenos establecen infecciones latentes en el humano (a nivel sistémico o en el SNC), no todos estos microorganismos son patógenos relevantes en el SNC en individuos VIH⁺. La TC y CM[15] son más frecuentes que las meningitis tuberculosas y las complicaciones por virus (CMV, EBV, HSV o virus JC)[16] son las menos comunes a pesar de que la seroprevalencia de estos virus en adultos VIH⁺ es entre 92-99%[23]. Por otra parte, las IO en el sistema nervioso podrían impactar la neuropatogénesis mediada directamente por el VIH o alterar la dinámica del virus latente en el SNC, al aumentar el tráfico de células infectadas al cerebro, la secreción de citoquinas proinflamatorias y la replicación viral del VIH[24-26]. Como soporte a esta hipótesis, una infección oportunista como la tuberculosis pulmonar en las personas infectadas con VIH ha sido tradicionalmente asociada con una acelerada progresión de la enfermedad a SIDA, un pobre pronóstico y en general mayor morbimortalidad[27].

No se conocen completamente los procesos patogénicos que ocurren al interior del sistema nervioso durante las infecciones oportunistas puesto que la información es limitada, principalmente por la ausencia de un modelo animal adecuado y pocos estudios clínicos. La mayoría de la información en humanos proviene de estudios de inmunohistoquímica de casos de autopsias (reflejando la respuesta en estadios avanzados y/o terminales de la enfermedad) o análisis de

marcadores solubles en el LCR (medidas subrogadas) de los procesos patológicos que ocurren en el SNC como son el infiltrado celular (predominantemente monocitario), el predominio de ciertas citoquinas inflamatorias y quimioquinas (por ejemplo MCP-1) y la replicación viral activa en el SNC[26, 28, 29]. El LCR ofrece una excelente oportunidad para evaluar in vivo el microambiente producido en el SNC puesto que su producción representa en tiempo real lo que ocurre en las meninges, plexos coroideos y regiones corticales cerebrales. En este orden de ideas evaluar el fenotipo inmunológico de las células que infiltran el SNC (LCR y tejido) aportaría información crucial acerca del tipo de respuesta inmune inducida por los microorganismos oportunistas, hallazgos que serían útiles para entender los mecanismos de daño y protección frente a las IO en el SNC infectado persistentemente por el VIH.[30]

La respuesta inmune adaptativa es en gran medida la responsable de la resolución de las IO en el cerebro. Se sabe que la respuesta de linfocitos T es crucial para la eliminación de patógenos como *Toxoplasma gondii* [31] y *Cryptococcus neoformans*, en particular el IFN- γ es indispensable para conferir resistencia a la infección aguda, y evitar las complicaciones tardías; consecuentemente su detección se ha relacionado con buen pronóstico protección e incremento en la supervivencia[32-34]. Por otra parte la persistencia de *C. neoformans* en el cerebro (con un desenlace fatal) se ha relacionado con la falla de los mecanismos inmunes efectores y una desviación de la respuesta inmune hacia un perfil supresor caracterizado por la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, TGF- β o IL-4[35, 36] o también a factores de

virulencia de la levadura como el glucoronoxilomanan (GXM), el cual retrasa la migración de linfocitos T al cerebro[37] o es capaz de inhibir las respuestas efectoras de los linfocitos T[38]. Entender los mecanismos reguladores encargados de controlar la inflamación al interior del SNC es indispensable considerando que el cerebro es un órgano inmunoprivilegiado en el cual la respuesta inmune debe ser finamente regulada para evitar inmunopatología.

La respuesta inmune en el sistema nervioso debe ser lo suficientemente eficaz para eliminar completamente los patógenos, evitando el daño del tejido. En el cerebro la regulación inmunológica debe ser mucho más estricta, puesto que se trata de un compartimiento restringido por la bóveda craneana, en el cual una inflamación exagerada desencadenara daño por compresión del tejido nervioso[39]. Teniendo en cuenta este requisito del sistema nervioso de generar respuestas inmunes efectivas pero controladas, los mecanismos supresores inmunológicos surgen como blancos interesantes de ser evaluados en las infecciones oportunistas asociadas al SIDA.

1.3 Linfocitos T reguladores: Naturales e inducibles.

Los linfocitos T reguladores ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) o los Treg, son una subpoblación de linfocitos $CD4^+$ indispensable para el control de la activación inmunológica de los linfocitos T efectores[40]. La tolerancia inmunológica es la responsable de evitar el daño tisular mediado por células autoreactivas, pero permitiendo una respuesta efectiva contra los patógenos[41]. La mayoría de los LT $CD4^+$ autoreactivos son eliminados en el timo (tolerancia central), sin embargo algunos

LT que escapan a este mecanismo de selección son controlados posteriormente a nivel periférico por los Treg [42].

El factor de transcripción FoxP3, perteneciente a la subfamilia “forkhead/winged-helix box-containing protein P”, es indispensable para la función reguladora de los Treg. Las mutaciones en el gen que codifica para FoxP3 son las responsables del síndrome clínico infrecuente conocido como IPEX (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) [43, 44][45]. FoxP3 contiene una región C terminal con un dedo de zinc y un dominio oligomerización tipo cremallera y un dominio N terminal de unión de DNA tipo “forkhead” altamente conservados[46, 47], y rico en prolinas [48] que es importante en la función inmunoreguladora de los Treg[49]. En el humano se encuentran 2 isoformas de FoxP3, FoxP3a y FoxP3b [50]. FoxP3b carece del exon2 que es fundamental para su asociación a los receptores nucleares ROR α y ROR γ , por lo cual FoxP3a es la isoforma necesaria para la diferenciación de los linfocitos T reguladores[46]. Un efecto importante del FoxP3 es que regula la producción de una gran variedad de citoquinas a través de la interacción con proteínas asociadas, incluyendo factores de transcripción, como son el factor nuclear de células T activadas (NFAT), NF- κ B y Runx1/AML1[48, 51]; tanto NFAT como Runx1/AML1 son necesarios para la expresión de IL-2 después de la estimulación de linfocitos mediada por el TCR [52]. La asociación del FoxP3 con NFAT y Runx1/AML1 reprime la activación de los promotores de IL-2, IL-4 e IFN- γ , estas interacciones son las responsables del aumento de expresión de CD25 y CTLA-4.

Previamente a la identificación del FoxP3 como el gen maestro de los Treg, se reconoció la existencia de dos subpoblaciones de los Treg, Treg naturales (nTreg) y los Treg inducibles o iTreg [53]; estas dos poblaciones comparten mecanismos de acción (dependientes de contacto) pero se diferencian en el origen, la especificidad antigénica y estabilidad al estímulo con citoquinas [54, 55]. Los nTreg se desarrollan en el timo en respuesta a autoantígenos y se relacionan principalmente con la prevención de autoinmunidad[56, 57]; mientras los iTreg, se desarrolla en la periferia a partir de LT CD4⁺ convencionales en respuesta a citoquinas reguladoras (TGF- β e IL-10) y antígenos ambientales, principalmente microorganismos[58, 59]. Los iTreg participan principalmente en la regulación de las respuestas inmunes a las infecciones. Las dos subpoblaciones de losTreg expresan altos niveles de CD25 (cadena α del rIL-2) y las moléculas CTLA-4, GIRT, CCR4 y CD62L[57]. No hay marcadores celulares definidos que distingan claramente entre estas dos poblaciones de los Treg (naturales e inducibles). Los marcadores más prometedores son Helios y Neuropilin 1 (Nrp1), sin embargo no están validados[60]. Adicionalmente a los iTreg, se han descrito dos subpoblaciones de linfocitos T reguladores inducidos a partir de linfocitos T convencionales pero que no expresan la molécula FoxP3; estos son los Linfocitos Reguladores T1 (Tr1) que secretan IL-10 y LT productores de factor transformante beta (TGF- β)[61]. Los mecanismos que se han relacionado con el potencial supresor de los Treg, se han dividido tradicionalmente en dependientes de contacto directo con las células dendríticas (DC) o los linfocitos T (LT) y los

independientes de contacto (secreción de sustancias reguladoras) revisados en [41, 62, 63].

Varias moléculas de superficie celular han sido relacionadas con la función supresora de los Treg. El CD25, cadena α del receptor de IL-2 y marcador original de los Treg, es indispensable para la homeostasis de los Treg[64], y la función inhibitoria de la proliferación de los LT convencionales por privación de la IL-2 [65]. El CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte antigen 4) también conocido CD152, es una molécula que en los Treg está implicado en suprimir la respuesta inmune al reducir la inmunogenicidad en las células dendríticas y/o la capacidad proliferativa en los LT convencionales[66]. Las moléculas CD39[67] y CD73[68], dos ectoenzimas expresadas en altas proporciones en los Treg, son importantes en la supresión mediada por contacto de las Treg, al facilitar la producción de adenosina y la extrusión del AMP cíclico[69, 70]. La señalización iniciada por adenosina no solo inhibe directamente los LT efectores sino que también impacta negativamente la función de las células dendríticas. Otras moléculas de superficie de los Treg FoxP3⁺ importantes para su función reguladora son: LAG-3 (homólogo del CD4 con alta afinidad al MHC-II)[71], bloquea la maduración de las células dendríticas inmaduras e inhibe su capacidad coestimuladora[72]; TIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) induce la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 y TGF- β [73]; Neuropilin-1 que bloquea la función de las células dendríticas [74]; otras moléculas asociadas al papel supresor de los Treg son OX40, GITR y TNFRII[63]. Muchas de las anteriores moléculas inducen señales “tolerogénicas” para la célula dendrítica que se traducen en incremento

intracelular de los niveles de IDO (indolamin -2,3- dioxigenasa), y la disminución de la disponibilidad de triptófano para el LT, impidiendo su activación[75-77].

Varias proteínas solubles están implicadas en la supresión mediada por las Treg, independiente de contacto célula-célula. La IL-10 suprime la activación de macrófagos al inhibir: la secreción de citoquinas (IL-12 y TNF- α), la expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas clase II del MHC y subsecuentemente la activación de los LT[58, 78]. El TGF- β inhibe la proliferación de LT al inhibir el ciclo celular[79, 80], efecto que se ve potenciado en presencia de IL-10; otra citoquina que contribuye a la función reguladora de los Treg es la IL-35 [81]. La citólisis de las células blanco también ha sido postulada como un mecanismo de los Treg para inhibir a los LT, a través de granzima B [82] y perforina [83]

1.4 Treg en Enfermedad

La función supresora de los Treg parece ser muy importante durante procesos infecciosos[84], autoinmunidad[85], trasplante[86], alergia[87] y cáncer[88]. En humanos, las mutaciones que resultan en disfunción de la molécula FoxP3 impiden la generación de los Treg y causan el síndrome de inmunodesregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligado al X (IPEX)[46], caracterizado por ser una enfermedad autoinmune fatal. Además alteraciones en la cantidad o función de los Treg se han asociado con enfermedades autoinmunes como lupus eritematoso sistémico[89], artritis reumatoide[90] y esclerosis múltiple[91] entre otras. También se ha encontrado una asociación entre infiltración por los Treg de lesiones tumorales con mal pronóstico, y se hipotetiza que los Treg inhiben las respuestas

inmunes anti-tumorales específicas, necesarias para la eliminación de las células cancerosas[92].

Uno de escenarios en los que los Treg tienen mayor relevancia es en las enfermedades infecciosas y se ha propuesto que juegan un papel dual; durante las infecciones agudas las Treg serían indispensables para evitar el daño de los tejidos inducido por la respuesta inmune, mientras en las infecciones crónicas los Treg pudieran estar relacionadas con la persistencia de los microorganismos[93]. Es así como por ejemplo, que los Treg que se acumulan en las lesiones cutáneas por *Leishmania Braziliensis*, inhiben la proliferación de los LT en respuesta a estímulos policlonales[94, 95]; en tuberculosis el número de los Treg esta incrementado tanto en sangre, como en los sitios de infección activa por *Mycobacterium tuberculosis* (espacio pleural o parénquima pulmonar) y la frecuencia de Treg FoxP3⁺ es inversamente proporcional a la respuesta inmune específica a *M tuberculosis*[96, 97]; o la correlación existente entre la persistencia del virus de papiloma humano (VPH16) y la presencia de Treg en el epitelio cervical[98]. Estos hallazgos sugieren que los Treg modulan las respuestas inmunes frente a microorganismos *in vivo* y se correlacionan con los procesos patogénicos.

1.5 Linfocitos T reguladores en la Infección por VIH/SIDA.

Desde la identificación del FoxP3 como el gen maestro de los linfocitos T reguladores, se reconoció que el VIH-1 era capaz de inducir la expansión de los Treg con fenotipo CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺, que inhibían las respuestas específicas

de los LTCD4⁺ al virus[99] ; y que estos treg se acumulan en sitios donde ocurre la replicación viral activa, como es el tejido linfoide, encontrándose una correlación con la replicación del VIH a nivel sistémico y progresión de la enfermedad a SIDA[100-103].

En VIH/SIDA los Treg pueden tener un papel dual, puesto que son capaces de inhibir la activación de linfocitos T disminuyendo la sobreactivación inmunológica, la apoptosis por espectador inocente o “bystander” y la pérdida de LTCD4⁺ (con un potencial efecto benéfico), pero que por otro lado también podría ser dañino al inhibir respuestas de LT específicas al VIH que se traducirían en un aumento de la carga viral de VIH[104, 105].

La caracterización de los Treg en pacientes VIH⁺ viremicos ha sido tradicionalmente un dilema diagnóstico, puesto que la expresión de los marcadores de superficie puede estar alterada por la activación inducida por la patología, recientemente se demostró que el perfil CD4⁺CD25⁺CD127⁻ se correlaciona estrechamente con el fenotipo CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, hecho que sería importante para la identificación más fácil de los Treg [106].

Los Treg por ser LTCD4⁺, expresan los receptores necesarios para la infección por VIH-1[107, 108], sin embargo se desconoce el efecto de la infección en el fenotipo y función celular. Recientemente se ha descrito que la infección por VIH-1 de Treg in vitro disminuye la expresión de la molécula FoxP3 al aumentar la metilación de los motivos CpG en el locus FoxP3, este hecho se acompaña de disminución de la producción de TGF- β , pérdida de la capacidad proliferativa y un incremento en la producción de IL-4[109], pero que además dependiendo del órgano evaluado se

pueden encontrar modificaciones epigenéticas en la expresión de este gen[110], por esto es necesario no solo demostrar la presencia de los Treg en VIH, sino también demostrar su función supresora.

A pesar de una gran cantidad de literatura disponible acerca de los Treg en VIH, no hay claridad respecto al papel de los Treg en la patogénesis de la enfermedad. Las discrepancias en los estudios son el resultado de (1) los diferentes marcadores para identificar los Treg, (2) los compartimentos evaluados, sangre versus tejidos, (3) diferentes estadios de VIH y (4) diferencias en los métodos de cuantificación (frecuencia vs número absoluto)[111]. Esta gran variabilidad en los aspectos fundamentales para caracterizar los Treg se traducen en las dificultades actuales para reconocer el papel patológico o protector de esta población celular en VIH. Considerando estas limitaciones, se ha establecido que los Treg sufren una disminución de su número absoluto durante la infección VIH/SIDA, pero dado que esta disminución es menor que el descenso del total de LTCD4, resulta en un incremento relativo de la frecuencia de los Treg en sangre periférica de los individuos infectados con VIH[112, 113]. El estudio de los Treg en la infección VIH/SIDA basado en la determinación de su frecuencia, se hace aún más complejo teniendo en cuenta que se han detectado subpoblaciones de nTreg en diferentes estadios de activación (naive, efectores y terminales)[114], y aparentemente son los nTreg efectores los más disminuidos en sangre periférica de personas VIH⁺[115]

Las evidencias a favor del efecto benéfico de los Treg son principalmente que su presencia en sangre se asocia con no progresión a SIDA y buen pronóstico clínico

de la enfermedad al inhibir respuestas específicas al VIH[116]. Además se ha encontrado una correlación estrecha entre la pérdida de Treg y sobreactivación inmunológica[117]. Otro hallazgo que soporta el papel benéfico de las Treg es el hecho de que los individuos VIH⁺ que no progresan a SIDA (long-term nonprogressors) tienen una mayor cantidad de Treg funcionales y una marcada reducción de la activación de linfocitos T, que los individuos progresores[118, 119]. Sin embargo otros estudios muestran hallazgos contradictorios, puesto que la inhibición de las respuestas específicas de LT a antígenos del VIH se traduce en un aumento de la replicación viral del VIH[100, 120] y también se ha reportado un aumento de la proporción de los Treg en enfermedad avanzada por VIH[121]. En contraste en la mucosa gastrointestinal se ha observado de forma consistente que tanto la frecuencia como el número absoluto de los Treg CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ se encuentran significativamente aumentados[122, 123]. Sin embargo, se cree que la mayoría de estos Treg a nivel de la mucosa GI en estos individuos podrían ser iTreg derivados a partir de LT convencionales sometidos al microambiente tolerogénico de TGF- β de la mucosa. Debido a las diferencias en la frecuencia de los Treg observadas en los tejidos donde ocurren los procesos patológicos, la evaluación del LCR, como el compartimento que refleja los procesos inmunopatológicos del SNC es indispensable. En conclusión los linfocitos T reguladores son importantes en el desarrollo de la patogénesis asociada al VIH pero su papel protector o patológico en la infección por VIH aún permanece controversial.

1.6 Los Treg en el Sistema Nervioso Central y Patógenos Oportunistas.

Respuestas inmunes efectivas y “antígeno-esterilizantes” son necesarias en el sistema nervioso central, para la eliminación completa de microorganismos patógenos del cerebro. La ausencia de una respuesta inmune efectiva a patógenos o respuestas “anérgicas”, caracterizadas por poca infiltración linfocitaria, predominio de citoquinas antiinflamatorias[35, 36] y bajos niveles de citoquinas propias de la respuesta inmune adaptativa (como IFN- γ)[33, 124] que favorecen la generación de un ambiente supresor se han relacionado con pobre pronóstico y aumento de la mortalidad en patologías como criptococosis y tuberculosis meníngea.

El aumento de los Treg en el sistema nervioso (por aumento de su migración de la periferia o expansión de iTreg) durante las infecciones oportunistas del sistema nervioso central podría favorecer la neuropatogénesis inducida por el virus (al favorecer la replicación del VIH) y adicionalmente podría facilitar el crecimiento de los patógenos en el SNC. Sin embargo también podría tener un efecto protector al limitar las respuestas inmunes exageradas, evitando la patología inducida por el sistema inmune. Los Treg pueden ser detectados en el LCR de otras enfermedades neurológicas autoinmunes o tumorales asociándose con neuropatogénesis[125-127]. Es así como durante las reagudizaciones en esclerosis múltiple hay alteraciones tanto cuantitativas como en la función inmunomoduladora de los Treg[128, 129], o su acumulación se asocia con peor pronóstico en tumores del SNC, como es el caso de los glioblastomas, las metástasis y otras lesiones tumorales de alto grado, debido a la supresión que

inducen sobre las respuestas inmunes efectoras antitumorales[127, 130, 131]. Teniendo esto en mente es plausible que la migración o expansión de Treg en el SNC inducida por las infecciones oportunistas pudiera estar relacionada con la patogénesis en NeuroSIDA.

Recientemente se ha encontrado que los microorganismos patógenos responsables de las infecciones oportunistas del SNC, son capaces de inducir la proliferación de Treg a nivel sistémico en modelos animales o *in Vitro*, indicando que patógenos como *Cryptococcus neoformans*[124], *Mycobacterium tuberculosis*[97] y *Toxoplasma gondii*[132] podrían inducir una desviación de la respuesta inmune hacia un perfil regulador, con capacidad supresora de las respuestas inmunes específicas de los LT. Es así como por ejemplo la infección por *M. tuberculosis* induce una desviación en la respuesta inmune en los granulomas y las formas diseminadas, caracterizada por una alta concentración de los Treg (FoxP3⁺) y una baja cantidad de LTCD8⁺ efectores, contribuyendo a la persistencia de la infección[133, 134]. Además en pacientes con tuberculosis pleural, los Treg se acumulan en el líquido pleural [96], relacionándose con su respuesta al tratamiento antituberculoso y el pronóstico de la enfermedad[135]. Sin embargo el papel de los Treg en el sistema nervioso central en individuos con una infección oportunista asociada a VIH/SIDA es desconocido.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar si los Linfocitos T Reguladores ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) son parte de la respuesta inmune inducida por las Infecciones Oportunistas (IO) del sistema nervioso central (SNC) asociadas a VIH/SIDA.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Determinar si los Linfocitos T Reguladores $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Treg) infiltran el líquido cefalorraquídeo (LCR) y se asocian con un microambiente inflamatorio específico a nivel neurológico en las Infecciones Oportunistas asociadas a SIDA.

2.2.2 Evaluar la frecuencia y características de la infiltración por Treg en el tejido cerebral en casos fatales de las infecciones oportunistas más comunes en neuroSIDA.

2.2.3 Determinar si la diversidad clonal $V\beta$ del receptor del linfocito T (repertorio $V\beta$ del TCR) en los Treg infiltrantes del LCR es indicador de su origen inmunológico inducido.

2.2.4 Evaluar la actividad supresora de los Treg, aislados del LCR en meningitis criptocócica, sobre la proliferación *in vitro* de los linfocitos T.

3. OBJETIVO ESPECIFICO 1

Determinar si los Linfocitos T Reguladores CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg) infiltran el líquido cefalorraquídeo (LCR) y se asocian con un microambiente inflamatorio específico a nivel neurológico en las Infecciones Oportunistas asociadas a SIDA.

3.1 Raciocinio y Justificación

La toxoplasmosis cerebral, criptococosis y tuberculosis meníngea son las formas más comunes de NeuroSIDA debido a infecciones oportunistas (IO) en el sistema nervioso central (SNC) en los países en vías de desarrollo y en Colombia[15, 136], sin embargo, su patogénesis no está completamente entendida. El desarrollo de IO del SNC se ha asociado principalmente con el grado de inmunosupresión sistémica, una respuesta inflamatoria exagerada y la persistencia del patógeno oportunista en el SNC[137]. Posiblemente la interacción de todos estos factores determina la magnitud de la neuroinflamación, las secuelas clínicas y el progreso de la enfermedad[138]. Es por esto que resulta necesario aclarar los procesos patogénicos inducidos por las IO en el SNC, con el objetivo de proponer nuevas estrategias terapéuticas que disminuyan el impacto de estas patologías.

La Toxoplasmosis cerebral (TC) en la infección por el VIH es causada principalmente por reactivación de la infección latente en el cerebro, en el contexto de inmunosupresión profunda, y es posible que cambios en la respuesta inmune local en el cerebro contribuyan también a la reactivación de las formas quísticas de *Toxoplasma gondii*[139, 140]; la persistencia del *Cryptococcus neoformans* en el cerebro y la mortalidad se ha relacionado con la falla de los mecanismos inmunes

efectores y una desviación de la respuesta hacia un perfil supresor caracterizado por la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10, TGF- β o IL-4[35, 124, 141]; en tuberculosis meníngea, a pesar de que los pacientes VIH⁺ pueden infectarse en cualquier fase de la enfermedad, el SNC se afecta solamente después de inmunosupresión sistémica y los niveles absolutos de LTCD4⁺ en sangre predicen el nivel infiltración meníngea[142, 143] así como también se sabe que la ausencia de proteinorraquia, marcador indirecto de una respuesta inflamatoria potente, es de mal pronóstico y se asocia con mortalidad[144].

Adicionalmente, el ambiente tolerogénico del cerebro (neuropéptidos anti-inflamatorios, niveles elevados de TGF- β e IDO), como sistema regulador de inflamación[39, 145], podría favorecer la persistencia de los patógenos oportunistas[146]. Las células de la neuroglia (microglía/macrófagos, astrocitos) también producen citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias y podrían modular las respuestas inmunes de linfocitos T a los patógenos. Sin embargo, no hay claridad acerca del balance inflamatorio vs supresor de las respuestas inmunes frente a las IO en el SNC. La evidencia sugiere que en patologías como meningitis criptococcica y meningitis tuberculosa una respuesta inmune efectora con predominio de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- β , IL-6)[33, 147, 148] favorece la eliminación de los patógenos, mientras que un microambiente supresor (IL-10) se asocia con peor pronóstico y mayor mortalidad. Recientemente se han realizado ensayos administrando IFN- γ subcutáneo, como terapia co-adyuvante al tratamiento antimicótico, con muy buena respuesta clínica[149]. Estos hallazgos ponen de manifiesto que conocer las características de la respuesta inmune en el

SNC es fundamental para elucidar los mecanismos responsables de enfermedad y poder contribuir a terapéuticas más eficaces.

En la última década los linfocitos T reguladores ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) han ganado un papel importante en la patogénesis de las complicaciones asociadas al VIH[100, 122]. Sin embargo, no hay certeza respecto a la función de estas células. Debido a su habilidad para inhibir a los Linfocitos T se postula que controlan la activación inmunológica que caracteriza la progresión de la enfermedad [102,116, 117]. Pero también se ha propuesto que podrían acelerar el progreso a SIDA debido a que su presencia se asocia con cargas virales elevadas[100, 120], e inhibición de las funciones anti-VIH específicas de los LTCD8⁺ *in vitro*. Además la acumulación de Treg en tejido (linfoide o mucosa gastrointestinal) se asocia con altos niveles de infección por VIH en estos tejidos[150]. Estos hallazgos sugieren que la regulación inmunológica mediada por los Treg tendría un papel patológico contribuyendo a una replicación descontrolada del virus.

La evidencia acumulada de los Treg en la infección VIH/SIDA resulta contradictoria y sugiere que estas células tienen un papel dual, tanto en protección como en patogénesis, que depende del momento de la infección, el órgano evaluado y las coinfecciones[105].

Existe muy escasa información respecto a los Treg en el contexto de las infecciones oportunistas asociadas a VIH/SIDA. Por ejemplo, se ha propuesto que la función reguladora de los Treg es deficiente en los casos de tuberculosis pulmonar que desarrollan el síndrome de reconstitución inmunológica, a pesar de la elevada frecuencia de estas células[151], sugiriendo que esta complicación

podría estar asociada con un defecto a nivel de la inmunoregulación. No se ha examinado el papel de los Treg en el sistema nervioso central durante las complicaciones neurológicas del SIDA, existiendo un solo reporte en la literatura de un modelo murino y de cultivos humanos primarios que postula un posible efecto neuroprotector de los Treg frente al efecto del VIH en el SNC[152]. Existe más evidencia de la participación de los Treg en procesos patogénicos a nivel del SNC en individuos VIH negativos, específicamente en tumores malignos, autoinmunidad[92, 128] o enfermedad vascular[153]. Por lo tanto, es posible especular que la expansión de Treg en el SNC pueda contribuir también a la neuropatogénesis mediada por las IO en SIDA. Los Treg inducidos por las IO podrían alterar las respuestas inmunes a los mismos patógenos oportunistas y/o al VIH favoreciendo persistencia/reactivación e inducción de neuropatología. Pero también podrían tener un papel protector limitando el desarrollo de los procesos patológicos que resultan de la infección persistente con el VIH en el SNC, la invasión con los patógenos oportunistas o el síndrome de reconstitución inmune, más frecuente después de criptococosis y tuberculosis meníngea.

Los estudios del líquido cefalorraquídeo (LCR) aportan la mejor oportunidad para examinar in vivo el microambiente cerebral. El análisis de un número limitado de componentes inflamatorios en el LCR de pacientes con diferentes afecciones neurológicas asociadas a VIH/SIDA, ha sugerido que estos mediadores inmunológicos pueden ser un marcador de neuropatología[148]. Por ejemplo, en criptococosis o tuberculosis meníngea, se encontró una elevación significativa de la metaloproteinasa de la matriz - 9 (MMP-9) comparado con otros agentes

oportunistas[28]. Por otra parte, las secuelas en tuberculosis meníngea se han asociado con niveles aumentados de $\text{TNF-}\beta$ en el LCR. Sin embargo las características del infiltrado de LT (subpoblaciones celulares efectoras y reguladoras) en el LCR en el contexto de las infecciones oportunistas del sistema nervioso central no han sido examinadas. Durante la infección con VIH un mayor tráfico de células mononucleares al SNC (pleocitosis) se traduce en mayor riesgo de inducir neuropatología mediada por la respuesta inmune, aumento de la replicación del VIH y toxicidad directa por el virus[154]. La composición del infiltrado inflamatorio del líquido cefalorraquídeo (LTCD4^+ , LTCD8^+ y la relación CD4/CD8) en los individuos VIH^+ con otras complicaciones neurológicas no oportunistas se correlaciona estrechamente con el fenotipo encontrado en sangre periférica[143] y está compuesto principalmente por macrófagos y linfocitos T activados[155]. Además del estudio del infiltrado celular, el análisis de marcadores inflamatorios (citoquinas o quimioquinas) y la evaluación de la replicación viral en el LCR pueden aportar información acerca de los mecanismos inmunopatogénicos en NeuroSIDA. El análisis de carga viral de VIH en el LCR ha mostrado títulos virales elevados en pacientes con infecciones oportunistas[24, 25], sugiriendo que la neuroinflamación mediada por IO favorecen la replicación del VIH en el SNC. En resumen, el estudio de los marcadores inflamatorios en el LCR, podría aportar información sobre las interacciones inmunológicas que ocurren en el SNC (estado de activación de la microglía/macrófago perivascular, LT infiltrantes) y su relación con el desarrollo de estas complicaciones tan frecuentes en SIDA.

La hipótesis de trabajo, es que la presencia Linfocitos T reguladores (Treg) en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con NeuroSIDA por infecciones oportunistas se correlaciona con el microorganismo infectante, y un ambiente de inmunosupresión (carga viral de VIH aumentada, perfil de citoquinas anti-inflamatorio).

3.2 Metodología

3.2.1 Diseño del Estudio

Se trató de un estudio descriptivo con seguimiento clínico a corto plazo (tres meses) que buscó determinar si los linfocitos T reguladores son parte de la respuesta inflamatoria de las Infecciones oportunistas del SNC asociadas a VIH/SIDA, con el propósito de aportar información útil en el entendimiento de la neuroinmunopatogénesis de estas complicaciones muy frecuentes en SIDA. El proyecto de investigación se diseñó en el contexto de otro proyecto que buscaba identificar marcadores de neuroinflamación asociados con progresión a SIDA y coinfección por Infecciones oportunistas del SNC (Colciencias #110634319282) con el aval de los comités de ética humana de las Instituciones participantes (Universidad del Valle y Hospital Universitario del Valle). La presente tesis doctoral fue co-financiada a través de una convocatoria interna de la Universidad del Valle 2007-2008 (CI #051580) y recursos propios del grupo VIREM y también cuenta con el aval del Comité de Ética Institucional de la Universidad del Valle.

3.2.2 Área del estudio:

La captación de voluntarios realizó en el servicio de Medicina Interna Urgencias del Hospital Universitario del Valle (HUV) en Cali, Valle del Cauca, institución de III nivel, centro de referencia del suroccidente Colombiano (Valle, Cauca y Nariño) entre Abril de 2007 y Abril de 2011, sin embargo la mayoría de pacientes fueron captados entre 2007 y 2008. La mayoría de los pacientes atendidos son de bajos ingresos, no asegurados o pertenecen al régimen subsidiado de seguridad social en salud.

3.2.3 Población de estudio y tamaño de muestra:

Para el cumplimiento del presente objetivo y los objetivos 3 y 4 la población del estudio fueron todos los pacientes infectados con VIH que consultaron al servicio de urgencias de Medicina Interna del HUV con signos o síntomas neurológicos en los que se sospechaban Infecciones Oportunistas del sistema nervioso central. El número total de pacientes VIH/SIDA reclutados en el estudio fue de 76, incluyendo 60 pacientes VIH⁺ con diagnóstico confirmado de las infecciones oportunistas del SNC (Toxoplasmosis cerebral=13, Criptococosis meníngea=26, Tuberculosis meníngea=6 y Otras IO=15) y 16 individuos VIH/SIDA con signos o síntomas neurológicos en los cuales se descartaron IO del SNC que se denominó el grupo control VIH/SIDA sin IO. El tamaño de la muestra se determinó por conveniencia teniendo en cuenta la casuística de pacientes en el último año (anterior al estudio) en el HUV y aspectos logísticos relativos a los costos de las pruebas de laboratorio y al carácter exploratorio y descriptivo del análisis.

Criterios de inclusión: Se incluyeron pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia Humana (VIH) con signos y/o síntomas neurológicos que aceptaron participar de forma voluntaria en el estudio, de los cuales se obtuvo su consentimiento informado o del representante legal, que fueron Hospitalizados en el HUV. Todos los pacientes se incluyeron previo al inicio de cualquier tratamiento antimicrobiano específico para los microorganismos oportunistas del SNC (pirimetamina, TMP/SX, clindamicina, anfotericina B, fluconazol, ganciclovir, anti-TBC, etc.) o tratamientos inmunomoduladores (esteroides). Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

1. Pacientes mayores de edad (18-60 años) de cualquier género.
2. Infección por VIH demostrada por dos pruebas ELISA, Western Blot y/o carga viral de VIH (mayor a 5000 copias/mL).
3. Signos y/o síntomas clínicos neurológicos (alteración del estado de conciencia, paresias, plejías, alteración de pares craneales, cefalea, etc).
4. No estar recibiendo tratamiento antimicrobiano específico para las patologías oportunistas del SNC.
5. No estar recibiendo esteroides (orales o intravenosos)
6. Consentimiento informado por escrito del paciente o tutor legal en caso de que este no se encontrara en pleno uso de sus facultades mentales.

Criterios exclusión: Mujeres gestantes y los voluntarios que decidieron retirarse del estudio.

3.2.4 Definición de Caso

Los diagnósticos se establecieron siguiendo los criterios del CDC[156] y de la Sociedad Americana de Neurología- AIDS Task Force [157], en base al cuadro clínico, los hallazgos paraclínicos (para lo cual todos los pacientes tuvieron la oportunidad de acceder a una batería básica de exámenes microbiológicos, inmunológicos y virológicos proveídos por el estudio), e imagenológicos (escanografía y/o resonancia magnética cerebral) de la Institucion hospitalaria. A continuación se presentan las definiciones operativas de las Infecciones Oportunistas más frecuentes del SNC.

Toxoplasmosis cerebral:

Caso con focalización neurológica u otros síntomas neurológicos compatibles, con lesión típica (realce en anillo) o sugestiva de toxoplasmosis cerebral en la escanografía (TAC) o resonancia magnética nuclear (RNM), que disminuye de tamaño luego de 7 a 14 días de tratamiento apropiado (Pirimetamina-Sulfadoxina o trimetoprim-sulfametoxazol con o sin Clindamicina). Todos los casos tenían serología IgG positiva para *Toxoplasma gondii* por técnica ELISA. Los verdaderos negativos fueron los pacientes con sintomatología neurológica compatible con masa cerebral que no tuvieron respuesta al tratamiento anti-Toxoplasma, (positivos o negativos para IgG específica) y a quienes se les confirmó otra etiología (ejemplo: linfoma primario, criptococosis, tuberculosis o citomegalovirus).

Criptococosis cerebral:

Pacientes con evidencia clínica y/o paraclínica de meningitis o lesiones focales del SNC compatibles con criptococomas en los cuales se demostro en el LCR la

presencia de *Cryptococcus neoformans* por pruebas de antígeno capsular, visualización directa del microorganismo por tinta china o confirmación definitiva por aislamiento en cultivo.

Tuberculosis cerebral:

Pacientes con síndromes neurológicos compatibles con meningitis, que a la evaluación del LCR tuvieron pleocitosis, cursaron con hipoglucorraquia y proteinorraquia, en los cuales se demostró la presencia de *Mycobacterium tuberculosis* en el LCR por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cultivo para micobacterias. Adicionalmente se consideraron casos de Tuberculosis meníngea los individuos con un cuadro clínico compatible y una respuesta favorable a la administración de tratamiento tetraconjugado antituberculoso (isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) aunque fueran negativos para las pruebas de detección del microorganismo en el LCR.

Neurosífilis:

Pacientes con evidencia clínica de meningitis de predominio linfocitario, con VDRL o FTAabs positivos (cualquier dilución) en el LCR o pacientes con VDRL o RPR mayor a 32 diluciones en sangre

Complicaciones neurológicas asociadas a CMV:

Casos con signos de focalización (encefalitis) o aracnoiditis (por neuroimagen) o poliradiculopatía con infección por CMV demostrada por la presencia de DNA viral por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el LCR

Meningitis linfocitaria (ML):

Diagnóstico de exclusión, caracterizado por meningitis de predominio linfocitario en ausencia de otra causa infecciosa evidente.

Grupo control VIH/SIDA sin infecciones oportunistas (Control):

Se clasificó en este grupo a los pacientes VIH⁺ con otras complicaciones no neurológicas asociadas a SIDA, y a los pacientes con sintomatología neurológica en los cuales se descartó la presencia de una infección oportunista en el SNC y el diagnóstico final fue demencia asociada a VIH, mielopatía o neuropatía asociada al VIH u otras complicaciones, no oportunistas, no infecciosas del SNC como trastornos vasculares isquémicos o hemorrágicos.

3.3 Metodología del Laboratorio

3.3.1 Fenotipificación de los linfocitos infiltrantes del LCR:

Se usó la técnica de Citometría de flujo (FACS), que permite el análisis multiparamétrico a nivel de una sola célula, para identificar las poblaciones de linfocitos T reguladores (Treg) del LCR y sangre periférica. El líquido cefalorraquídeo se obtuvo por punción lumbar y fue extraído por el personal médico tratante (a cargo de los pacientes), como parte de la evaluación rutinaria de los pacientes. Simultáneamente se obtuvo sangre periférica (por venopunción estándar). Las células del LCR y los mononucleares de sangre periférica (PBMC) fueron utilizados para análisis por Citometría.

Aislamiento de Mononucleares de sangre periférica (PBMC): El aislamiento de los PBMC se realizó a partir de 10mL de sangre completa anticoagulada con

EDTA por gradiente de densidad estándar de Ficoll-Hystopaque (Sigma, USA). El número total de PMBC que se usó en cada tinción (cada tubo) fue de 10^5 células. Se adquirieron al menos 30000 eventos por tubo. Los PBMC no utilizados se criopreservaron con el fin repetir las tinciones de sangre periférica en caso de que fueran necesarios.

Aislamiento de células derivadas del líquido cefalorraquídeo: Previo a la fenotipificación de las células infiltrantes del LCR, se realizó una cinética de la viabilidad de los LT en el LCR para establecer los tiempos óptimos de tinción posteriores a la punción lumbar y obtención del LCR. Este ensayo se realizó en muestras con abundante pleocitosis, las cuales se tiñeron para análisis por FACS con el marcador de viabilidad 7ADD y el marcador CD4 para los LTCD4⁺ cada 15 minutos en el transcurso de 2 horas después de la colección de las muestras.

Para el aislamiento de las células infiltrantes del LCR en todos los pacientes del estudio, inmediatamente después de la punción lumbar y antes de transcurrido una hora de la colección, se centrifugó entre 8 y 20 mL de LCR por 10 minutos a 1500 revoluciones por minuto (rpm) y a 4 grados Celsius; el sobrenadante se criopreservó a -80 C distribuido en alícuotas de 100 microlitros para la determinación de citoquinas y el botón celular se resuspendió y lavó dos veces en 10mL de buffer de tinción para remover el exceso de proteínas u otras sustancias provenientes del sobrenadante del LCR. El total de células se distribuyó homogéneamente en 4 tubos para las tinciones de Citometría (control sin teñir, CD3/CD4/CD25/control de isotipo, CD3/CD4/CD25/FoxP3 y CD3/CD4/CD8).

Tinción celular y Evaluación por Citometría de flujo de las subpoblaciones

celulares: El botón celular obtenido del LCR y los PBMC se tiñeron con anticuerpos específicos de marcadores linfocitarios para ser analizados por FACS. La determinación de las subpoblaciones de LT se realizó usando anticuerpos monoclonales específicos a los antígenos de superficie anti-CD3PerCP, anti-CD4FITC y anti-CD8PE (BD Biosciences, CA, USA), siguiendo el protocolo descrito en el Anexo I. La determinación de LT reguladores definidos por los marcadores $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, se realizó usando un estuche comercial (eBioscience, San Diego, CA, USA), tiñendo primero los antígenos en la superficie celular (CD3, CD4, CD25) y posteriormente identificando intracelularmente el factor de transcripción FoxP3. El procedimiento detallado está descrito en el Anexo I.

Adquisición y Análisis FACS: Las muestras fueron adquiridas en un Citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). Las señales de Forward (FSC) y Side Scatter (SSC) se usaron para seleccionar la región de los linfocitos. Se adquirieron al menos 3×10^4 eventos por cada muestra evaluada. Los parámetros y puntos de corte se modificaron de acuerdo a la muestra sin teñir. Se analizó la población de $LTCD4^+$ en la región de linfocitos $CD3^+$, expresando las moléculas CD25 y FoxP3 (Treg). Los linfocitos T reguladores, Treg o células $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$, se expresaron como un porcentaje de los $LTCD4^+$ totales en LCR o PBMC.

La tinción y análisis por FACS de todas las muestras fue realizado *ex vivo* ante la posibilidad que la criopreservación pudiera alterar la expresión de los marcadores de superficie o intracelulares en los Treg, tal como fue demostrado para la

expresión de CD25 y FoxP3 en pacientes VIH⁺ en un estudio publicado posterior a la realización de este objetivo[158].

3.3.2 Cuantificación de Citoquinas/Quimioquinas por la tecnología de análisis multiple o xMAP (Luminex[®]):

Se evaluó un panel de 25 citoquinas/quimioquinas en muestras pareadas de LCR/suero utilizando 2 ensayos de inmunocitometría múltiplex o xMAP (Beadlyte[®] Human 22-plex, Millipore[®] y MAP Fluorokine TGF- β de R&D[®]) que fueron analizados en un equipo Luminex 200TM IS Total System. El protocolo de detección de las citoquinas en el LCR mediante xMAP había sido validado anteriormente en otros modelos de enfermedad neurológica, por el grupo de Neuroinmunopatología de la Universidad Johns Hopkins (JHU) y los procedimientos para obtención de estos datos fueron realizados con su entrenamiento y acompañamiento. En resumen, se utilizó una dilución 1:10 del LCR o suero y las concentraciones de los reactivos recomendado por los fabricantes de los estuches. Los valores de citoquinas se expresaron en pg/mL. Se utilizó el software Luminex Manager (Bioplex Manager 5.0, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Para el análisis de los datos obtenidos se evaluó la correlación entre los niveles de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β) o pro-inflamatorio (quimioquinas, IFN- γ , IL-6, IL-1, TNF- α , etc) en el LCR y la frecuencia de Treg en los casos de IO.

3.3.3 Determinación de la Carga Viral (CV) del VIH-1 en el LCR:

Como marcador de replicación viral en el SNC se cuantificó la carga viral del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) en el LCR y en muestras pareadas de plasma utilizando la técnica estándar COBAS® Ampliprep/COBAS TaqMan HIV-1 assay (Roche Diagnostics), usada en la rutina clínica para diagnóstico y monitoreo en pacientes VIH⁺, con un límite inferior de detección de 50 copias por mL. Estos ensayos se contrataron por encargo al centro de diagnóstico de CIDEIM, y la empresa Roche concedió al proyecto un descuento especial en los estuches.

3.3.4 Análisis de los resultados:

Se realizó un análisis descriptivo de la frecuencia de Treg en LCR y sangre periférica. Para la evaluación de las diferencias de los valores de Treg entre compartimentos (LCR y sangre) y entre IO, se utilizaron pruebas no paramétricas (Wilcoxon Rank Test). Los análisis de correlación entre la frecuencia de los Treg y carga viral de VIH o concentración de citoquinas se realizó por el análisis de correlación de Spearman, puesto que se asumió que los datos no seguían una distribución normal (tras la aplicación de pruebas de bondad de ajuste). Todos los test se evaluarán por 2 colas y se consideraron significantes cuando el valor de P fue ≤ 0.05 .

3.4. Resultados

Se incluyeron un total de 76 pacientes VIH positivos que consultaron a un centro hospitalario de tercer nivel de la ciudad de Cali por presentar síntomas

neurológicos en los cuales se debía descartar neuroinfección, los cuales fueron diagnosticados con infección oportunista del sistema nervioso central (N=60) o se les descartó neuroinfección oportunista (N=16). En la **Tabla 1** se resumen de manera global las características sociodemográficas y clínicas de los pacientes participantes del estudio.

La media de edad fue $35,6 \pm 9,5$ años, el género fue predominantemente masculino (67 casos) representando una razón masculino/femenino 7,5 a 1, lo cual es diferente a la tendencia actual en Colombia que se aproxima a 2 hombres por cada mujer. En este estudio, la frecuencia de IO del SNC fué predominantemente una patología masculina, este hallazgo es acorde a lo encontrado en otros estudios de pacientes con IO del SNC en Colombia[15]. Los casos VIH positivos diagnosticados de Novo se definieron como los diagnosticos de infección por VIH⁺ hechos en el contexto de su enfermedad aguda neurológica y representaron un 39.5%; el resto previamente conocían el diagnostico de infección por VIH, pero la mayoría de ellos no estaban recibiendo (ni habían recibido) tratamiento antirretroviral (ARV). El cubrimiento de la terapia ARV fue menor del 7%, influenciado en parte por el gran numero de diagnosticos de novo. Acorde con su diagnóstico de enfermedad avanzada, el conteo absoluto de linfocitos LTCD4⁺ en sangre fue muy bajo (media =76 células/ μ L) y la carga viral del VIH-1 en plasma fue alta (media= 5,16log/mL) indicando una inmunosupresión severa.

Tabla 1. Características Socio-demográficas y Clínicas de los Pacientes VIH/SIDA

N=76	
Edad	35,6±9,5
Masculino (%)	67 (88,2%)
Tasa de Mortalidad (3 meses de seguimiento)	34 (44,7%)
Karnofsky ≤ 70	22 (28,9%)
VIH de novo	30 (39,5%)
TARV	5 (6,6%)

Las IO más frecuentes fueron Toxoplasmosis cerebral (TC), Criptococosis Meníngea (CM) y Tuberculosis Meníngea (TBM). La mortalidad en un seguimiento a tres meses fue muy alta en el grupo de las infecciones oportunistas, principalmente los casos de meningitis (**Figura 1**), sin embargo la mayoría de estas muertes ocurrieron durante la estancia hospitalaria.

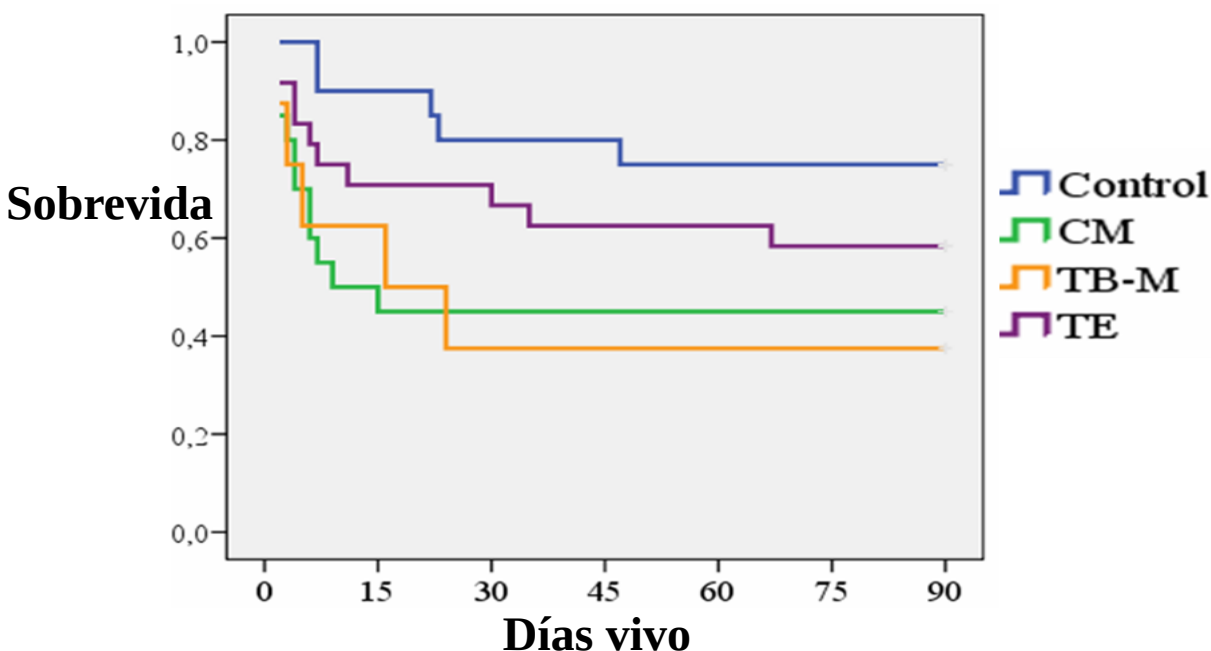


Figura1. Mortalidad a Tres meses: Análisis de Kaplan-Meier, Criptococosis Meníngea (CM), Tuberculosis Meníngea (TB-M) y Toxoplasmosis cerebral (TE)

Los marcadores inmunovirológicos que caracterizan el progreso a SIDA se describen por grupos de diagnóstico en la **Tabla 2**. No se encontraron diferencias significativas entre las neuroinfecciones oportunistas o grupo control respecto al nivel de inmunosupresión evaluado con los marcadores de la rutina clínica, aunque los tres pacientes con complicaciones neurológicas asociadas a citomegalovirus tuvieron los más bajos recuentos de LT CD4⁺.

El análisis de las células infiltrantes del LCR por citometría de flujo (FACS), usando los marcadores CD4 y 7ADD, permitió determinar que 30 a 60 minutos después de la punción lumbar era el rango de tiempo óptimo para realizar las tinciones para el análisis de las células del LCR por citometría de flujo, preservando su viabilidad **Figura 2**.

Tabla 2. Marcadores Inmuno-virológicos de la infección VIH/SIDA en la Sangre y el líquido cefalorraquídeo según el diagnóstico.

	N	LT CD4/ μ L en sangre	Linfocitos/ μ L en LCR	CV VIH-1 LCR (Log)	CV VIH-1 Plasma (Log)
		Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD	Media $\pm$ SD
Toxoplasmosis Cerebral	13	63,7 $\pm$ 40,9	2,68 $\pm$ 4,36	4,37 $\pm$ 1,02	5,29 $\pm$ 0,49
Criptococosis Meníngea	26	64,6 $\pm$ 25,1	55,10 $\pm$ 60,08	5,31 $\pm$ 1,20	5,48 $\pm$ 0,66
Meningitis Tuberculosa	6	113,2 $\pm$ 102,7	77,28 $\pm$ 98,52	6,10 $\pm$ 0,66	5,27 $\pm$ 0,73
Meningitis Linfocitaria	5	172,6 $\pm$ 139	82,33 $\pm$ 80,86	5,34 $\pm$ 0,83	5,47 $\pm$ 0,66
Neurosífilis	4	74,7 $\pm$ 34,7	36,60 $\pm$ 29,07	3,67 $\pm$ 0,15	5,17 $\pm$ 0,68
Complicaciones por CMV [¶]	3	57,7 $\pm$ 27,3	8,33 $\pm$ 6,65	4,91 $\pm$ 2,07	4,74 $\pm$ 0,69
Tumores ^{¶¶}	3	129,3 $\pm$ 80,3	7,20 $\pm$ 7,88	4,80 $\pm$ 2,82	3,23 $\pm$ 1,60
Control (VIH/SIDA Sin IO)	16	53,1 $\pm$ 30,7	0,77 $\pm$ 0,83	3,40 $\pm$ 0,93**	5,04 $\pm$ 0,73

CV: carga viral VIH-1

[¶] Encefalitis por CMV (2) y Aracnoiditis por CMV (1)

^{¶¶} Casos no confirmados Linfoma Primario SNC (2) y Leucoencefalopatía multifocal progresiva (1)

**Wilcoxon rank test comparación LCR vs sangre p< 0.0

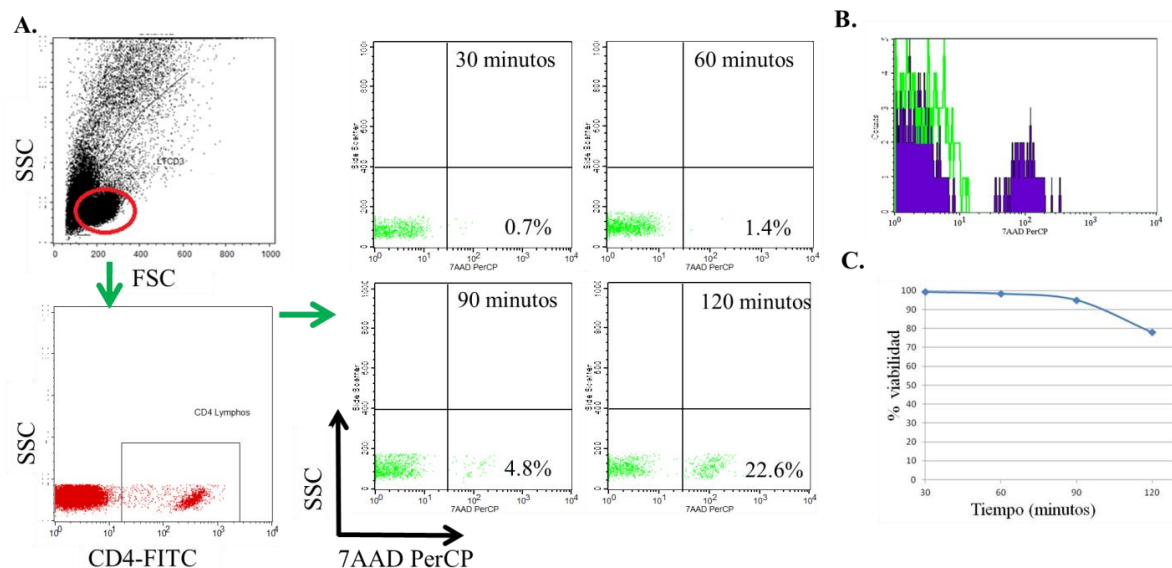


Figura 2: Cinética de viabilidad ex vivo de los LTCD4⁺ del LCR. Esquema de análisis por citometría de la viabilidad de los LTCD4⁺ del LCR determinada por incorporación de 7AAD 30, 60, 90 y 120 minutos posterior a la realización de la PL en (A). Histograma inclusión de 7AAD minuto 30 (línea verde) y minuto 120 (morado) en (B) y cinética de decaimiento de la viabilidad (eje y) en función del tiempo (eje x).

Mediante FACS se estimó la frecuencia relativa de las subpoblaciones de linfocitos infiltrantes y se compararon entre las patologías oportunistas y entre los compartimentos de LCR vs sangre (Tabla 3). La mayoría de los linfocitos T en el LCR eran LTCD8⁺, posiblemente debido a la deficiencia marcada de LT CD4⁺ en órganos linfoides y sangre periférica, característico de la fase de SIDA. Consecuentemente con lo anterior, la relación CD4/CD8 de los linfocitos del LCR estuvo también invertida en el LCR al igual que en la sangre. Los casos de meningitis (TBM, CM and LM) se presentaron con pleocitosis y tuvieron valores muy similares en la razón CD4/CD8 entre LCR y sangre. Por el contrario, los individuos del grupo control sin IO y los casos de Toxoplasmosis cerebral, con escasa pleocitosis tuvieron una aumento significativo en la razón CD4/CD8 del LCR comparado con su contraparte en sangre, sugiriendo una mayor migración de Linfocitos T CD4⁺ al SNC (Tabla 3), más que proliferación teniendo en cuenta que no cursan con pleocitosis.

Las infecciones oportunistas inducen la acumulación de los Treg en el sistema nervioso central.

La estrategia de fenotipificación y análisis por FACS de los LT CD4⁺ utilizando los marcadores CD25, FoxP3 se resume en la **Figura 3A**, esta estrategia permitió detectar Treg en sangre periférica y en el LCR de todos los subgrupos diagnósticos incluidos en el estudio. Los Treg caracterizados como LT CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ se expresaron como el porcentaje del total de los LTCD4⁺ presentes en cada uno de los dos compartimentos.

Tabla 3. Subpoblaciones de linfocitos T (Treg, LT activados y relación CD4/CD8) en el Líquido Cefalorraquídeo y Sangre de pacientes VIH/SIDA con Infecciones Oportunistas del SNC

	Líquido Cefalorraquídeo				Sangre Periférica		
	N	% Tregs	% LT activados	CD4/CD8 Ratio	%Tregs	% LT activados	CD4/CD8 Ratio
		Media±SD	Media±SD	Media±SD	Media±SD	Media±SD	Media±SD
Toxoplasmosis Cerebral	13	16,9±6,5**	8,3±6,2**	0,33±0,39**	4,6±3,0	2,7±2,1	0,12±0,08
Criptococosis Meníngea	26	19,6±9,7**	9,8±8,1**	0,23±0,18	6,0±4,4	5,0±4,7	0,25±0,15
Meningitis Tuberculosa	6	14,7±9,2	7,6±5,1	0,37±0,38	8,1±5,6	6,9±5,4	0,43±0,29
Meningitis Linfocitaria	5	13,9±11,5	8,1±4,9	0,21±0,20	4,2±4,7	4,7±2,2	0,27±0,16
Neurosífilis	4	6,8±4,9	12,8±11,7	0,32±0,25	3,8±2,5	4,5±4,8	0,25±0,15
Complicaciones por CMV [¶]	3	13,2±4,0**	7,4±5,2	0,06±0,07	5,6±3,3	5,3±6,1	0,09±0,05
Tumores ^{¶¶}	3	4,4±2,1	9,2±6,0	0,35±0,30	3,1±2,7	6,7±4,5	0,36±0,25
Control (VIH/SIDA Sin IO)	16	6,6±5,7	6,9±4,6	0,37±0,27**	5,8±4,4	4,7±4,1	0,22±0,19

Treg= Linfocitos T Reguladores (CD3⁺ CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺) expresado como un porcentaje del total de LT CD4⁺

LT activados= Células CD3⁺ CD25⁺ expresado como el % del total de LT CD3⁺

[¶] Encefalitis por CMV (2) y Aracnoiditis por CMV (1)

^{¶¶} Casos no confirmados Linfoma Primario SNC (2) y Leucoencefalopatía multifocal progresiva (1)

**Wilcoxon rank test comparación LCR vs sangre p< 0.05

Todas las infecciones oportunistas del sistema nervioso central, mostraron una alta frecuencia de Treg en el LCR con respecto a la sangre periférica (**Tabla 3**) y esta diferencia fue estadísticamente significativa en Criptococosis meníngea (LCR 19,6% Vs Sangre 6,0%) y Toxoplasmosis cerebral (LCR 16,9% Vs Sangre 4,6%) con valores de p de 0.0001 en ambos casos. La comparación de los valores promedio de la frecuencia de Treg estimada en LCR y sangre periférica entre los grupos del estudio se presenta en la **Figura 3B** y la **Tabla 3**. De manera interesante, en un tercio de los casos de criptococosis un porcentaje importante de los LTCD4⁺ infiltrantes (30% o mas) eran Treg y correspondían a casos con las mas bajas pleocitosis (menor a 50 linfocitos/) del grupo Anexo II, sugiriendo un desbalance en la relacion de las poblaciones de células reguladoras Vs las efectoras en esta infección.

Los Treg del LCR expresaron significativamente mayores niveles de la proteína FoxP3 que los Treg de sangre periférica, demostrada por un mayor valor de intensidad media de fluorescencia (MFI) para esta molécula, específicamente en los pacientes con TC y CM. **Tabla 4**. Las demás infecciones oportunistas mostraron la misma tendencia pero el número de casos por subgrupo de IO fué bajo y no permitió realizar una comparación estadística.

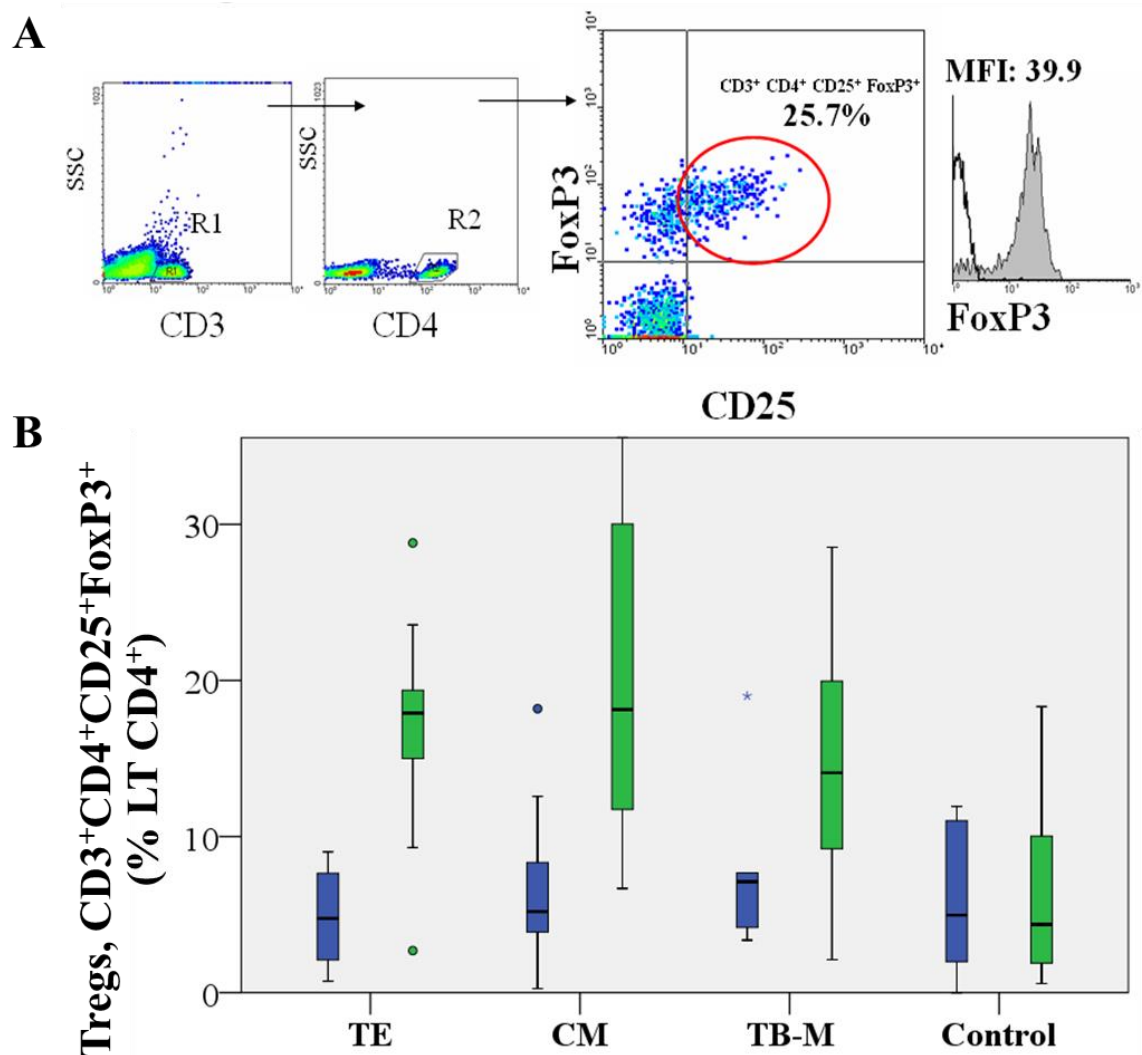


Figura 3. Acumulación de Linfocitos T Reguladores (Treg) en el LCR en infecciones oportunistas (IO) del SNC. Estrategia de análisis por Citometría de flujo (FACS) de los Treg en LCR (diagrama dot plots) de un caso de Criptococcosis meníngea en **A**. Comparación de los porcentajes de Treg en sangre (azul) y LCR (verde) entre los casos con las IO más frecuentes (N=45) y sin IO del SNC o grupo Control (N= 16) en **B**.

CM= Criptococcosis meníngea **TE=**Toxoplasmosis cerebral **TBM=** Tuberculosis Meníngea.

MFI= Intensidad media de fluorescencia

Wilcoxon rank test IO vs control en LCR: CM p=0.0004; TE p=0.033; TBM p=0.039.

Wilcoxon rank test CSF vs blood: CM p= 0.0001; TE p=0.0002; TBM p= 0.14

En el grupo control (sin IO del SNC), conformado también por casos de SIDA pero sin complicación neurológica o con compromiso neurológico no debido a IO, los

porcentajes de Treg y expresion de FoxP3 fueron igualmente bajos tanto en LCR como sangre, indicando que en ausencia de IO neurológicas no hay acumulación preferencial de Treg en el LCR **Figura 3B** y **Tabla 4**. Los Treg del LCR en el grupo control fueron significativamente menores que en los casos con IO, pero en sangre estos valores fueron muy similares en todos los 76 pacientes del estudio independientemente de si tenían enfermedad neurológica.

Tabla 4. Nivel de Expresión (MFI) de la Proteína FoxP3 en los Linfocitos T Reguladores (Treg) del LCR y sangre.

<i>DIAGNOSTICO</i>	<i>LCR*</i>	<i>SANGRE*</i>	<i>P**</i>
<i>Control VIH/SIDA sin IO-SCN</i>	41.1 ± 3.50	31.1 ± 7.98	0.125
<i>Toxoplasmosis cerebral</i>	64.2 ± 30.67	40.3 ± 23.79	<u>0.018</u>
<i>Criptococosis Menígea</i>	85.9 ± 40.78	41.8 ± 19.52	<u>0.001</u>
<i>Meningitis Tuberculosa</i>	66.0 ± 60.91	40.1 ± 17.51	0.116

*Valor promedio de las intensidad media de Fluorescencia (MFI) ± SD

** Análisis de Wilcoxon rank test LCR vs Sangre

La acumulación de los Treg en el LCR se correlaciona una carga viral de VIH-1 elevada en el LCR y un perfil inflamatorio en el mismo.

Debido a que la presencia o cantidad de células Treg puede contribuir a la patología en el SNC, vía una actividad inmunosupresora sobre los linfocitos T efectores específicos al VIH o los microorganismos oportunistas, se exploró la posibilidad de que la presencia o cantidad de los Treg se correlacionara con una mayor replicación viral del VIH en el SNC o con un ambiente de inmunosupresión. Se cuantificó la carga viral del VIH en el LCR (como un marcador subrogado de la replicación viral en el SNC) y se midieron los niveles de varias citoquinas

incluyendo las típicamente relacionadas con un perfil anti-inflamatorio (IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2, IL-13, IL-4, IL-5), algunas de estas últimas (IL-10 y los TGF- β) directamente relacionadas con la función supresora de los Treg.

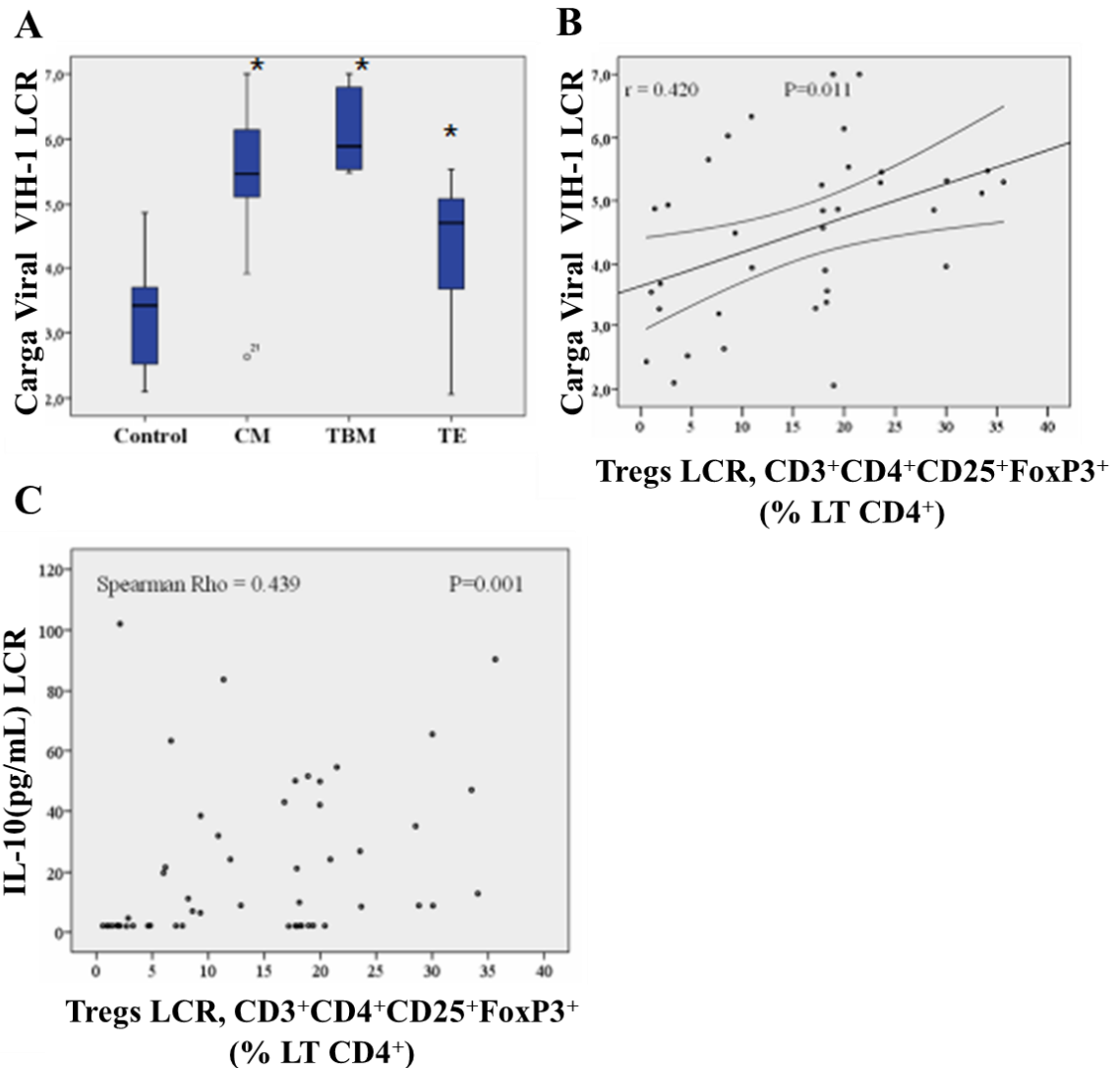


Figura 4. Los Treg se correlacionan con la carga viral del VIH y los niveles de IL-10 en el LCR. Promedio de los valores (expresado en log10) de Carga Viral VIH-1 en el LCR **(A)**, Análisis de correlación de Pearson's entre los % de Treg y los valores de carga viral VIH **(B)** y la relación entre los Treg y los niveles de IL-10 **(C)** en el LCR .

CSF= Cerebrospinal fluid o LCR. **CM**= Criptococcosis meníngea **TE**=Toxoplasmosis cerebral **TBM**= Tuberculosis Meníngea. * Wilcoxon rank test Infecciones oportunistas vs Control $p < 0.05$

Los valores promedio de la carga viral en el LCR fueron significativamente más altos en el grupo con IO comparado con los controles (5.0 log vs. 2.9 log; $P=0.002$). Por el contrario, no se encontró diferencias en los valores de carga viral plasmática entre los casos del estudio. Además, la carga viral de VIH en el LCR diferenció a los casos de meningitis de las Toxoplasmosis. (**Figura 4A y Tabla 2**). Específicamente las meningitis (criptococosis y tuberculosa) presentaron significativamente más copias de RNA viral en el LCR que los casos de TC (5.6 log vs. 4.4 log; $P=0.013$). Adicionalmente, la mayoría de los casos de meningitis tuvieron valores de carga viral VIH en el LCR dramáticamente más elevados (uno o dos log 10) que en sus correspondientes muestras pareadas de plasma.

Los títulos del VIH en el LCR se correlacionaron positivamente con los porcentajes de Treg (correlación de Pearson $r=0.439$ $P=0.011$), sugiriendo que los Treg podrían contribuir a un ambiente inmunosupresor que altera el control viral en el cerebro (**Figura 4B**). Para realizar una aproximación preliminar a esta hipótesis, se cuantificaron los niveles de varias citoquinas y quimioquinas en el LCR.

Se determinó una correlación positiva de los niveles Treg con los niveles de varias citocinas/quimioquinas evaluadas en el LCR, **Tabla 5**. Por ejemplo, los Treg en LCR se asociaron con los niveles de IL-10 (Spearman's $Rho=0.4$ $P=0.0009$), una citoquina anti-inflamatoria relacionada con la actividad supresora que sobre la función efectora de los linfocitos T tienen algunos linfocitos T reguladores (**Figura 4C y Tabla 5**). Sin embargo, no se encontró ninguna correlación con los niveles de el TGF- β (TGF- β 1 o TGF- β 2), otra citoquina relacionada con el privilegio inmunológico del SNC o la inducción de Treg y su mecanismo de supresión

inmunológica en otros tejidos como el del tracto GI. Tampoco la frecuencia de los Treg se asoció con los niveles de otras citoquinas clásicamente asociadas con desviación de la inmunidad celular hacia una producción preferencial de anticuerpos (IL-4, IL-5, IL-13) **Tabla 5**. Paradójicamente, los niveles de citoquinas pro-inflamatorias (IL-6, IFN- γ , IL-12) o citoquinas que promueven supervivencia de linfocitos (IL-7), y de varios factores quimioatrayentes de células inflamatorias (IL-8, IP-10, MIP-1a, RANTES y EOTAXIN) se correlacionaron positivamente con los niveles de Treg.

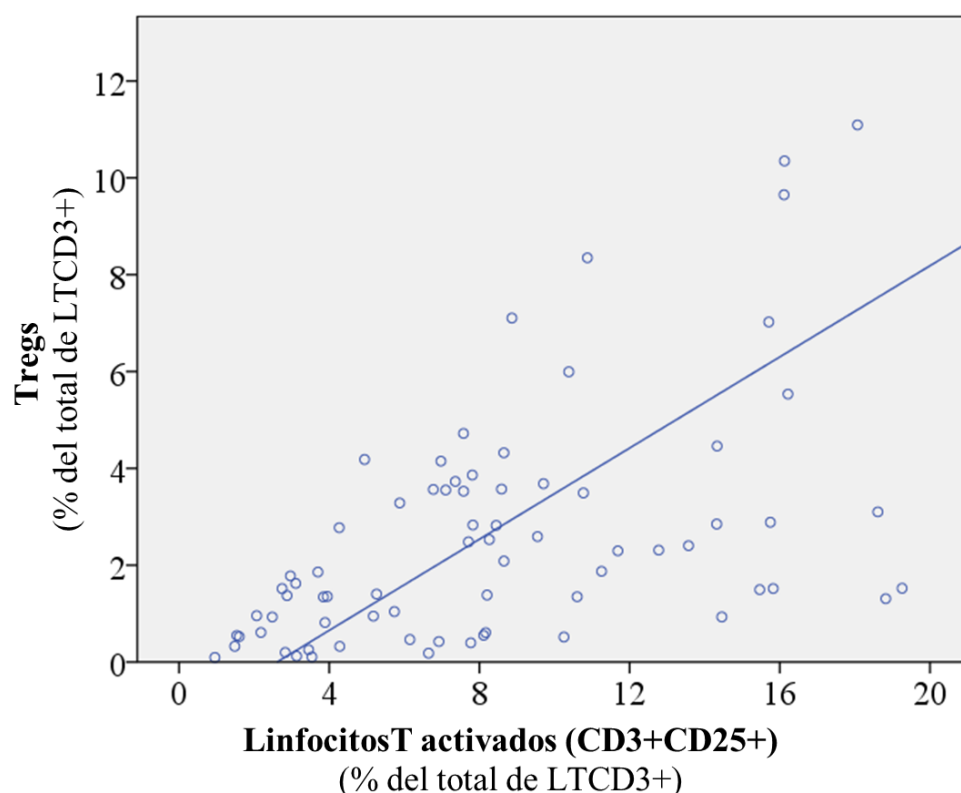


Figura 5. La acumulación de Linfocitos T Reguladores (Treg) en el LCR se correlaciona con los niveles de linfocitos T activados infiltrantes. Análisis de correlación de Pearson de los porcentajes de Linfocitos T reguladores (Treg) con los porcentajes de Linfocitos T totales activados en el LCR. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral)

Estos hallazgos sugieren que la presencia de los Treg en el SNC está asociada con un microambiente de abundante inflamación. Consistente con esta hipótesis, los niveles de Treg también se correlacionaron positivamente con los niveles de infiltración linfocitaria (pleocitosis) y de linfocitos T activados ($CD3^+CD25^+$) que se acumularon en el LCR en los casos de NeuroSIDA por infecciones oportunistas.

Figura 5. La severidad clínica evaluada por Glasgow o Karnofsky al ingreso hospitalario, o por la mortalidad a tres meses de seguimiento no se asoció con los niveles de los Treg, en el LCR. Tabla 5.

Tabla 5. Correlación entre Marcadores Inmuno-Virológicos, Citoquinas y el Porcentaje de Treg en el LCR.

	% Tregs en el LCR	
	R	Valor de P*
SEVERIDAD CLINICA (Ingreso)		
Valor Karnofsky (%)	0.093	0.543
Valor Glasgow	-0.365	0.167
MARCADORES EN SANGRE		
LT CD4/ml sangre	-0.179	0.175
LTCD8/ml sangre	-0.145	0.272
Carga viral VIH-1 en sangre	-0.010	0.944
MARCADORES EN EL LCR		
Pleiocitosis (linfocitos/ml)	0.331	0.032
Carga viral VIH-1 (copias/ml)	0.420	0.011**
CITOQUINAS (µg/ml)		
GM-CSF	-0.080	0.563
TGF-β1	0.290	0.214
TGF-β2	0.156	0.512
IFN-γ	0.379	0.005
IL-10	0.439	0.001
IL-12(p40)	0.361	0.007
IL-12(P70)	0.177	0.199
IL-13	-0.252	0.066
IL-15	0.101	0.467
IL1A	-0.209	0.130
IL-1B	0.202	0.143
IL-2	0.264	0.054
IL-3	0.243	0.076
IL-4	0.125	0.368
IL-5	0.105	0.449
IL-6	0.388	0.004
IL-7	0.381	0.004
TNF-A	0.074	0.593
QUIMIOQUINAS (µg/ml)		
IL-8	0.367	0.006
IP-10	0.462	0.004
MCP-1	0.063	0.652
MIP-1A	0.463	0.004
RANTES	0.316	0.020
EOTAXIN	0.363	0.007

*Valor de P correlacion de Spearman's rank para el % de Tregs en el LCR

**Valor de P Correlacion de Pearson para el % Tregs y la carga viral en LCR

3.5. Discusión

Los resultados demuestran que los Treg con un fenotipo CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, se acumulan específicamente en el SNC de los individuos con neuroSIDA por Infecciones oportunistas. La composición del infiltrado linfocitario en el LCR de los

casos de neuroSIDA por IO se caracterizó por mayores proporciones de Treg, que su contraparte en sangre y estos Treg acumulados en el sistema nervioso expresaron diferencialmente un mayor potencial inmunomodulador (altos niveles de FoxP3).

La presencia de los Treg en el sistema nervioso se correlacionó con la abundante inflamación generada por los microorganismos oportunistas (carga viral VIH, pleocitosis, linfocitos T activados y citocinas pro-inflamatorias), lo cual podría interpretarse como un mecanismo de neuroprotección o por el contrario estar relacionado con mayor neuropatogénesis y el pobre pronóstico de estas complicaciones del SIDA. Estos resultados son novedoso porque confirman la viabilidad de detección de los Treg en el LCR, no existía evidencia previa de su presencia en el sistema nervioso de individuos infectados por VIH (Pubmed, Scielo, ISI web of knowledge) y además sugieren la participación de esta subpoblación de linfocitos en la neuropatogénesis mediada por la coinfección del VIH con las infecciones oportunistas.

Este análisis fenotípico demostró que los linfocitos T infiltrantes del LCR en pacientes VIH/SIDA con IO del SNC son predominantemente LTCD8⁺, lo cual es consistente con su predominio sobre los LT CD4⁺ en la fase SIDA pero también con el papel relevante de los LTCD8⁺ contra los patógenos oportunistas intracelulares, tales como *Toxoplasma gondii* [159] o *Micobacterium tuberculosis* [160] o el CMV ([161]y **Tabla 3**) o su papel protector en las criptococosis[162]. La infección por el VIH frecuentemente se acompaña de pleocitosis, que aparece desde momentos muy tempranos de la infección y que en la mayoría de las

ocasiones resuelve con la administración de TARGA[163]. A pesar de que este hecho fue reconocido tempranamente, desde el principio de la epidemia[164], las características de la pleocitosis no han sido claramente definidas y son muy escasos los estudios que analizan las características de los linfocitos infiltrantes del LCR[142]. Recientemente se publicó la caracterización por citometría de flujo de las células infiltrantes del LCR en pacientes VIH⁺ (sin infecciones oportunistas), evidenciando un predominio de LTCD8⁺ y una marcada inversión de la relación CD4/CD8[165] tal como lo muestran los resultados de este estudio.

A pesar de que los LTCD8⁺ fueron las células predominantes en el LCR de pacientes con IO, la magnitud de acumulación de los LTCD4⁺ (medido por la diferencia entre las razones CD4/CD8 entre sangre y LCR) fué diferente entre las patologías. La magnitud de acumulación de los LTCD4⁺ en el SNC estuvo de acuerdo a la magnitud de la pleocitosis y/o compromiso meníngeo. Así, los casos de toxoplasmosis cerebral y casos control (sin afectaciones oportunistas del SNC), con escasa infiltración linfocitaria en el LCR, exhiben una acumulación mayor en el SNC de LTCD4⁺, comparada con su proporción en sangre, muy similar a lo que ocurre en los pacientes VIH⁺, sin IO y sin TARGA [165]. Por el contrario los casos de meningitis (meningitis linfocítica, criptocócica y tuberculosa) conservan la misma razón CD4/CD8 en el LCR y la sangre periférica. El LCR refleja mejor los eventos a nivel del plexo coroideo y las meninges, mientras que la toxoplasmosis cerebral es una patología predominantemente intraparenquimatosa, la diferente localización del proceso patogénico es posiblemente la responsable de este hallazgo.

Los Treg ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$), se acumularon específicamente en el SNC de personas con NeuroSIDA por infecciones oportunistas. La presencia de los Treg en el SNC puede contribuir a la neuropatogenesis, al incrementar la replicación del VIH y/o favorecer la persistencia del patógeno o por el contrario ser parte de la respuesta protectora que busca controlar la patología. La infiltración de Treg en el LCR fue más alta en las infecciones oportunistas con pleocitosis (TBM y CM). Sin embargo en los casos de toxoplasmosis cerebral sin pleocitosis, los Treg del LCR aunque son menos abundantes que en las meningitis, exhiben altos niveles en la expresión de FoxP3, indicativo de su potencial inmunomodulador. FoxP3 es crucial para la modulación de la función de los Treg, y un incremento en la expresión de FoxP3 en la encefalitis por *Toxoplasma gondii* podría explicar la relativa disminución en la respuesta inflamatoria en esta enfermedad. Probablemente el papel de los Treg en la neuropatogenesis está relacionado con el patógeno oportunista involucrado. Por ejemplo en la meningitis por *Cryptococcus neoformans* o *Mycobacterium tuberculosis* la infiltración de los Treg puede ser protectora regulando la inflamación exagerada y el daño al tejido cerebral, suprimiendo la activación de los linfocitos T.

En la Toxoplasmosis cerebral la acumulación preferencial de los Treg en el cerebro, puede favorecer la protección del daño cerebral mediado por la respuesta inflamatoria, evitando el edema cerebral. El LCR de pacientes con Toxoplasmosis mostro una baja infiltración linfocitaria, acorde con lo tradicionalmente reportado en la literatura[166], sin embargo las frecuencias de los Treg son significativamente mayores que en sangre periférica, indicando una migración

preferencial de estos Treg al SNC de los pacientes con Toxoplasmosis cerebral. No existe evidencia del papel de los Treg en la patogénesis de la infección por *Toxoplasma gondii* en humanos, en la literatura sólo se encuentran algunos estudios en modelos murinos. En ratones C57BL/6 en un modelo de infección por vía oral, la letalidad se asocia con el colapso de los Treg FoxP3⁺[167] y en ratones BALB/c normalmente resistentes a la infección, el bloqueo de estas células con un anticuerpo anti CD25 (sin efecto sobre los LT activados), induce una mortalidad del 50-60%[168]. El efecto de los Treg en toxoplasmosis parece estar mediado por un mecanismo relacionado con IL-2, (independiente de IL-10)[169], que resulta en la competencia por la IL-2 entre los Treg y LT efectores, lo cual conduce a la muerte de las células T proliferantes (in vitro)[170]. Basados en la evidencia del modelo murino, los Treg en el SNC de los pacientes con toxoplasmosis cerebral asociada a SIDA tendrían un papel protector y serían cruciales para evitar la inmunopatología, al menos en la infección aguda por *T. gondii*. En este mismo sentido, la mortalidad por TC es menor que en las neuroinfecciones con compromiso meníngeo ([4] y **Figura 1**), lo cual podría explicarse por el papel opuesto que tendrían los Treg en estas dos patologías. En toxoplasma serían protectores y en meningitis patogénicos.

Los Treg se acumulan en el LCR de pacientes con criptococosis meníngea, de demostrarse su función, podría indicar que su presencia se correlaciona con supresión de la respuesta inmune protectora. *Cryptococcus neoformans* es el agente infeccioso micótico más importante en VIH/SIDA y es un problema de muy difícil manejo en suramérica[171]. El componente más abundante del hongo es el

antígeno capsular, compuesto principalmente por glucuronoxylomannan (GXM), el cual se encuentran en grandes cantidades en el LCR e inclusive a nivel sistémico y se reconoce como un potente inhibidor de la activación y migración leucocitaria[172, 173]. El GXM induce células dendríticas tolerogénicas *in vitro* (que expresan altos niveles de TGF- β) y son capaces de favorecer la generación de los Treg, a partir de LTCD4⁺ convencionales, con potencial supresor de la función de los LTCD4⁺ de un perfil Th2[174]. Las respuestas inmunes caracterizadas principalmente por IFN- γ en el SNC son necesarias para garantizar la eliminación del *C. neoformans* y se asocian con mejor pronóstico[33]. Es así como una respuesta de LTCD4⁺ productores de IFN- γ y TNF- α se asocian con un mejor desenlace clínico y disminución de la mortalidad relacionada con criptococosis meníngea[175]. Se desconoce el perfil de las células infiltrantes del LCR en esta patología y no hay evidencia del posible efecto inhibitorio que sobre su función puedan tener los Treg, salvo lo descrito en algunos modelos *in vitro*, que sugieren que los PBMC depletados de Treg suprimen mejor la proliferación de las levaduras que los PBMC completos. Es necesario plantear a futuro estudios para evaluar el impacto de los Treg del LCR sobre la mortalidad de los pacientes con IO, pues en este estudio el número de pacientes fue insuficiente para evaluar el efecto de los Treg o su asociación con el desenlace clínico o la sobrevida. Estudios futuros buscarían determinar si la frecuencia de células reguladoras en el SNC se correlaciona con variables clínicas como el estado o presencia de déficit neurológico, eliminación del antígeno de criptococo del LCR y la sobrevida. Estos resultados preliminares en criptocosis meníngeas

(acumulación de los Treg, alta carga viral VIH-1, altos niveles de IL-10 y otras citocinas inflamatorias y alta mortalidad) nos hacen sospechar que los Treg se correlacionen con pobres respuestas inmunes, al suprimir las respuestas específicas al *C. neoformans*.

Los Treg (FoxP3⁺) se acumulan específicamente en los compartimentos afectados por *Mycobacterium tuberculosis* (alveolo pulmonar, espacio pleural, peritoneo, pericardio y líquido cefalorraquídeo). Desde la caracterización de la molécula FoxP3 como el marcador más importante de los Treg, se reconoció que los Treg se acumulan en las localizaciones anatómicas afectadas por la tuberculosis (Treg detectados en líquidos de serosas)[176] en pacientes VIH negativos. Los Treg no sólo se acumulan en el líquido pleural de los pacientes con TBC pleural[96, 135], sino que también son detectables en la pleura parietal de estos individuos [177]. En Tuberculosis pulmonar activa se encuentra un incremento significativo de los Treg en el compartimento alveolar pulmonar respecto a la sangre periférica, además los Treg autólogos de estos pacientes suprimen las respuestas anti tuberculosis *in vitro*, sugiriendo que estos Treg tienen la capacidad de subvertir la inmunidad protectora anti tuberculosa.[178] Incluso hay reportes que afirman que las personas con Tuberculosis multidrogo resistente (MDR) expresan en sangre periférica una mayor proporción de Treg que las tuberculosis sensibles[179] Los hallazgos de este estudio son novedosos puesto que se documenta por primera vez la acumulación de linfocitos T reguladores en el LCR de pacientes VIH/SIDA con meningitis tuberculosa, que en el contexto de la evidencia actual (revisada en[180]) soportan la hipótesis que los Treg participan en la neuropatogénesis de

esta infección oportunista y que posiblemente contribuyen a la perpetuación de *M. tuberculosis* en el SNC al suprimir la respuesta inmune específica al patógeno.

La presencia de los Treg en el sistema nervioso no es confirmatorio de su función inmunosupresora, protectora o patológica. Es posible que la función inmunoreguladora de los linfocitos T reguladores en el LCR, esté atenuada o completamente inhibida por el microambiente cerebral, específicamente por el patógeno oportunista o el mismo VIH. Por ejemplo, en casos de tuberculosis pulmonar asociadas a VIH y que desarrollan el síndrome de reconstitución inmunológica secundario a ART, los Treg se acumulan pero son deficientes en su capacidad reguladora[151]. Igualmente, en esclerosis múltiple se han detectado Treg en sangre con frecuencias similares a las encontradas en individuos sanos, pero con profundos defectos en su capacidad de inmunomodulación sobre los linfocitos T, *in vitro*[125, 181]. Por lo tanto, la presencia y acumulación de los Treg en un tejido no necesariamente se correlaciona con su papel inmunomodulador. Es necesario entonces demostrar la capacidad inmunosupresora de los Treg presentes en el LCR de los casos de NeuroSIDA por infecciones oportunistas, mediante ensayos funcionales *in vitro*, como una aproximación inicial al conocimiento de su papel *in vivo* en estas complicaciones neurológicas.

Las infecciones oportunistas del sistema nervioso central, al generar inflamación, pueden impactar la neuropatogenesis mediada por el incremento de la carga viral de VIH y el tráfico de las células infectadas en el cerebro. El RNA del VIH-1 fue detectable en el LCR de todos los casos evaluados, las cargas virales en LCR de los pacientes con IO del SNC fueron significativamente mayores a las encontradas

en pacientes sin IO, hallazgo acorde a lo reportado en la literatura[25]. Además se encontró que las patologías con compromiso meníngeo (criptococosis y tuberculosis) tenían títulos virales de VIH mayores a las encontradas en toxoplasmosis cerebral, indicando que una mayor pleocitosis acompañada de inflamación a nivel meníngeo, es predictora de una replicación aumentada del virus. La mayor carga antigénica del VIH, no solo se puede traducir en neuropatogenesis en el contexto de las IO agudas, sino que también puede tener repercusiones a largo y mediano plazo en el desarrollo de complicaciones relacionada con el virus como son la demencia asociada a VIH [182]. Este hallazgo es muy importante puesto que evidencia el riesgo aumentado que tienen los pacientes que sobreviven a las IO del SNC de desarrollar complicaciones asociadas al virus, que muchas veces son enmascaradas o interpretadas como complicaciones secundarias a la IO.

4. OBJETIVO ESPECÍFICO 2:

Evaluar la frecuencia y características de la infiltración por Treg en el tejido cerebral en casos fatales de las infecciones oportunistas más comunes en neuroSIDA.

4.1 Raciocinio y Justificación

Las Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) se acumulan en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con IO del sistema nervioso central asociadas a SIDA de acuerdo a los hallazgos de este estudio, pero esta evidencia no es suficiente para determinar que hacen parte de los procesos patogenicos en las infecciones oportunistas en el SNC.

Era necesario demostrar que los Treg tambien infiltran el parénquima cerebral y hacen parte de las características histopatológicas de las IO en el SNC. Aunque el LCR es un excelente marcador de los procesos inmunológicos inflamatorios que ocurren en el SNC, no aporta información sobre la localización de las células inflamatorias en el tejido cerebral, o la especificidad en el proceso patológico dentro del parenquima cerebral. Las características histológicas de la infiltración de los Treg, con particular énfasis en su ubicación en el tejido cerebral y magnitud de infiltracion, es crucial para confirmar los hallazgos obtenidos en el LCR, pero principalmente aportaría ideas para formular hipótesis sobre la participación de estos linfocitos en la neuropatogénesis de las IO en SIDA

Las IO del sistema nervioso poseen características histopatológicas específicas que han sido descritas ampliamente desde la aparición de la epidemia de

VIH/SIDA a principios de la década de los 80's[183-185]. La neuropatología de las IO varía según el grado de inmunosupresión (cantidad y nadir de LTCD4⁺), tiempo de evolución de la enfermedad por VIH-1 y la efectividad de la terapia antirretroviral. Por ejemplo, la criptococosis meníngea se caracteriza por la presencia de levaduras en el espacio subaracnoideo, en los espacios perivasculares de Virchow-Robin[186]; y en individuos con inmunosupresión severa, además de meningitis, hay compromiso parenquimatoso (encefalitis), con presencia de criptococomas con escasa o nula reacción granulomatosa. El infiltrado celular esta compuesto principalmente por linfocitos T de memoria (CD45RO⁺) con predominio de LTCD8⁺ dada la depleción sistémica de LTCD4⁺[187]. La toxoplasmosis cerebral se caracteriza por lesiones quísticas necrotizantes, con escaso infiltrado inflamatorio, ubicadas preferencialmente en los ganglios de la base (el compromiso leptomeníngeo es inusual)[17]. Frecuentemente, la reaccion inmunologica esta compuesta de infiltracion mononuclear moderada, consistente principalmente en macrófagos perivasculares y microglía activada. La mayoría de lesiones asociadas a toxoplasmosis tienen edema cerebral importante, principalmente de origen vasogénico. La repuesta inflamatoria perilesional es mayor en los sujetos con enfermedad por VIH menos avanzada, un hallazgo que refleja una mejor respuesta del sistema inmune contra la infeccion oportunista[188]. En el caso de la infeccion tuberculosa oportunista del SNC, las características histopatológicas son variables. En la meningitis tuberculosa, las reacciones inflamatorias pueden ser exuberantes con formacion de granulomas compuestos por una infiltración abundante de LTCD4⁺ y

macrófagos activados o por el contrario pueden ser respuestas “anérgicas” caracterizadas por alta cantidad de bacilos y ausencia de respuesta celular importante[189]. Por lo anterior, si la acumulación de Treg asociada a inflamación y pleocitosis en el LCR de las IO (Objetivo I) es un reflejo de los eventos en el tejido cerebral, se espera que las meningitis (tuberculosa y criptocócica) presenten mayor infiltración a nivel cortical y meníngeo de Treg que la toxoplasmosis cerebral. Por otra parte, se anticipa que los Treg en el tejido cerebral colocalicen con zonas de reacción inflamatoria, LT convencionales (FoxP3), microglía y monocitos perivasculares. Además, se esperaría que los casos más severos de toxoplasmosis cerebral conducentes a mortalidad tengan infiltración de Treg en el parénquima cerebral, asociada a una respuesta inflamatoria disminuida en las zonas perilesionales.

Los Treg se han detectado en el parénquima cerebral de individuos con complicaciones neurológicas tumorales (no asociadas a VIH) y la magnitud de la infiltración se correlaciona con el pronóstico. Es así como por ejemplo los gliomas de alto grado (glioblastoma multiforme)[131, 190] o los tumores cerebrales metastásicos [130], cursan con una mayor infiltración de Treg y tienen peor pronóstico y mayor mortalidad que las lesiones de bajo grado que presentan poca infiltración de los Treg[130]. Además en las lesiones severas los Treg se encuentran cerca de los focos inflamatorios, sugiriendo que los Treg infiltrantes del SNC están relacionados con la neuropatología, posiblemente al inhibir las respuestas inmunes específicas a tumores en el SNC. Resumiendo lo anterior, si los Treg son parte de respuesta inflamatoria en ciertas patologías del SNC,

resultaría plausible que se pudieran detectar también en el tejido cerebral y fueran parte de las reacciones histopatológicas presentes en las IO asociadas a SIDA.

Debido a que las Treg se acumulan en el LCR de individuos con IO del SNC asociadas a SIDA (ObjetivoI) y son detectables en el tejido cerebral en otras complicaciones neurológicas, relacionándose específicamente con la patología, este objetivo buscó determinar por inmunohistoquímica la localización y el número relativo de los Treg (FoxP3⁺) en el tejido cerebral de casos fatales de infecciones neurológicas oportunistas asociadas a VIH/SIDA.

A pesar de que las neuroinfecciones oportunistas asociadas a SIDA tienen un alto índice de mortalidad y en el caso particular de este estudio fué cercana al 40% (**Figura 1**), por razones logísticas no fue posible obtener muestras de tejido cerebral de los pacientes de este estudio que fallecieron. Por lo tanto, para el cumplimiento del objetivo se estableció colaboración con el bio-repositorio de tejidos del Hospital Johns Hopkins en Baltimore (Maryland, Estados Unidos). El diseño metodológico incluyó tejidos del bio-repositorio provenientes de pacientes fallecidos por IO del SNC en la ciudad de Baltimore y además algunos casos provenientes de Bangalore, India, todos los cuales compartían algunas características epidemiológicas de la infección VIH-1, pero se diferenciaban en la cepa viral. Los casos de USA fallecidos entre 1986 y 1996 estaban todos infectados con VIH-1 clado B (el clado viral presumiblemente más frecuente en Colombia[191, 192], y al igual que los casos incluidos de la India o los pacientes colombianos del presente estudio no habían recibido terapia antiretroviral de gran actividad (TARGA). Los tejidos de India eran provenientes de casos en Bangalore

(estado de Karnataka) fallecidos entre 2000-2004 y en contraste con los casos incluidos de USA estaban infectados con el clado C del VIH-1, la cepa viral más frecuente en la India, lo cual brindó una excelente oportunidad para examinar comparativamente la inducción de los Treg en relación con el subtipo viral de VIH-1.

Esta circunstancia especial de tener tejidos afectados por IO provenientes de casos con subtipos diferentes del VIH-1 nos llevó a investigar como la variación en el tipo de virus podría influenciar la respuesta de los Treg. Es bien sabido que la extraordinaria variabilidad del VIH-1 tiene impacto en su transmisibilidad, en el tropismo viral, en la respuesta al tratamiento antiretroviral o en la neuropatogénesis asociada a SIDA. El grupo M del VIH-1, causante de la mayoría de infecciones alrededor del mundo, se clasifica en 9 subtipos o clados (A, B, C, D, F, G, H, J y K) y varias formas recombinantes de ellos[193]. El subtipo C es causante del 50% de las infecciones del mundo y está restringido a la India y África Subsahariana, mientras que el subtipo B predomina en el continente Americano y algunos países europeos[194, 195]. Con respecto a su tropismo, las cepas del clado C son predominantemente del tipo R5 (macrofagotrópicas) [196], en contraste las cepas virales del subtipo B son principalmente linfotrópicas (X4)[197]. De manera importante por su relación con este estudio, los subtipos C y B del VIH-1 también se diferencian en su potencial de neurovirulencia. Por ejemplo, al clado C se le atribuye una menor capacidad neuroinvasiva comparado con el subtipo B, debido a un polimorfismo en la proteína Tat [198, 199]; lo cual explicaría en parte su baja asociación con demencia o con los otros trastornos

neurocognitivos asociados a VIH/SIDA (HAND), más prevalentes en los individuos infectados con el subtipo B. Por otra parte, aunque las IO del SNC ocurren en individuos infectados por cualquiera de los subtipos o clados del VIH-1, la cepa viral también parece relacionarse con el tipo de coinfección oportunista. Por ejemplo, la meningitis tuberculosa es más común en los individuos infectados con el clado C[200], comparado con la toxoplasmosis cerebral que es la más frecuente en las áreas del mundo con predominio de infecciones con el subtipo B del VIH-1[31]. Clados virales con distintos perfiles de neurovirulencia podrían también diferir en el tipo de respuesta inmune y en los mecanismos de regulación de la inflamación a nivel del SNC, y específicamente en el perfil de infiltración los Treg. La neuropatología de la infección por VIH-1 clado B y las IO en el SNC se caracterizan por formación de células gigantes multinucleadas, nódulos microgliales, infiltrado mononuclear perivascular y de los plexos coroideos, así como infiltración parenquimatosa meníngea[201]. La histopatología de las mismas IO en sujetos infectados con VIH-1 clado C es similar a la observada en el clado B, con excepción de la reacción por células gigantes multinucleadas[26] que son poco frecuentes y que son atribuidas al tropismo X4 característico del subtipo B. En conclusión, a pesar de las diferencias en los patrones de neurovirulencia reportadas entre los subtipos B y C del VIH-1, estas diferencias parecen contribuir muy poco a un perfil neuropatológico específico en la coinfección con las IO en el SNC. Sin embargo la información al respecto es aún escasa y no existe evidencia en los mecanismos de inmunoregulación de la neuroinflamación por las IO o su impacto en morbilidad. Por lo tanto, la detección y caracterización de la

infiltración por Treg en el tejido cerebral descrita en este capítulo adiciona un nuevo elemento a la neuropatología de las IO en VIH/SIDA previamente descrita.

4.2 Metodología

4.2.1 Población de estudio y Tejido cerebral proveniente de Autopsias.

Se analizaron muestras de tejido cerebral de 19 pacientes con SIDA que fallecieron por infecciones oportunistas del sistema nervioso central, 9 de ellos con criptococosis meníngea, 7 casos de toxoplasmosis cerebral y 3 casos con tuberculosis meníngea. Las muestras estaban preservadas en parafina y provenían del National Institute of Mental Health and Neurosciences (NIMHANS), Bangalore, India (11 casos) y del NeuroAIDS Brain Bank de Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Estados Unidos (8 casos). Todas las muestras provenían de pacientes adultos, con edades entre los 18 y 52 años, el intervalo postmortem (entre el fallecimiento y la realización de la autopsia) fue de aproximadamente 5 horas (2-15 hrs). Ninguno había recibido TARGA, Todos los pacientes habían recibido algún tipo de terapia específica para las OIs del SNC, con tiempos de tratamiento muy variables (entre 1 y 24 días), sin embargo no se encontró que este tratamiento modificara el perfil de inflamación e infiltración en el SNC, tal como fue descrito en un reporte previo a este estudio [26].

Los casos fueron seleccionados teniendo en cuenta principalmente la presencia de infiltrado inflamatorio en las tinciones de Hematoxilina-Eosina (H&E) de acuerdo a la consideración subjetiva de un neuropatólogo experto (Dr. Carlos Pardo, Johns Hopkins Hospital). Se tuvieron en cuenta las muestras con al menos

un infiltrado mononuclear moderado. Por obvias razones, se descartaron los casos en los cuales no habia una reacción inflamatoria apreciable en tinciones de H&E. La estandarización de la tinción para LT reguladores (CD3⁺FoxP3⁺) se realizó tanto para inmunohistoquímica convencional como para microscopia laser confocal. Como control positivo de la tinción para Treg se utilizó ganglios linfáticos y muestras de tejido cerebral proveniente de hemisferectomias de pacientes con síndrome de Rasmusseen (encefalitis caracterizada por una alta infiltración de LT), del mismo repositorio de tejidos. Los procedimientos anteriores y la inmunohistoquímica en los tejidos del estudio se realizaron en el laboratorio de Neuroinmunopatología de Johns Hopkins University (Baltimore, MD, USA) bajo la dirección del asesor internacional (Dr. Carlos A. Pardo Neurólogo – Neuropatólogo).

4.2.1 Inmunohistoquímica

El protocolo para recuperación del antígeno y tinción se encuentra detallado en el Anexo III, a continuación se presenta un resumen de la metodología para la realización de la Inmunohistoquímica.

Recuperación y desenmascaramiento antigénico: Se utilizaron cortes de tejido cerebral de 10µm de espesor preservados en parafina, los cuales se reconstituyeron de la siguiente manera: 1) Se retiró el exceso de parafina usando calor en un horno seco (60°C por 60 minutos). 2) Se rehidrataron las muestras con gradientes de xileno, alcohol y agua. 3) Para la reactivación del antígeno se usó buffer citrato por hervido en microondas por 20 minutos al 20% de poder. 4) Lavados con PBS salino.

Tinción de antígenos con anticuerpos primarios:

Para evaluar la presencia de Treg en el tejido cerebral, se utilizó técnicas de inmunocitoquímica por inmunofluorescencia para detección por microscopia laser confocal para determinar la colocalización de los marcadores CD3, CD4 y FoxP3, y verificar el fenotipo de Treg definido en este estudio; posteriormente se realizó inmunohistoquímica convencional para cuantificar los linfocitos T totales (células con tinción CD3⁺ en membrana citoplasmática) y las Treg o linfocitos T reguladores en una tinción dual de la molécula CD3 en superficie y FoxP3 a nivel nuclear. La decisión de utilizar solamente el marcador CD3 para cuantificar los linfocitos infiltrantes se basó en la dificultad técnica de optimizar un triple marcaje de las moléculas CD3, FoxP3 con CD4 o CD8 por inmunohistoquímica convencional, pero también debido a la baja infiltración de LT CD4⁺ en el parénquima cerebral, dificultando la localización de regiones cerebrales con infiltración linfocitaria significativa basados en el marcador CD4. Los anticuerpos primarios y el protocolo de tinción con ellos fueron iguales para microscopia confocal e inmunohistoquímica convencional. Previamente a la incubación con los anticuerpos primarios, se realizó un bloqueo del tejido con suero normal de cabra y luego se incubaron los cortes con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CD3 (DAKO Code-Nr. A 0452) y un anticuerpo monoclonal de rata anti-FoxP3 (eBioscience Clone PCH101 Cat. No 14-4776), el cual fue seleccionado con base en reportes previos de la literatura en inmunohistoquímica de Treg en nódulo linfático[202, 203].

4.2.1.1 Microscopia Laser Confocal: Para detectar los anticuerpos primarios unidos a FoxP3 se utilizaron anticuerpos secundarios anti-rata marcados con Alexa 546 o 555 (rojo) para detectar los anticuerpos anti-FoxP3 y anticuerpos-anti conejo marcados con FITC o Alexa 488 (verde) para detectar los anticuerpos anti-CD3, (Millipore, USA). Para la visualización de las imágenes se utilizó un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510, que se encuentra en la sección de Neuropatología de la Universidad Johns Hopkins (Baltimore, MD, USA), el software utilizado fue LSM 510 META versión 3.0 SP3. Los Treg se definieron como células infiltrantes mononucleares de membrana verde fluorescente y núcleo rojo fluorescente (CD3⁺FoxP3⁺).

4.2.1.2 Microscopia de Luz: Se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados, anti-rata para la detección de la tinción FoxP3 (Vector Labs), y posteriormente se incubaron con la solución avidina/biotina-ABC Kit (VECTOR/PK-6101 Peroxidasa) y se reveló la reacción con DAB Kit-(VECTOR/SK-4100). Posteriormente para la detección de la molécula CD3, se incubó con un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo (Vector Labs), seguido por avidina/biotina- ABC-AP KIT (VECTOR/AK-5000 Fosfatasa Alcalina) y se reveló con Vector® Blue (VECTOR / SK-5300). Los Treg se definieron como las células mononucleares con doble tinción para la molécula FoxP3 (núcleo café) y la molécula CD3 (membrana azul). Los Linfocitos T convencionales (FoxP3⁻), fueron los positivos solamente para CD3 (membranal azul). Para la visualización de las muestras se utilizó un microscopio con cámara digital integrada y un software para análisis de imágenes. La visualización se realizó en 40x.

4.2.2 Análisis

Se realizó un análisis estereométrico, en el cual se cuantificó el número de linfocitos T (células CD3⁺FoxP3⁻) y Treg (células CD3⁺FoxP3⁺) presentes en un área de tejido cerebral determinada (expresada en micras cuadradas μm^2). Para el análisis cuantitativo del infiltrado celular se uso el método de “fracción de área de inmunoreactividad” [204] en el cual el sistema de microscopia está asociado a un programa de computador diseñado para cuantificación estereométrica (MicroBrightfield, Inc., Williston, VT), estas técnicas están estandarizadas y son de uso rutinario en el laboratorio de Neuroimmunopatología en Johns Hopkins[205]. Las secciones de tejido coloreadas por técnicas de inmunohistoquímica fueron delineadas para los estudios cuantitativos. En promedio 30 áreas para evaluación cuantitativa fueron asignadas en forma sistemática en posiciones RANDOM dentro del área delineada para análisis cuantitativo. El número absoluto de células por área de interés delineada se determinó contando el número de células positivas para el marcador buscado dentro de cada una de las 30 áreas determinadas para el análisis cuantitativo dentro del área de interés. El resultado se expresó como número de células por área evaluada. El conteo celular por este método fue realizado por una persona (miembro del equipo de JHU) que desconocía los grupos diagnósticos asignados, pero que habia sido previamente entrenada en la metodología utilizada.

El área evaluada varió entre los diferentes bloques evaluados y muestras de tejido cerebral y dependió de la cantidad de tejido cerebral presente en la muestra. Se evaluaron de 1 a 5 bloques de parafina por cada caso. Los datos se presentan

como numero de linfocitos T y número de Treg por mm² (1 mm² equivale a 10⁶ μm²). Se realizó un análisis de correlación entre la frecuencia de LT y Treg en el tejido cerebral, para el cual se utilizó un modelo de regresión lineal. Las comparaciones entre frecuencias de Treg y LT por mm² entre las diferentes patologías se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis, debido a que los datos no seguían una distribución normal (al realizar pruebas de bondad de ajuste) y se consideró estadísticamente significativo una diferencia con valor de p<0.05.

4.3 Resultados

El control positivo de la tinción de Treg fué el ganglio linfático de un paciente VIH negativo, y mostró un adecuado marcaje para el marcador CD3, con un patrón típico de membrana, y para la molécula FoxP3 a nivel nuclear **Figura 6A**. Teniendo en cuenta que las características propias del ganglio linfático en lo referente a tiempo de fijación en formol después de la extracción del tejido, o cantidad de células de la respuesta inmune, o intensidad de la expresión de los marcadores CD3/FoxP3 varían considerablemente de los del tejido cerebral, se optimizó la tinción en cortes de tejido cerebral preservado en parafina de pacientes con síndrome de Rasmussen (síndrome convulsivo crónico caracterizado por encefalitis e infiltración importante de LT)[206]. Los resultados de la optimización de la tinción linfocitaria, tanto para microscopia confocal (**Figura 6B**), como para inmunohistoquímica convencional (**Figura 6C**), en tejido cerebral de los casos Rasmussen muestran una tinción abundante de LT (CD3⁺) y Treg (CD3⁺FoxP3⁺) en los espacios perivasculares y otras localizaciones con infiltrado inflamatorio.

Estos resultados verifican el funcionamiento de los procesos de desenmascaramiento antigénico y la excelente capacidad de los anticuerpos primarios, usados a concentraciones optimizadas, para identificar los marcadores seleccionados en las poblaciones celulares infiltrantes en muestras de tejido cerebral.

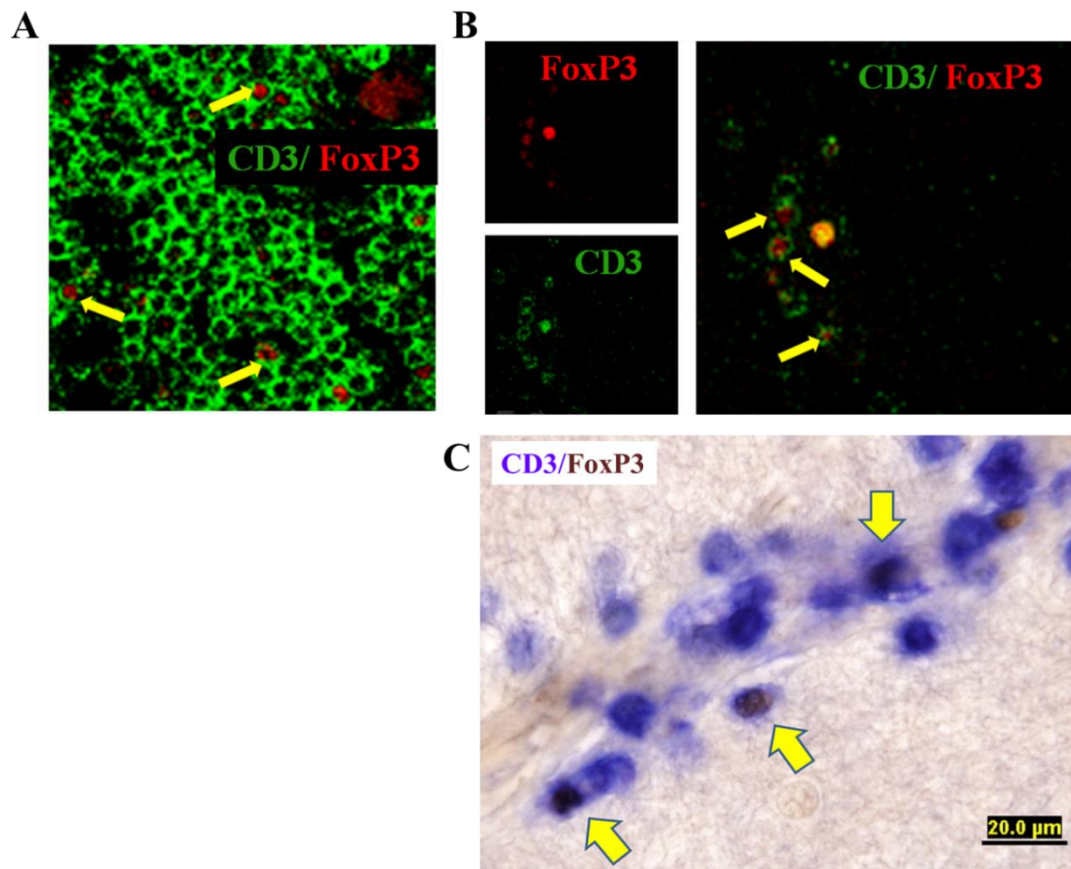


Figura 6. Control positivo de los Treg: Microscopia Laser Confocal de ganglio linfático demostrando la localización nuclear de FoxP3 (rojo) en Linfocitos TCD3⁺ (verde) en **A**. en Tejido cerebral, hemisferectomías de Síndrome de Rasmussen en **B** y **C**. Microscopia Laser Confocal demostrando la localización nuclear de FoxP3 (rojo) en Linfocitos TCD3⁺ (verde) en **B**. Tinción inmunohistoquímica FoxP3 (marrón) en el núcleo y CD3 (azul) membrana y citoplasma **C**.

Se analizaron los tejidos preservados en parafina de 19 pacientes que fallecieron por IO del SNC asociadas a SIDA. En el Anexo IV se describen los diagnósticos,

país de origen, de los 11 casos provenientes de India y 8 casos de los Estados Unidos. Se examinaron en total 44 bloques de parafina (cada caso tenía entre 1-5 bloques de tejido cerebral). En la **Figura 7** se muestra una imagen de microscopia confocal representativa de la presencia de Treg en el parénquima cerebral y colocación con los LT infiltrantes en un caso de Toxoplasmosis cerebral.

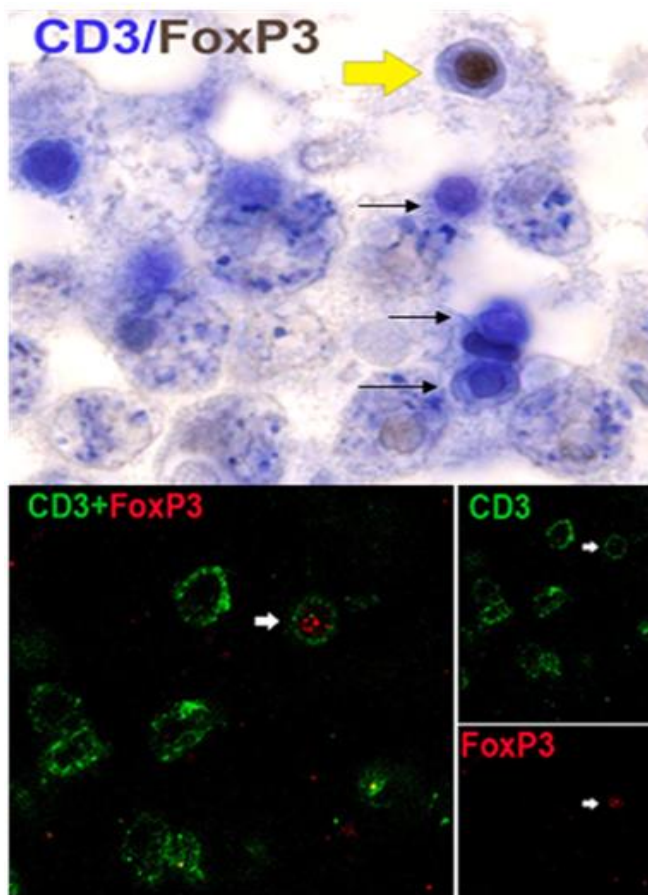


Figura 7: Infiltración de Tregs de un caso con Toxoplasmosis cerebral.

Tinción Inmunohistoquímica -Panel superior- FoxP3 (marrón) en el núcleo y CD3 (azul) membrana y citoplasma (flechas amarillas). Microscopia confocal -Panel inferior- demostrando la localización nuclear de FoxP3 (rojo) en linfocitos T CD3⁺ (verde) en el SNC (flechas amarillas).

La cuantificación por estereometría se realizó en las tinciones de inmunohistoquímica para microscopia de luz, en el total del área del tejido teñido la cual varió en un rango entre 2.8-50.2 mm² entre los casos (promedio 13.2±8.3 mm²). Los LT (células CD3⁺) se pudieron identificar en todas las muestras, sin

embargo el número de linfocitos T infiltrantes en tejido cerebral fue muy variable entre los casos (1-148 LT/mm²; promedio 25±29 LT/mm²). Los Treg (CD3⁺FoxP3⁺) se identificaron en 35/44 muestras (80%), su número fué muy variable siendo máximo de 10 Treg/mm². Para evaluar la relación entre la magnitud de infiltración de los Treg y de los LT convencionales se realizó un análisis de asociación, estableciéndose una correlación lineal ($R=0.63$; $R^2=0.4$) con un valor de $p<0.005$, el cual permite concluir que la infiltración de los Treg es directamente proporcional a la infiltración por Linfocitos T en el tejido cerebral de pacientes fallecidos con IO de SNC asociadas a SIDA.

Los Treg en el SNC tuvieron un patrón de infiltración diferencial de acuerdo a la infección oportunista asociada a SIDA. En criptococosis meníngea los Treg se encontraron predominantemente en los espacios perivasculares, hallazgos muy similares fueron encontrados en los pocos casos de tuberculosis meníngea. Mientras que en toxoplasmosis cerebral los Treg se encontraron en mayor proporción en localizaciones intraparenquimatosas cerca de las lesiones quísticas o masas (**Figura 7**). Estos resultados muestran que la topografía de la infiltración de los Treg se relaciona de forma estrecha con los sitios de infección oportunista, reflejando el proceso patogénico y por lo tanto podrían estar involucrados en la inmunopatogénesis.

De acuerdo a los hallazgos en el LCR se esperaba que las meningitis (tuberculosa y criptococcica) presentaran una mayor infiltración de los Treg en el tejido cerebral, lo cual también se correlacionaría con la pleocitosis del LCR. Sin embargo, la toxoplasmosis cerebral fué la patología con una mayor proporción de

los Treg en tejido cerebral en promedio 2,7 Treg/mm², comparado con CM 1.0 Treg/mm² y TBM 1.0 Treg/mm². Esta mayor proporción de los Treg en los tejidos de pacientes con TC fue estadísticamente significativa al realizar la comparación con CM (p=0.02 en el análisis de Kruskal-Wallis).

TC presenta una mayor frecuencia de linfocitos T en el tejido cerebral en promedio 36,7 LT/mm², comparado con CM 19.1 LT/mm² y TBM 11.1 LT/mm². Esta mayor proporción de LT en las muestras de pacientes con TC comparado con las meningitis no alcanzó significancia estadística pero si mostró una tendencia a favor de TC (p=0.07 en el análisis de Kruskal-Wallis).

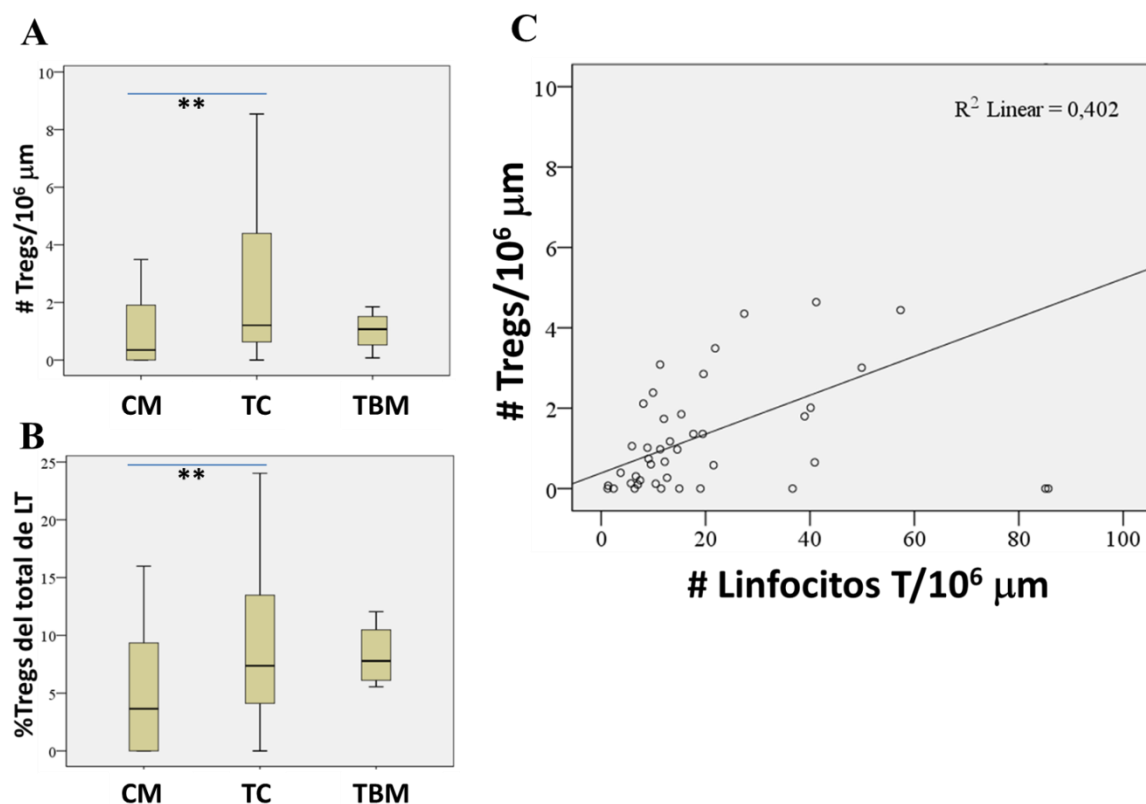


Figura 8. Frecuencia de los Treg en el Tejido cerebral de Infecciones oportunistas en NeuroSIDA: Número absoluto de Treg en **A** y porcentaje del total de LT en **B**. Análisis de correlación entre la frecuencia de los Treg y LT en NeuroSIDA en **C**.

4.4 Discusión

Los resultados de este estudio muestran que los Treg tienen un proceso activo de migración y localización específica a los sitios de infección oportunista, reflejando el proceso patogénico. En el caso de las meningitis (CM, TBM) la mayor concentración de Treg está en las meninges y el espacio perivascular y en el caso de la toxoplasmosis cerebral en el tejido activamente inflamado a nivel parenquimatoso. La cantidad de los Treg en el tejido cerebral (por estereometría) fué directamente proporcional a la magnitud del infiltrado linfocitario (LT), el cual colocaliza con los antígenos de los microorganismos oportunistas o del VIH-1 en estos mismos tejidos según observaciones previas[26].

Este hallazgo confirma que los Treg hacen parte de las reacciones neuroinmunopatológicas de las IO asociadas al SIDA y sugiere que la respuesta inmune inflamatoria presente en el líquido cefalorraquídeo, particularmente la presencia de los Treg, es un buen reflejo de lo que ocurre a nivel del tejido cerebral. Los casos de toxoplasmosis cerebral presentan una mayor frecuencia de los Treg que infiltran el parénquima cerebral comparado con las meningitis. Estas células colocalizan con sitios de inflamación activa inducida por el *Toxoplasma gondii*. Esta conclusión se soporta en la observación de que el tejido cerebral de pacientes fallecidos por TC tuvo no sólo una mayor proporción de los Treg si no también una mayor infiltración de LT que los tejidos de patologías con compromiso principalmente meníngeo. La concentración de los Treg en el parénquima cerebral

de las TC podría explicar su menor proporción en el LCR, comparadas con los CM Figura 8A-8B.

La detección y caracterización del patrón de infiltración de esta población de Linfocitos T reguladores con fenotipo FoxP3⁺ en el tejido cerebral describe una nueva característica de la neuroinmunopatología de las IO en SIDA. Durante la infección por VIH y sobre el curso de las IO que afectan a estos pacientes, se ha observado que las respuestas inflamatorias microgliales (infiltradas también por Treg FoxP3⁺ en este estudio) generan gran cantidad de citoquinas y quimioquinas que contribuyen al daño del tejido y por ende a la neuropatología. En modelos murinos con encefalitis por VIH-1 (HIVE), los Treg migran a través de la BHE a las áreas del cerebro afectadas por la respuesta inflamatoria inducida por el virus[207], favoreciendo la persistencia y propagación del VIH-1 a nivel neurológico. En este estudio la acumulación de los Treg en el SNC está asociada a los sitios de infección oportunista y no necesariamente representa un patrón de reclutamiento difuso o trans-migración de Treg en el SNC. Esta circunstancia sería un factor que favorece la persistencia y propagación del VIH-1 a nivel neurológico, mediante la modulación de la respuesta efectora inmunológica anti-viral. En los humanos las neuroinfecciones oportunistas también disparan una abundante expresión de antígenos del VIH en el parénquima cerebral, asociado a los nódulos microgliales y macrófagos perivasculares[26, 201], y además causan un importante aumento de la carga viral del VIH en el LCR[208] y Figura 4 Objetivo 1, indicando una replicación viral activa que puede estar relacionada con la migración o expansión de los Treg y el infiltrado inflamatorio asociado[148].

La infección del sistema nervioso central (SNC) por el virus del VIH-1 ocurre tempranamente durante la infección aguda y se presume que persiste en este órgano por décadas[209], con reactivación importante de su replicación durante inmunosupresión sistémica profunda[210] en fase SIDA. La infección persistente del VIH-1 en el SNC está compartimentada, demostrado por las secuencias de las cepas del VIH-1 en el tejido cerebral más estrechamente relacionadas entre sí, al compararlas con secuencias de virus presentes en los tejidos periféricos del mismo individuo[211]. En el caso específico de la infección por VIH-1, los macrófagos perivasculares y la microglia son las células infectadas por el virus y en donde hay un potencial de replicación viral que favorece la migración y aumento en la población de LTCD8⁺ en los tejidos del cerebro. Son estas células las que establecen un control para la replicación viral en las primeras etapas de la infección, sin embargo este efecto protector disminuye con la disminución periférica de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en ausencia de tratamiento y al mismo tiempo aumenta la entrada de monocitos infectados[212]. La infiltración de los Treg asociada a las IO podría contribuir a una inmunosupresión generalizada en el tejido cerebral, facilitando la replicación del VIH-1 y/o la de los microorganismos oportunistas, impactando el pronóstico de estas complicaciones neurológicas.

El impacto de la infiltración por los Treg en el tejido cerebral sobre el desenlace clínico que tuvieron estos pacientes es desconocido y debería ser evaluado posteriormente. En toxoplasmosis se sabe que la depleción de los Treg (con MAb

anti-CD25) se traduce en mortalidad del 60% en ratones BALB/c (resistentes) que se infectan agudamente con la cepa de *T gondii* ME49[168, 213]. Esta evidencia sugiere que los Treg son esenciales para la protección durante la fase aguda de la infección, lo cual nos hace pensar que la presencia de los Treg en las lesiones tipo masa producidas por toxoplasma tienen un efecto benéfico al tratar de disminuir la respuesta inflamatoria, que termina siendo deletérea con la aparición de edema cerebral en el espacio contenido de la bóveda craneana. Parece que para *T. gondi* la supresión de células T por los Treg ocurre por competencia por la IL-2, *via* CD25 expresado constitutivamente en los Treg. [170]. Sin embargo, en los humanos no hay evidencia del impacto clínico de los Treg en la TC o ninguna otra de las IO en el SNC.

Hasta la escritura de esta tesis, no hay otros reportes de la presencia de los Treg en el parénquima cerebral de pacientes VIH⁺ y que tienen infecciones oportunistas asociadas a SIDA. La acumulación de las Treg en el LCR (Objetivo1), y su detección en las muestras de cerebro en las 3 patologías oportunistas evaluadas por este estudio, confirma que esta subpoblación de linfocitos T hace parte de la respuesta inmune a las IO en el SNC.

5. OBJETIVO ESPECÍFICO 3:

Determinar si la diversidad clonal V β del receptor del linfocito T (repertorio V β del TCR) en los Treg infiltrantes del LCR es indicador de su origen inmunológico inducido.

5.1 Raciocinio y Justificación

Entender los mecanismos por los cuales los linfocitos T reguladores son inducidos y activados por las infecciones, es esencial para el diseño de estrategias terapéuticas que busquen manipular sus funciones. La especificidad antigénica de los Treg, determinada por el receptor del linfocito T (TCR), no parece ser esencial para su función inmunológica pero es muy importante para la generación y diferenciación de los nTreg en el tejido linfoide[214], así como para su proliferación en las infecciones por *Toxoplasma gondii*, *M tuberculosis* y virus de tipo persistente como el herpes virus, hepatitis C y VIH[93].

Existe evidencia de que los linfocitos T reguladores se pueden seleccionar con base en el reconocimiento y la especificidad del TCR frente a péptidos propios, los cuales generan una señal, que dependiendo de su intensidad, determinará si los timocitos autorreactivos serán sometidos a delección, o por el contrario se diferenciarán para convertirse en linfocitos T reguladores naturales (nTreg) [215]. Así mismo, durante la fase aguda de infecciones como leishmaniasis cutánea o malaria y las causadas por *Toxoplasma gondii* y *Micobacterium tuberculosis*, la regulación de la respuesta inmune específica parece estar mediada principalmente por nTreg, que reconocen de manera específica mediante el TCR a los antígenos propios liberados del tejido dañado; mientras que en infecciones crónicas como las

causadas por CMV, Hepatitis B y C, VIH, el control de la inflamación mediada por los linfocitos T sería efectuada por los Treg inducidos (iTreg), los cuales son específicos a los patógenos, y están restringidos (compartimentados) o son atraídos al sitio de la infección en una manera dependiente de antígeno[59, 93, 216-218].

La compartimentación de los Treg (dependiente de antígeno) podría explicar en parte la persistencia y cronicidad de los microorganismos, debido a la inhibición de la función inmune específica en sitios como el sistema nervioso central, aún en presencia de inmunidad protectora a nivel sistémico, tal como ocurre con la reactivación de las infecciones por *M. Tuberculosis* o *Toxoplasma gondii* en el SNC asociadas a SIDA[219].

Los microorganismos pueden facilitar la inducción de los Treg a través de la presentación de antígenos similares a los antígenos propios, estimulando de esta forma la actividad de nTreg[59], así como también manipular la presentación antigénica por las células dendríticas interfiriendo con la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) y la producción de citoquinas/quimioquinas inflamatorias, favoreciendo la generación o el reclutamiento de los Treg en el sitio de la infección [220].

Existe evidencia *in vivo* e *in Vitro* de que los LTCD4⁺ efectores convencionales (CD25⁻FoxP3⁻) se pueden diferenciar en iTreg cuando el receptor del linfocito T (TCR) es estimulado subóptimamente por un antígeno, en presencia de TGF-β e IL-2[54]. Este sería el mecanismo principal por el cual se generan los iTreg (FoxP3⁺) específicos a patógenos que causan infecciones crónicas con bajos

niveles de antígenos como Hepatitis B y *Toxoplasma gondii*. Las infecciones crónicas se desarrollan principalmente en sitios en los que existe una alta producción de TGF- β como son el tracto gastrointestinal, la piel, el ojo y el cerebro[221]. El TGF- β es producido por las células infectadas o células que están en contacto con el patógeno y ayudan a la inducción de FoxP3⁺ y por ende a la inducción de un fenotipo regulador. Se presume entonces que los iTreg expresan la misma variabilidad clonal en el TCR (repertorio del TCR) que los LTCD4⁺ convencionales de los cuales se derivaron[222].

A diferencia de lo que ocurre con los iTreg, los nTreg se derivan del timo y son producidos como resultado de la alta afinidad del TCR con la molécula MHC-II-péptido propio; interacción que requiere de otros estímulos externos tales como la IL-2, CD80 y CD86, por lo cual estos linfocitos expresan constitutivamente la cadena alfa del receptor de IL-2 (CD25). Aunque los nTreg también necesitan del TGF- β para su generación, se postula que a diferencia de los iTreg expresan el factor de transcripción Helios (miembro de la familia de genes Ikaros); el cual está restringido al linaje de los linfocitos T y está implicado en el desarrollo tímico y la homeostasis de esta población celular. Helios se expresa sólo en un porcentaje de Treg (70%) en tejido linfóide y no se expresa en los iTreg inducidos *in vitro* a partir de LT (estimulación del TCR y TGF- β), por lo tanto se considera un posible marcador de los nTreg [223]. No se conoce exactamente la función de Helios en los Treg, pero mutaciones en otros genes de la familia Ikaros están implicados en enfermedades linfoproliferativas y linfomas en modelos animales[224], o están

implicados en la transcripción de FoxP3[221] sugiriendo que contribuyen a su función inmunomoduladora.

Algunos cambios epigenéticos parecen ser importantes para la función reguladora de los Treg y a la vez podrían diferenciar entre las dos poblaciones nTreg e iTreg. Por ejemplo, la acetilación-metilación de histonas o la metilación de residuos de citosinas en dinucleótidos CpG en el locus del FoxP3, el cual está completamente metilado en los linfocitos T naïve CD4⁺CD25⁻, LT CD4⁺ activados y en los iTreg (inducidos con TGF-β) pero no en los nTreg. La demetilación de los residuos CpG es necesaria para una expresión estable de FoxP3[225].

Los nTreg se caracterizan por la expresión constitutiva de marcadores que incluyen, además del factor de transcripción FoxP3 que es un componente crítico para su función, varias moléculas que también están expresadas en linfocitos T convencionales tales como GITR, CD134, CD27, CTLA-4, CD62L y TGF-β[226]. Incluso, marcadores inicialmente descritos como específicos de los nTreg (Helios) pueden expresarse en los linfocitos T convencionales[227]. Por lo anterior, ha sido muy difícil identificar y aislar Treg usando solamente marcadores celulares, y también hacer una diferenciación clara entre las dos poblaciones de linfocitos T reguladores FoxP3⁺ (nTreg e iTreg) basados en los análisis fenotípicos.

Debido a la ausencia de un marcador fenotípico que diferencie definitivamente los nTreg de los iTreg, aún existe controversia respecto a la participación de estas dos subpoblaciones de linfocitos en la respuesta inmune a las infecciones *in vivo* en humanos. Diversas metodologías han sido desarrolladas con el ánimo de poder diferenciar los nTreg de los iTreg, estas incluyen desde la determinación por

técnicas moleculares de factores de transcripción directamente implicados en la generación de los Treg naturales, como el factor Helios anteriormente mencionado, así como la evaluación de la metilación del gen FoxP3[228], o el análisis de la variabilidad clonal del TCR.

En este objetivo se propone la evaluación de la diversidad clonal de las regiones de la cadena β ($V\beta$) del TCR (repertorio $V\beta$ del TCR) de los Treg del LCR como un posible indicador de su origen (inducible).

Varios estudios comparan la diversidad clonal de las regiones CDR3 de la cadena variable β ($V\beta$) del TCR en los linfocitos $TD4^+$ convencionales y los Treg FoxP3⁺[229-231], para determinar el origen de los Treg. Una interpretación es que un solapamiento importante del repertorio del TCR entre estas poblaciones, representa el origen inducible de los Treg (iTreg), debido a que estos linfocitos posiblemente expresan la misma especificidad antigénica que los $LTCD4^+$ convencionales de los cuales se originaron.

El análisis por FACS usando anticuerpos monoclonales específicos para las subfamilias de las regiones variables β del TCR ($V\beta$ FCA) es una de las metodologías más frecuentemente utilizadas para la evaluación de la variabilidad o clonalidad del receptor del LT. La técnica $V\beta$ FCA además de ser rápida, de bajo costo y altamente reproducible, comparada con otras (PCR o tipificación espectral), brinda información cuantitativa de las familias de $V\beta$ utilizadas por las poblaciones de LT para reconocer los antígenos[232-235]. Los anticuerpos monoclonales disponibles cubren más del 70% del total de las familias de $V\beta$ más frecuentes en el humano. La evaluación de la diversidad clonal en estas

subpoblaciones de linfocitos ha demostrado que existe sobrelapamiento en el repertorio del TCR (especificidades) de los Treg y los LTCD4⁺ convencionales específicos a patógenos[229, 236-238]. Específicamente en algunas infecciones crónicas, una mayor frecuencia de ciertas familias de V β (patrón de distribución clonal restringido) en los Treg y en los LT efectores patógeno-específicos, sugiere que los Treg que se acumulan en las infecciones crónicas son específicos a los patógenos y corresponderían a iTreg[59]. En la infección por VIH se producen cambios en la frecuencia y magnitud del repertorio V β del TCR en los LTCD4⁺ y LTCD8⁺[239], los cuales revierten a los patrones normales esperados en sangre al suprimir la replicación del VIH con terapia antirretroviral, indicando que estas clonas de linfocitos son inducidas y por lo tanto específicas a los antígenos del virus[240].

Este estudio hipotetizó que al caracterizar la variabilidad de la región V β del TCR (clonalidad del TCR) de los Treg infiltrantes del LCR en las infecciones oportunistas del SNC en SIDA y compararla con la clonalidad de los LT convencionales allí presentes podría sugerir su especificidad antigénica y ayudaría a definir si se tratan iTreg o nTreg. Una diversidad restringida en la clonalidad V β del TCR (oligoclonal o menos diversa que en sangre) de los Treg del LCR con sobrelapamiento en los LT CD4⁺ convencionales del mismo compartimento, sería altamente sugestivo de la migración o expansión selectiva en el SNC de iTreg inducidos específicamente por el patógeno oportunista y/o el VIH. Mientras que una diversidad más amplia del repertorio de familias V β del TCR en los Treg del

LCR o muy diferente a su contraparte de LT CD4⁺ convencionales sugeriría una migración inespecífica (bystander) de nTreg de tejido linfóide y/o sangre.

Este objetivo buscó determinar la diversidad clonal o repertorio V β del TCR en los Treg que se acumulan en el LCR en individuos con criptococosis meníngea, con el propósito de hacer una caracterización preliminar de su especificidad antigénica que permita determinar si los Treg que se acumulan en el SNC (Objetivos 1 y 2) en las IO en SIDA corresponden a iTreg específicos a las IO y/o el VIH. Se comparó la diversidad clonal del TCR entre las subpoblaciones celulares infiltrantes en el LCR (Treg vs. LT CD4⁺ convencionales) y la diversidad clonal del TCR de los Treg entre compartimentos (LCR vs. Sangre).

5.2 Metodología

5.2.1 Pacientes y muestras:

Para la evaluación de la variabilidad clonal V β del TCR en los Treg infiltrantes del LCR se analizaron las muestras pareadas de LCR y sangre en 6 pacientes VIH/SIDA con criptococosis meníngea confirmada por tinta china y antígeno de *Cryptococcus neoformans* positivo por la prueba de látex. Se seleccionaron casos de CM por ser la IO más frecuente, con mayores niveles de los Treg en el LCR y que requiere múltiples PL como parte del tratamiento. Para garantizar la recuperación del mayor número de linfocitos del LCR posible, todos los casos incluidos tuvieron pleocitosis (conteo de linfocitos mayor a 40 células/ μ L) en el exámen citoquímico del LCR y la mayoría requirió más de una punción lumbar evacuante como parte del tratamiento de hipertensión intra-craneana.

Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre periférica (PBMC):

El aislamiento de los PBMC para caracterizar el TCR de los linfocitos de sangre periférica por análisis de citometría de flujo (FACS), se realizó a partir de 10mL de sangre completa anticoagulada con EDTA por gradiente de densidad estándar de Ficoll-Hystopaque (Sigma, USA). El halo de células mononucleares fué lavado 2 veces con RPMI frío (4 - 8°C) por centrifugación. Las células mononucleares aisladas de acuerdo al procedimiento anterior fueron cuantificadas, resuspendidas en el medio de congelamiento (5×10^6 células/ mL) consistente en RPMI 1640 completo (1% piruvato de sodio, 1% aminoácidos no esenciales, 1000UI

gentamicina/streptomycin;[C-RPMI]) suplementado con 10% de DMSO y 50% de suero fetal bovino (SFB) y criopreservadas en nitrógeno líquido hasta el momento de la tinción.

Aislamiento de células mononucleares infiltrantes del líquido cefalorraquídeo:

Inmediatamente después de la punción lumbar (PL) de diagnóstico y/o PL evacuante, en un lapso de tiempo inferior a 45 minutos, se centrifugaron aproximadamente entre 20 y 30 mL de LCR durante 10 minutos a 1500 rpm y a 4°C. El botón celular se resuspendió y lavó dos veces por centrifugación con 10mL de PBS para remover el exceso de proteínas u otras sustancias provenientes del sobrenadante del LCR. Las células del LCR fueron cuantificadas en cámara de Neubauer, después resuspendidas en un medio de congelamiento conteniendo 90% de SFB y 10% de DMSO, preservadas por 48 horas -80°C y finalmente criopreservadas en nitrógeno líquido. De acuerdo a experimentos previos este protocolo de criopreservación garantizó una viabilidad celular del 90% al 100% en las células mononucleares del LCR después de la descongelación.

El descongelamiento de las células criopreservadas de LCR y PBMC para posterior tinción y análisis por citometría de flujo se realizó con técnica estándar. En resumen, los crioviales se colocaron en un baño maria (temperatura 37°) por pocos segundos, antes de su completo descongelamiento se adicionó 1 mL de SFB frío, 10 ml de medio C-RPMI por 10 minutos a 420g, se realizó cuantificación celular en cámara de Neubauer y determinación de la viabilidad por inclusión del colorante azul de Tripan.

5.2.2 Evaluación de la diversidad clonal de las regiones variable β ($V\beta$) del receptor del linfocito T (TCR) por tinción y análisis de citometría de flujo ($V\beta$ FACS):

La fenotipificación de las subpoblaciones celulares (LT o Treg) se realizó por tinción de las moléculas CD4 y CD3 en la superficie celular, y la tinción intracelular de la molécula FoxP3, con anticuerpos monoclonales específicos marcados con fluorocromos. Los LT CD4⁺ convencionales se identificaron por la positividad con un anticuerpo anti-CD4 marcado con PerCP (Beckton Dickinson, USA), pero que fueron negativos para la tinción intracelular FoxP3 (CD4⁺FoxP3⁻) con un anticuerpo anti-FoxP3 marcado con APC (eBiosciences, USA). Los Treg se caracterizaron como LT CD4⁺ que expresaron FoxP3 intracelularmente (CD4⁺FoxP3⁺). Para la tinción de las regiones variables $V\beta$ del TCR en los LT CD4⁺ o Treg se utilizó el estuche comercial IOtestBetaMark® (BeckmanCoulter, Marsella, Francia), el cual consiste de 24 anticuerpos monoclonales anti $V\beta$ dispuestos en 8 sets (A-H). Cada set contiene 3 anticuerpos específicos para tres familias $V\beta$ diferentes, dos de ellos marcados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con ficoeritrina (PE) y el tercero doblemente marcado con FITC y PE (FITC-PE). El estuche detecta las 24 familias de $V\beta$ abarcando más del 70% del total del “repertoire” o clonalidad de los TCR en los LTCD4⁺ y LTCD8⁺ de los humanos.

Las tinciones se realizaron de acuerdo a los protocolos estándar de los fabricantes. En resumen, después de descongelamiento de las células del LCR o PBMC, se dividieron en alícuotas en 10 tubos para los análisis de citometría de

flujo, así: un (1) control sin teñir, un (1) control teñido solo con anti-CD3 y anti-FoxP3 y ocho (8) tubos (A-H) cada uno teñido con uno de los sets de 3 anticuerpos para detectar las familias de regiones V β (**Tabla 6**).

Tabla 6. Composición del Kit para análisis FACS del TCR V β .

	Tubo A	Tubo B	Tubo C	Tubo D	Tubo E	Tubo F	Tubo G	Tubo H
FITC	V β 3	V β 16	V β 20	V β 8	V β 12	V β 21.3	V β 14	V β 7.2
PE	V β 5.3	V β 9	V β 18	V β 13.1	V β 5.2	V β 23	V β 11	V β 13.2
FITC+PE	V β 7.1	V β 17	V β 5.1	V β 13.6	V β 2	V β 1	V β 22	V β 4
PerCP	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4
APC	Foxp3	Foxp3	Foxp3	Foxp3	Foxp3	Foxp3	Foxp3	Foxp3

Para la tinción de las moléculas de superficie los PBMC o las células aisladas del LCR se incubaron por 30 minutos a 4°C en la oscuridad con los anticuerpos contra antígenos de superficie anti-CD4 y anti-V β , se lavaron 2 veces con buffer de tinción (PBS 1% de BSA) y luego se procedió a realizar la tinción intracelular para FoxP3. Con ese propósito primero se permeabilizaron las células con solución de Fijación y Permeabilización (Fixation/Permeabilization- eBioesciences) por 30 minutos a 4°C, posteriormente se incubó con el anticuerpo anti-FoxP3 APC y se lavó 2 veces con 2mL de buffer de permeabilización, para finalmente resuspenderlas en buffer de tinción hasta el momento de la adquisición en el citómetro de flujo.

Las células teñidas fueron adquiridas en un Citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). Las señales de “forward scatter” (FSC) y “side scatter” (SSC) se usaron para seleccionar células viables en la región de los linfocitos. Se adquirieron al menos 5×10^2 eventos $CD4^+FoxP3^+$ por muestra para garantizar un número representativo de las familias de $V\beta$ en los Treg ($CD4^+FoxP3^+$). Los parámetros y puntos de corte se modificaron en el análisis de acuerdo a la muestra sin teñir. Se utilizó la nomenclatura Wei para clasificar los $V\beta$ del TCR [241], esta clasificación se fundamenta en la identificación inicial de 63 segmentos de genes de TCRVB (52 de los cuales son funcionales) permitiendo establecer familias de $V\beta$. En la **Figura 9** se presenta un ejemplo representativo de la adquisición y estrategia de análisis en un panel de 3 $V\beta$ s (Tubo A) en las subpoblaciones del LCR y sangre.

Los datos se expresaron como porcentaje de linfocitos positivos para cada una de las 24 familias $V\beta$ del TCR y se graficaron en clonogramas (histogramas discriminados por las 24 familias de $V\beta$, cada una de ellas representando una clona de LT expresando un único TCR). Los clonogramas muestran la distribución de la frecuencia de cada familia $V\beta$ en las dos subpoblaciones celulares ($LTCD4^+$ convencional o Treg), indicativo de la variabilidad $V\beta$ del TCR o repertorio del TCR. En los clonogramas se graficó en el eje “X” las familias de $V\beta$ s (24 familias) y en el eje “Y” se presentó el porcentaje de cada familia. Se comparó la similitud entre los clonogramas de los Treg y los $LTCD4^+$ en el LCR en cada paciente para determinar si existía una especificidad antigénica compartida (alto porcentaje de solapamiento en la clonalidad del TCR) entre estas dos

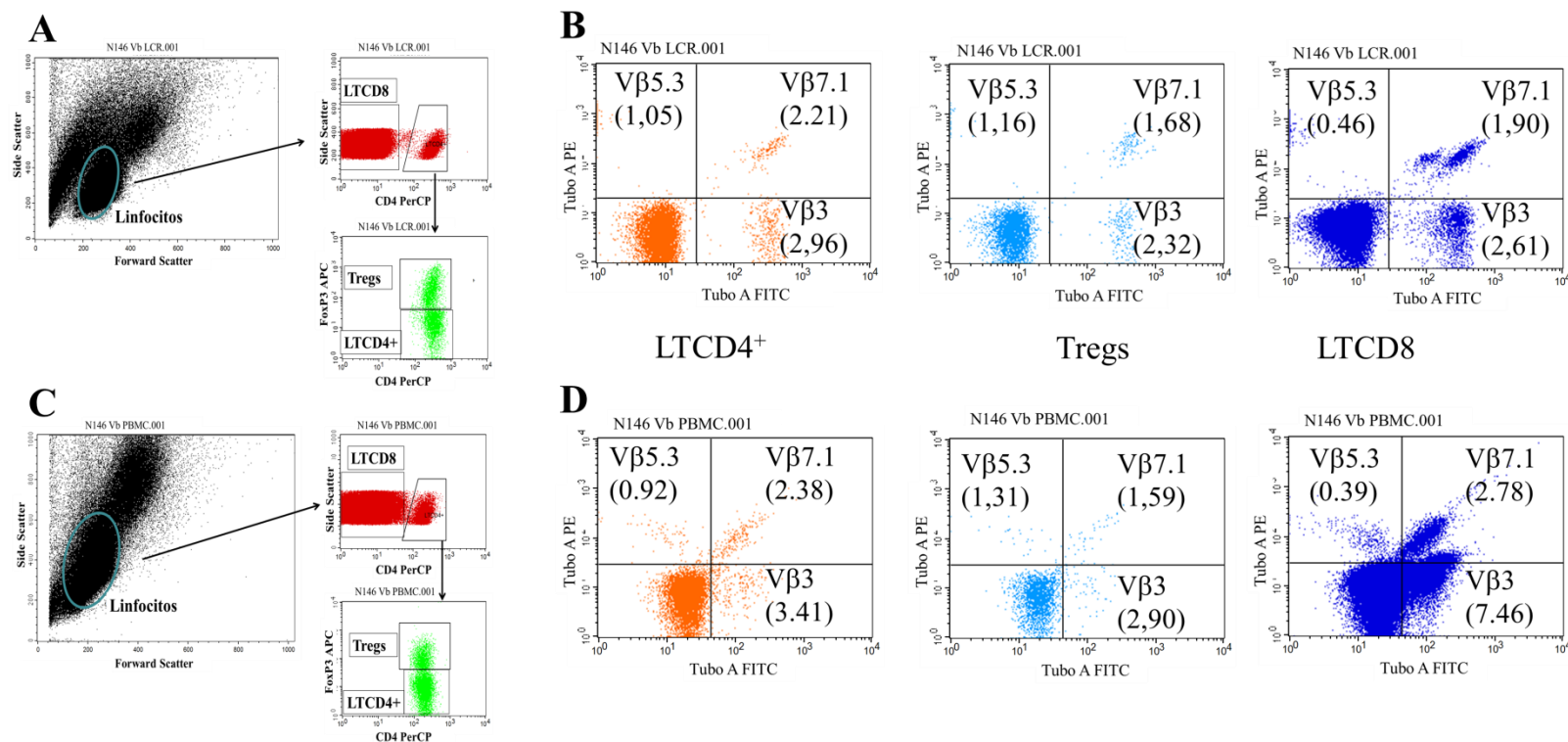


Figura 9: Ejemplo representativo de la estrategia de análisis de los Vβ del TCR en los linfocitos T del LCR y sangre en un ejemplo representativo de un paciente con Criptococosis meníngea (N146). Estrategia de selección de la región los linfocitos viables y frecuencias de las poblaciones de LTCD4⁺ convencionales, Treg y LTCD8 en LCR (**A**) y en sangre (**C**). Frecuencia de expresión de los 3 Vβ presentes en el Tubo A del TCR Vβ Repertoire Kit y su expresión en LCR (**B**) y en sangre (**D**) en las diferentes poblaciones de linfocitarias.

subpoblaciones celulares, en el sitio de la patología. Además se compararon las frecuencias de expresión de las familias de V β en los Treg, LTCD4⁺ convencionales del LCR y sangre periférica en el mismo individuo, para determinar si existía una expansión o reclutamiento preferencial en el SNC de alguna clona de esta subpoblaciones de LT que pudiera relacionarse con la infección oportunista.

5.2.3 Plan de Analisis:

Para determinar los cambios en la distribución de los V β de los TCR en el repertorio de los linfocitos T CD4⁺ convencionales (LTCD4⁺FoxP3⁻) y los Treg (LTCD4⁺FoxP3⁺) del LCR se compararon las proporciones de familias V β entre las subpoblaciones. Se consideraron cambios significativos en el repertorio V β del TCR cuando:

Estrategia I) La proporción de una familia V β excedía la media en dos desviaciones estándar ($\text{media} \pm 2\text{DS}$) al compararlas con el rango normal o frecuencia esperada en personas sanas (Quick Reference Card – Beckman Coulter) y/o **Estrategia II)** Las proporciones de una misma subpoblación celular entre compartimentos (LCR Vs sangre) o entre las diferentes subpoblaciones celulares (LTCD4⁺ Vs Treg) en un mismo compartimento tuvieron una razón de cambio mayor o igual al doble (2X) es decir un incremento superior al 100%. Para las familias V β expresadas en bajo porcentaje (menor al 2%) de acuerdo a la frecuencia esperada en los LT CD4⁺ en sujetos sanos (Quick Reference Card –

Beckman Coulter), sólo se consideraron significativas las razones de cambio mayor a cuatro veces (4X) acorde con lo realizado en otros estudios[240]. Las familias $V\beta$ de baja frecuencia en LT $CD4^+$ son: $V\beta 5.2$, $V\beta 5.3$, $V\beta 7.1$, $V\beta 7.2$, $V\beta 11$, $V\beta 13.6$, $V\beta 16$, $V\beta 18$ y $V\beta 23$.

5.3 Resultados

Se caracterizó repertorio V β TCR en las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ infiltrantes del LCR en seis (6) pacientes VIH/SIDA con criptococosis meníngea de primera vez, y se comparó la diversidad del repertorio V β TCR entre los Treg (CD4⁺FoxP3⁺) y los linfocitos T CD4⁺ clásicos (CD4⁺FoxP3⁻) para evaluar el sobrelapamiento en el uso de las familias V β , como indicador del origen inducido de estos Treg a partir de los LTCD4⁺. La diversidad clonal del TCR se evaluó por FACS con un panel de 24 anticuerpos monoclonales, los cuales cubren aproximadamente un 70% del repertorio V β del TCR humano normal. En la **Figura 10** se muestra un ejemplo representativo de la estrategia del análisis FACS para 3 de las familias V β en las dos subpoblaciones de linfocitos. En el ANEXO V se reportan los datos crudos de las frecuencias de las familias V β en los seis pacientes del estudio.

La frecuencia de expresión de algunas familias V β en CM varía respecto a la esperada en la sangre en una población sana.

La clonalidad V β del TCR en los Treg y LTCD4⁺ convencionales del LCR y sangre periférica de los casos de CM se comparó inicialmente con la frecuencia esperada de las familias V β en los LTCD4⁺ en una población de referencia sana reportada en la literatura. Se consideró como significativa una frecuencia mayor a la media más 2 desviaciones estándar (media⁺2DS). Los rangos de referencia utilizados fueron los definidos en la metodología (Beckman Coulter “Quick Reference Card”) debido a que no se encontraron en la literatura datos de la frecuencia de los V β en

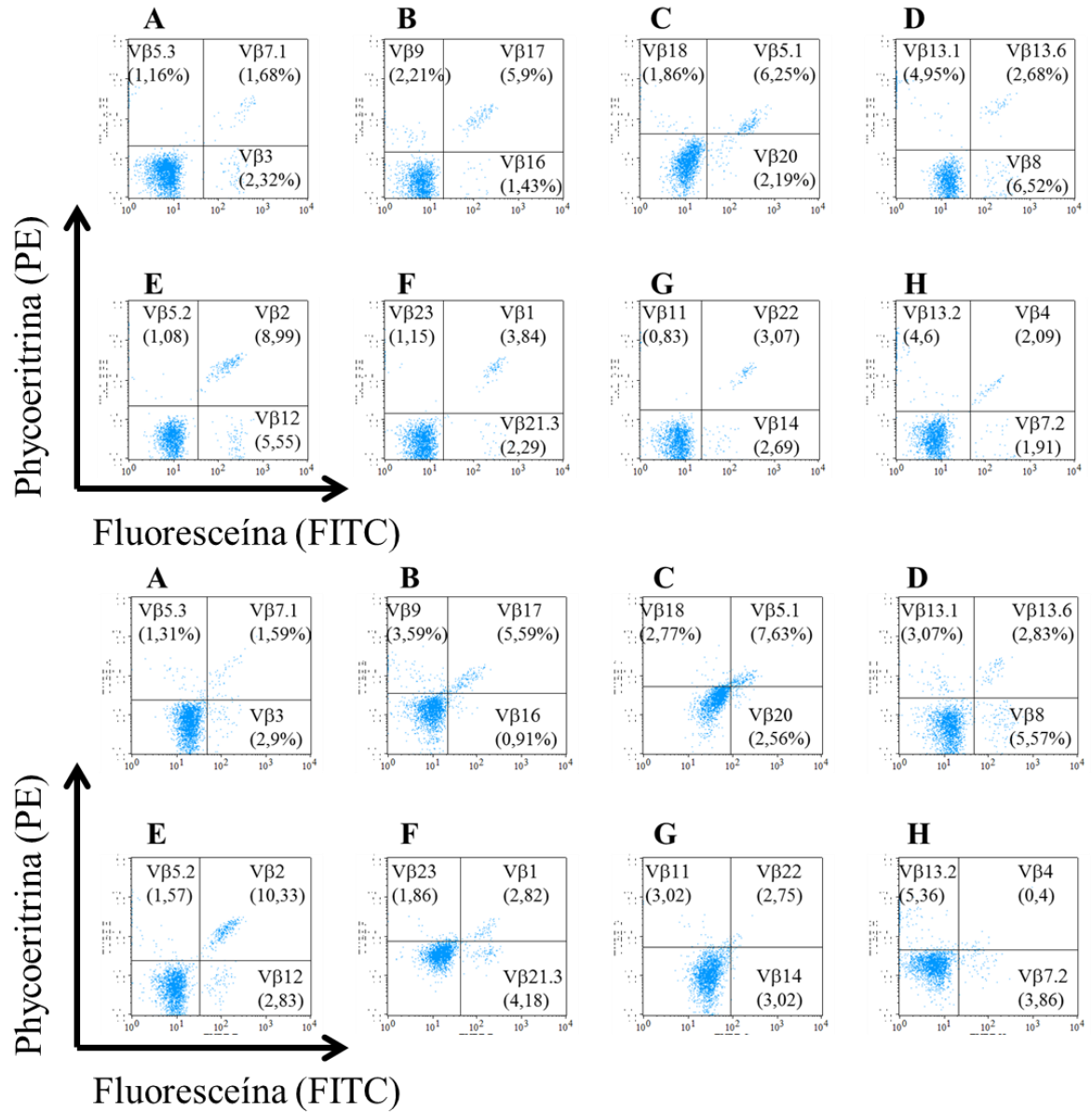


Figura 10. Frecuencia de expresión de los TCR Vβ en los Treg del LCR (paneles superiores A-H) y PBMC (paneles inferiores A-H).

los Treg de adultos sanos (ni se realizó en este estudio), o en los LT del escaso infiltrado que se reporta presente en el LCR de individuos sanos normales. La primera observación, es que las dos subpoblaciones de LT CD4⁺ (convencionales y Treg) infiltrantes del LCR usan en su repertorio TCR las 24 familias Vβ mas

frecuentes del repertorio TCR en humanos sanos alrededor del mundo y por lo tanto es válido usar esta estrategia para caracterizar el repertorio en los pacientes del estudio. Otro resultado importante fué que a nivel neurológico los LTCD4⁺ clásicos y los Treg tuvieron un incremento significativo en la frecuencia de uso de algunos TCR, al menos una familia V β por paciente **Figura 11**, con variabilidad inter-paciente, comparado con su frecuencia esperada en sangre. Incluso en las familias V β de más baja representatividad en sangre de personas sanas (menor al 2%) hubo aumento significativo en su frecuencia en los LT CD4⁺ clásicos (V β 5.3, V β 13.6) y los Treg del LCR (V β 5.2, V β 5.3, V β 7.1, V β 11, V β 13.6) en la coinfección VIH-CM. Estos cambios en la frecuencia de uso del repertorio TCR en los linfocitos del foco inflamatorio podrian atribuirse al proceso de infeccion oportunista, que induce el reclutamiento o la expansion de estas clonas preferentemente en el SNC.

Consistente con los resultados en el LCR, en sangre periférica también fué comun en todos los pacientes el aumento en la frecuencia de algunos clonos de Treg y LTCD4⁺ convencionales comparado con lo esperado en sujetos sanos. Por ejemplo, las clonas de LT CD4⁺ clásicos con TCR V β 11 (casos N146, N147, N163) o V β 13.6 (pacientes N137, N147, N163) y la clonas de Treg con TCR V β 18 (pacientes N146, N160, N162), incrementaron significativamente. El aumento significativo de la frecuencia de LTCD4⁺ con ciertos TCR en el LCR y sangre en casi todos los casos comparado con lo esperado en sujetos sanos, sugiere probablemente la expansión específica a antígenos del VIH-1 en sangre o a la coinfeccion VIH/criptococo en el SNC. Sin embargo, debido a que este estudio no

evaluó los linfocitos en sangre de sujetos sanos del mismo background genético que los pacientes o los de pacientes control VIH/SIDA sin la IO neurológica, los resultados tienen limitaciones en su interpretación.

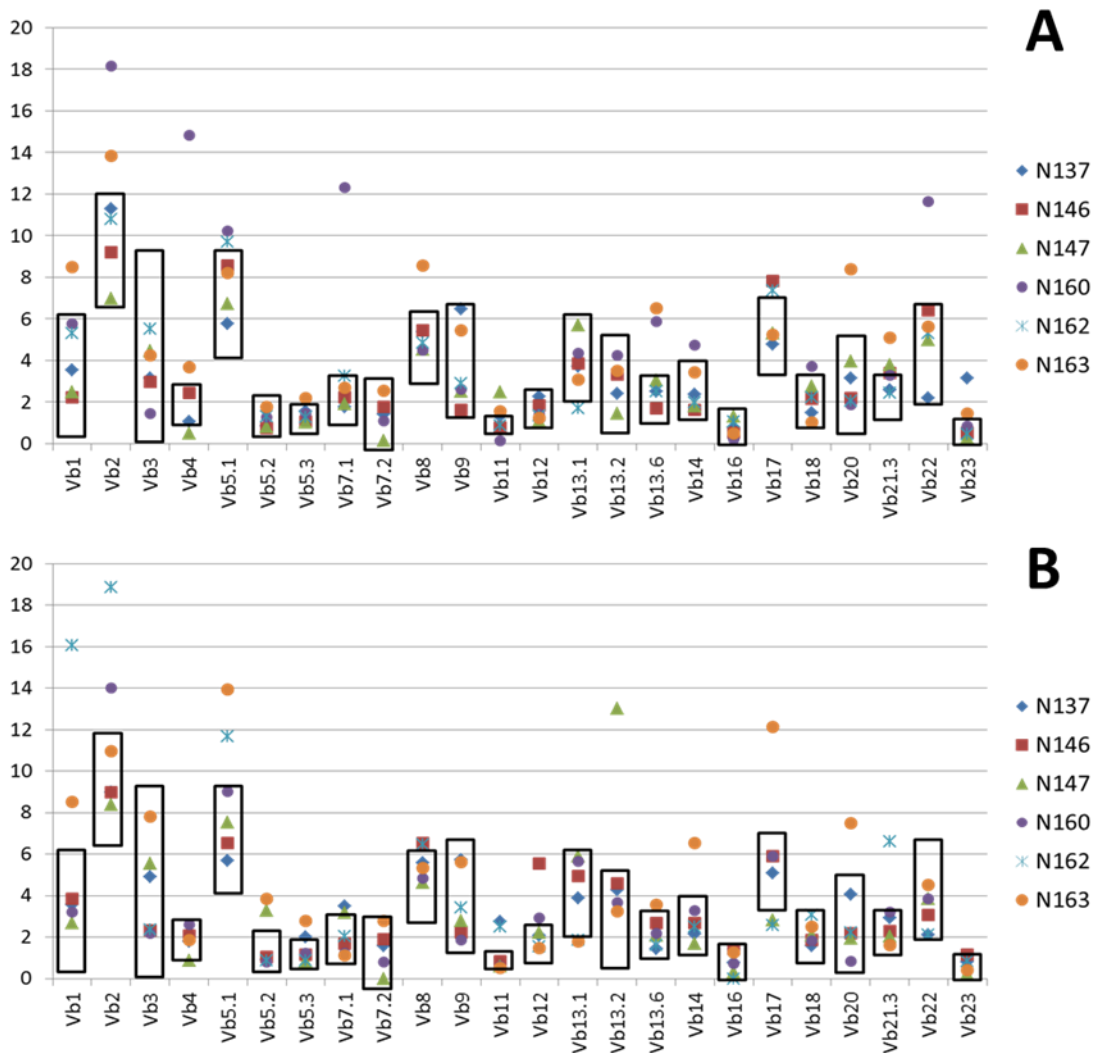


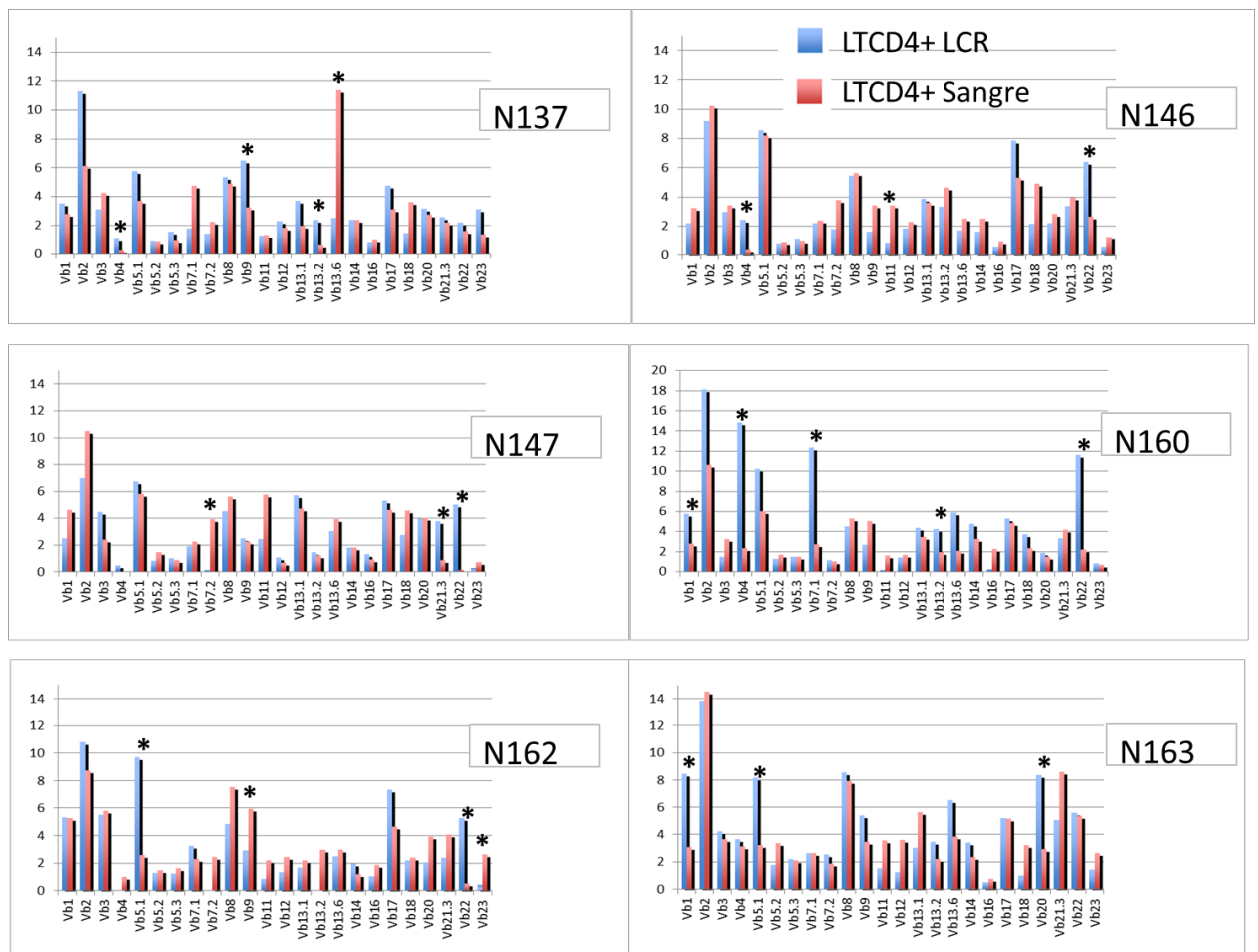
Figura 11: Frecuencia de expresión de las familias $V\beta$ en los $LTCD4^+$ (A) y en los Treg (B) del líquido cefalorraquídeo de 6 pacientes con criptococosis meníngea. Las cajas representan la media $\pm$ 2DS en las familias $V\beta$ en $LTCD4^+$ en sangre periférica en sujetos sanos de referencia (IOTest Beta Mark PN IM3497—Quick Reference Card).

Algunas clonas (familias V β TCR) de LTCD4⁺ convencionales se concentran de forma preferencial en el LCR.

Para determinar si la frecuencia en el uso de las familias V β en el repertorio TCR de las subpoblaciones linfocitarias en el LCR es un reflejo del proceso patogénico ocurriendo a nivel del SNC, se comparó el repertorio V β TCR en los linfocitos acumulados en el LCR vs su contraparte en sangre.

Se estimaron las proporciones de uso de cada familia V β en las poblaciones linfocitarias y se graficaron en forma de clonogramas (**Figuras 12 y 13**). Al comparar la diversidad clonal del TCR en los LTCD4⁺ convencionales (CD4⁺FoxP3⁻) en el LCR vs su contraparte en sangre se observó sobreexpresión de algunas familias V β con una variabilidad inter-paciente (**Figura 12 y Tabla 7**). Específicamente, en el LCR se encontró una expansión significativa de las clonas de linfocitos con TCR V β 22 en cuatro casos (N146, N147, N160 y 162), TCR V β 4 en tres casos (N137, N146 y N160) y TCR V β 5.1 en dos casos (N162 y N163). Esas mismas tres familias del TCR (V β 22, V β 5.1, V β 4) aumentaron en frecuencia en el LCR de los demás casos aunque el cambio no alcanzó al doble de su expresión en los linfocitos de la sangre. Otras familias V β también estuvieron dramáticamente sobreexpresadas (200% o más) en los linfocitos T CD4⁺ del LCR en relación a su contraparte en sangre, con variabilidad entre pacientes. Varias familias V β estuvieron representadas con la misma frecuencia en los linfocitos T CD4⁺ en los dos compartimentos (LCR vs sangre). A diferencia de los hallazgos en el LCR, muy pocas clonas de LTCD4⁺ se expresaron preferencialmente en la sangre sobre su frecuencia en el LCR (**Figura 12 y Tabla 7**).

En resumen, la expansión preferencial de ciertos clonotipos del V β en los LT CD4⁺ a nivel del sistema nervioso en todos los casos de criptococosis meníngea es indicativa de su relación específica con el proceso patológico oportunista y no de una migración bystander o inespecífica desde la sangre. La coincidencia en la expansión de tres clones de LTCD4⁺ (V β 22, V β 5.1, V β 4) en el sitio de la infección oportunista en casi todos los casos, sugiere que probablemente son específicos a antígenos del *Cryptococcus neoformans*.



familia de V β en el eje “x”. Los asteriscos indican diferencias significativas de los V β entre los dos tejidos.

Tabla 7. Variabilidad clonal del TCR V β en los linfocitos T CD4⁺ convencionales (CD4⁺FoxP3⁻) infiltrantes del LCR (LTCD4⁺ LCR) o en PBMC (LTCD4⁺ sangre).

	Expansión clonal LT CD4 ⁺ en el LCR (% incremento LCR Vs sangre)	Expansión clonal LTCD4 ⁺ en sangre (% incremento sangre Vs LCR)
N137	Vβ4 (352%), Vβ9 (100%), Vβ13.2 (303%)	Vβ13.6 (353%)
N146	Vβ4 (594%), Vβ22 (144%)	Vβ9 (112%), Vβ11 (340%)
N147	Vβ21.3 (338%), Vβ22 (4890%)	Sin cambio
N160	Vβ1 (106%), Vβ4 (536%), Vβ7.1 (356%), Vβ13.2 (123%), Vβ22 (435%)	Vβ3 (125%)
N162	Vβ5.1 (274%), Vβ22 (937%)	Vβ9 (104%), Vβ23 (500%)
N163	Vβ1 (177%), Vβ5.1 (155%), Vβ20 (187%)	Sin cambio

La proporción de incremento de cada una de las familias de V β se obtuvo de la relación entre la frecuencia de expresión de cada V β en LCR y sangre o viceversa, multiplicada por 100.

Los datos corresponden a los cambios significativos (igual o mayor al 100%).

Los Treg FoxP3⁺ acumulados en el LCR en criptococosis meníngea comparten el mismo V β TCR de clonas de LTCD4⁺ convencionales expandidas a nivel neurológico.

Para determinar si el repertorio V β TCR de los Treg acumulados en el LCR en las criptococosis meníngea asociadas a SIDA se sobrelapa con el de los LTCD4⁺ convencionales infiltrantes, se comparó la diversidad clonal TCR de ambas poblaciones celulares. Se encontraron similares frecuencias de los V β TCR de los Treg del LCR con los clonotipos V β de los LTCD4⁺ clásicos que habían sido asociados con el proceso patológico en el SNC, por su sobreexpresión en el LCR

(**Tabla 7 Vs Tabla 8 y Figura 13**). Específicamente, en el caso N137 las tres familias V β TCR (V β 4, V β 9 y V β 13.2) o en N146 uno de los dos V β TCR (V β 4) o en N147 los dos TCR (V β 4 y V β 22) o en N160 dos de cinco TCR (V β 1 y V β 13.2) o en N162 uno de los dos TCR (V β 5.1) o en N163 los tres TCR (V β 1, V β 5.1, V β 20) con sobreexpresión en los LTCD4⁺ del LCR, estuvieron representados con la misma frecuencia en los Treg cerebrales. El V β 22 fue el único de los tres TCR más comúnmente representados en los LTCD4⁺ convencionales del LCR (V β 4, V β 5.1 V β 22) que no fue usado con la misma frecuencia en los Treg del mismo compartimento. En general no se encontraron mayores diferencias en los clonogramas de las dos subpoblaciones en el LCR, con excepción del uso preferencial de unas pocas familias V β en los TCR de los Treg sobre su frecuencia en los LT CD4⁺ en tres pacientes o viceversa en otros tres pacientes (**Figura 13 y Tabla 8**).

Tabla 8. Expansión clonal de los Treg o LT CD4⁺ en el LCR.

	Líquido Cefalorraquídeo LCR	
	Razón Treg/ LTCD4 ⁺ conv (%incremento de Treg)	Razón LTCD4 ⁺ conv/Treg (%incremento de LT CD4 ⁺)
N137	Sin cambio	Vβ23 (285%)
N146	Sin cambio	Vβ22 (108%)
N147	Vβ5.2 (310%), Vβ13.2 (809%)	Vβ11 (330%), Vβ20 (104%)
N160	Vβ11 (321%)	Vβ4 (466%), Vβ7.1 (894%), Vβ22 (201%)
N162	Vβ1 (203%), Vβ21.3 (174%)	Vβ3 (135%), Vβ17 (187%), Vβ22 (150%)
N163	Vβ17 (133%)	Vβ21.3 (213%)

La proporción de incremento de cada una de las familias de Vβ se obtuvo de la relación entre la frecuencia de expresión de los Vβ en Treg y LTCD4⁺ o viceversa, multiplicada por 100. Los datos corresponden a los cambios significativos (igual o mayor al 100%).

En resumen, existe un alto nivel de solapamiento en los Vβ TCR de mayor uso en los LTCD4 clásicos con los Treg FoxP3⁺ infiltrantes en el foco de la patología, indicativo del origen inducido (iTreg) de al menos una fracción de los Treg que se acumulan en el SNC en las criptococosis meníngeas.

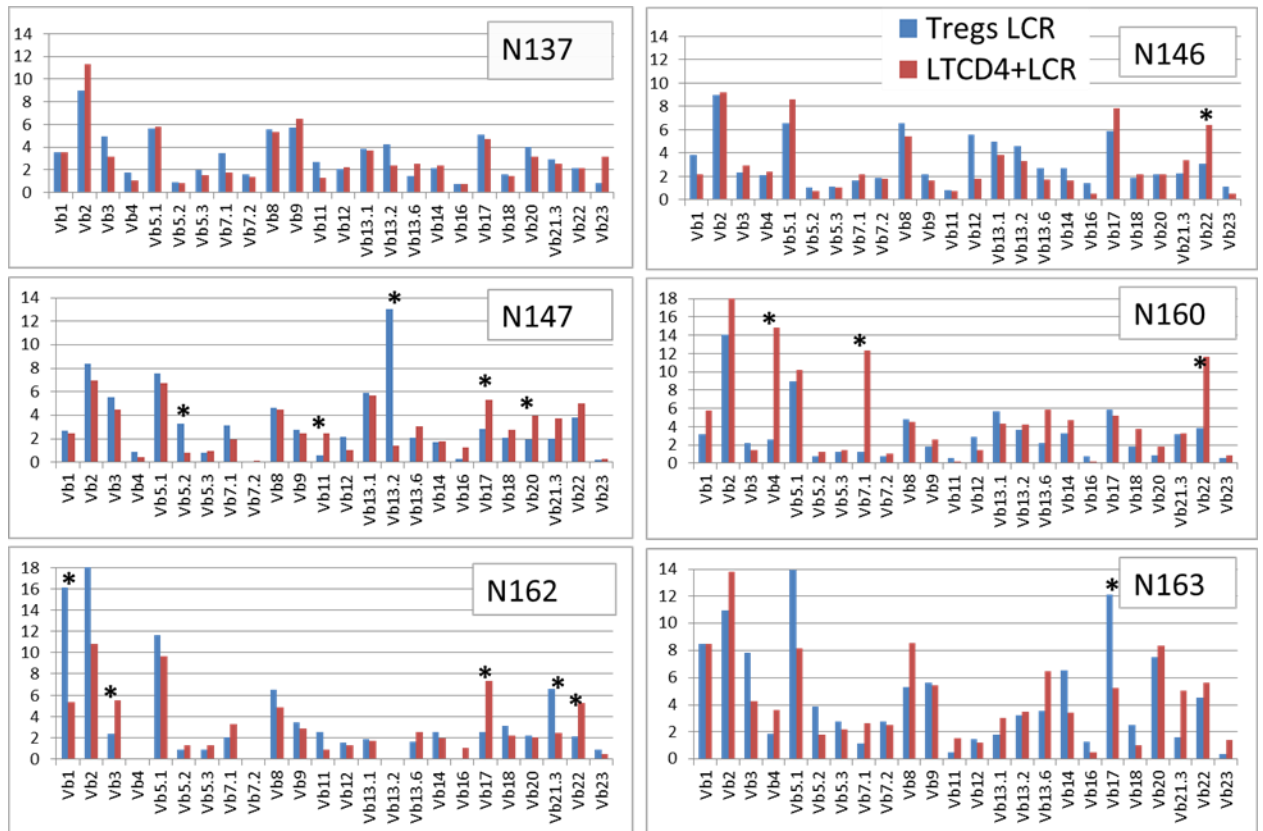


Figura 13. Clonograma del Repertorio Vβ en los Treg del LCR (barras azules) y LTCD4⁺ del LCR (barras rojas). Los asteriscos sobre cada barra indican los cambios significativos en la frecuencia de los Vβ entre las dos subpoblaciones.

El repertorio TCR Vβ de los Treg en LCR es similar al de la sangre periférica.

Los clonogramas Vβ TCR de los Treg del LCR y sangre fueron similares en los cuatro pacientes en que fue posible evaluar los Treg de sangre. Sin embargo, se observó una acumulación significativa a nivel neurológico de los Treg con los TCR Vβ4 (caso N146) y TCR Vβ22 (caso N160), que también son más frecuentemente usados por los LT CD4⁺ convencionales a nivel neurológico. (Figura 14).

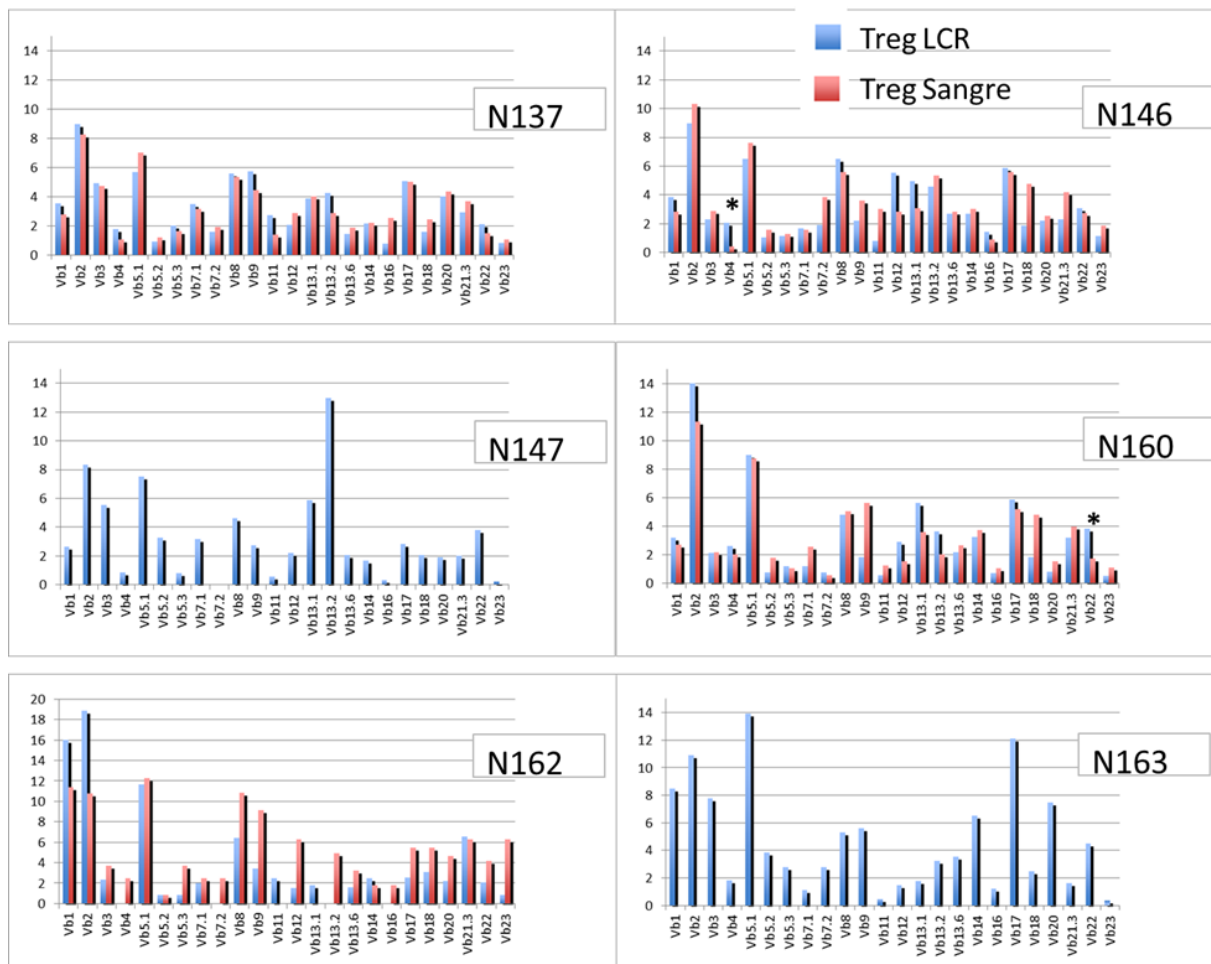


Figura 14: Clonograma de las familias Vβ del TCR en los Treg de LCR (barras azules) y Treg de Sangre (barras rojas) en casos de Criptococosis meníngea. En el eje “y” se expresan los porcentajes (del total de LT CD4⁺FoxP3⁺) de cada familia Vβ en el eje “x”.

En resumen, los resultados de este estudio muestran una similitud en la especificidad antigénica, basado en el repertorio Vβ del TCR, entre clones de los Treg y los LTCD4⁺ clásicos expandidos significativamente en frecuencia en el SNC, foco de la coinfección oportunista VIH-*Cryptococcus neoformans*. Por consiguiente, al menos una proporción de los Treg FoxP3⁺ acumulados en el SNC de las criptococosis meningéas (LCR o tejido cerebral) debe corresponder a iTreg originados de los LT CD4⁺ convencionales.

5.4 Discusión

El hallazgo más importante de este estudio fue el solapamiento en la especificidad antigénica (según repertorio V β del TCR) entre los Treg y LT CD4⁺ que se expandieron en el LCR de las criptococosis meníngeas. Estos resultados sugieren que al menos una fracción de los Treg FoxP3⁺ acumulados en el LCR (objetivo 1) o en el tejido cerebral (objetivo 2) en criptococosis meníngea asociada a SIDA corresponden a iTreg originados de los LT CD4⁺ efectores. Esta conclusión se soporta en que los LT CD4⁺ convencionales y los Treg a nivel neurológico tuvieron una expansión clonal preferencial (V β 4, V β 22, V β 5.1) que fue común en todos los pacientes, sugestivo de su especificidad al criptococo o al VIH. Sin embargo, también es posible, basados en la similitud de los clonogramas V β del TCR de los Treg del LCR y sangre, que haya una migración bystander de los nTreg desde sangre y órganos linfoides en VIH/SIDA al SNC. La hipótesis plausible con los resultados de este estudio es que la población de los Treg que infiltran el SNC en las criptococosis meníngeas es una población mixta que incluye los iTreg expandidos a partir de LTCD4⁺ específicos.

En la comparación entre la diversidad clonal del TCR V β de los Treg en LCR y la sangre, no se encontraron diferencias significativas. Estos resultados soportarían la hipótesis de una migración de nTreg junto con iTreg (diferenciados en tejido linfóide) al SNC, inducida por los cambios inflamatorios (quimioquinas) y concentración de antígeno, más que la generación intratecal de los Treg a partir de LTCD4⁺ convencionales. La activación de la respuesta inmune mediada por linfocitos específicos a las IO en el SNC (en este caso *C. neoformans*), debe

ocurrir también en los órganos linfoides periféricos por la incapacidad del tejido cerebral para activar inmunológicamente (o hacer priming) a los LT[242] y consistente con la anterior afirmación la mayoría de pacientes con criptococosis meníngea presenta simultáneamente infección diseminada por *C. neoformans* demostrada por antigenemia en sangre periférica[243, 244]. La similitud de los clonogramas de V β entre los Treg y los LTCD4 convencionales en el foco de la patología oportunista (específicamente la acumulación de algunas clonas en el LCR) sugiere que estas dos subpoblaciones comparten especificidad antigénica y los Treg acumulados en el LCR corresponderían a Treg inducidos (iTreg) en periferia que migran al SNC.

Se encontraron diferencias en la frecuencia de algunas clonas de las dos subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ (Treg y convencionales) de la misma especificidad antigénica en el LCR. Por ejemplo, los Treg con TCR V β 5.2 o TCR V β 13.2 estuvieron representados con mayor frecuencia que los LT CD4⁺ convencionales de la misma especificidad TCR en el caso N147 (Tabla 8 y Figura 13). De manera opuesta, en el mismo paciente los LT CD4⁺ con especificidad TCR V β 11 o TCR V β 20 se acumularon más que su contraparte de los Treg. El incremento de las clonas de los Treg sobre los LT CD4⁺ convencionales de su misma especificidad en el LCR podría explicarse por un reclutamiento específico de los Treg, desde el tejido linfoide o sangre, mediado a través de las quimioquinas en el tejido cerebral y sus receptores diferencialmente expresados por los Treg [63, 245-247]. Sin embargo, estas diferencias también podrían deberse a que estas clonas de Treg sobreexpresadas en el SNC correspondan a

nTreg reclutados al cerebro independientemente de antígeno. Los nTreg son el subtipo de estas células mas frecuentemente encontrados en la sangre y tejido linfóide de los individuos VIH⁺ [248][249]. De acuerdo a este raciocinio, la población de los Treg acumulados en el LCR probablemente sea una población mixta de iTreg y nTreg.

A la inversa, la mayor frecuencia de algunas clonas de LT CD4⁺ sobre los Treg de la misma especificidad (TCR) en el LCR podrían explicarse por la gran plasticidad inherente a los iTreg, revirtiendo su fenotipo regulador al de linfocitos T convencionales de acuerdo al microambiente de citocinas [167] en el SNC.

Algunas familias TCR V β de los LTCD4⁺ convencionales o Treg tuvieron una expresión preferencial en el LCR, foco de la infección oportunista, comparado con su contraparte en sangre o con los valores esperados en población sana, sugiriendo (V β 22, V β 4) que probablemente corresponden a clonas de LT específicas a antígenos de *Cryptococcus neoformans*. Sin embargo, podrían tratarse también de linfocitos específicos al VIH reactivado en el SNC. La infección por VIH induce cambios o “perturbaciones” en el repertorio TCR de los LTCD4⁺ que se relacionan con los diferentes estadios de la infección, así como con la carga viral plasmática[250]; estas alteraciones del repertorio se normalizan tras la reconstitución inmune y control de la replicación viral que sigue a la terapia antiretroviral (TARGA)[240], sugiriendo que corresponden a LT específicos al virus. En el caso particular del estudio, por tratarse de pacientes con la coinfección VIH y *C. neoformans* no es posible definir la especificidad antigénica de los clonos

de LT CD4 (FoxP3⁺ o FoxP3⁻) expandidos en el LCR, puesto que los dos antígenos (el del hongo y el VIH) se encuentran sobre-expresados, demostrado por una elevada carga viral VIH-1 y la carga antigénica de *C. neoformans*. Tampoco hay reportes en el repertorio TCR Vβ en personas con criptococosis, que permitan concluir que las clonas de linfocitos T CD4⁺ expandidas en el LCR en los casos evaluados por este estudio son específicas al *C. neoformans*.

La mayor evidencia disponible de respuestas oligoclonales o incluso monoclonales de LT se encuentran en los trastornos linfoproliferativos, en estos se evidencia una clonalidad focalizada o restringida a una determinada familia de Vβ en las células neoplásicas comparada con las no neoplásicas (14). El análisis del repertorio TCR Vβ ha mostrado ser un método sensible para la detección de la clonalidad de los LT en el LCR de individuos con neoplasias de linfocitos T [251, 252], este objetivo demuestra la viabilidad de la detección del repertorio de Vβ por FACS de las familias de Vβ de los LT en el LCR, sin embargo no se logró demostrar expansión oligoclonal de LT en el SNC, como se ha demostrado en el LCR de personas con esclerosis múltiple [253-256] que es el escenario inflamatorio en el SNC (no neoplásico) más ampliamente estudiado con respecto análisis del repertorio de Vβ. En este estudio las respuestas a *C. neoformans* en general (repertorio TCR Vβ) son muy similares entre el LCR y la sangre, con excepción de unas pocas clonas que se expandieron preferencialmente en el SNC y que probablemente corresponden a linfocitos específicos de CM.

Los resultados permiten especular que probablemente los Treg migren como parte de la respuesta inflamatoria al SNC y que su expansión ocurre a nivel periférico, lo

cual se traduce en la representación homogénea de las familias de V β en los dos compartimentos (LCR y sangre). Es necesario explorar si las características inflamatorias del LCR (quimioquinas por ejemplo) sean un factor fundamental en la mayor concentración de Treg en el LCR. Es importante resaltar que estos hallazgos corresponden específicamente a la infección por *Cryptococcus* y no es posible extrapolar los hallazgos al resto de infecciones oportunistas en VIH puesto que la respuesta inmune es patógeno específica y esta direccionada por factores como las mannoproteínas, la presencia una cápsula rica en polisacáridos y el reconocimiento por un tipo específico de receptores tipo Toll que contribuyen a la producción de ciertas citoquinas y quimioquinas implicadas en la migración de los Treg[257]. En este sentido, se ha propuesto que los iTreg son una población muy heterogénea de células que pueden suprimir distintas clases de respuestas inmunes (Th1 o Th2 o Th17) dependiendo de la instrucción del microambiente de citoquinas en el tejido, el cual es específico para cada patógeno [63, 167, 258]. Por ejemplo, si los Treg FoxP3⁺ son inducidos en el tejido a expresar el factor de transcripción T-bet pueden controlar las respuestas inmunes tipo Th1 ; pero si son inducidos a expresar GATA3 e IRF4 suprimirán las respuestas tipo Th2 o respuestas Th17 en el caso de los Treg FoxP3⁺ STAT3⁺. Por lo tanto, en el SNC diferentes tipos de Treg estarían regulando la respuesta inmune inducida a cada patógeno oportunista en el SNC.

Los hallazgos encontrados en este estudio presentan un sesgo de selección, que debe tenerse en cuenta para la interpretación de los datos. Se seleccionaron pacientes que presentaban infección oportunista por *Cryptococcus neoformans*,

por tratarse de la infección más frecuente en pacientes VIH/SIDA y por la facilidad de poder realizar múltiples punciones lumbares para extraer el LCR, sin afectar la vida del paciente ni el manejo integral; este procedimiento hace parte del tratamiento estándar al contribuir a la disminución de la presión intracraneal, que es una de las metas principales en el tratamiento[259] Además se seleccionaron los casos de CM con pleocitosis (conteo linfocitario en LCR >40 células por microlitro) por que era necesario contar con un gran número de células para los procedimientos de tinción celular y determinación del repertorio del TCR, los pacientes con pleocitosis de mayor magnitud, hacen parte de un grupo de las criptococosis meníngeas, los cuales se ha reportado que tienen mejor pronóstico y una mejor respuesta frente al tratamiento[260, 261]. Por lo tanto, estos resultados en el repertorio del TCR en los Treg acumulados en el SNC probablemente sólo sean extrapolables a un grupo de las criptococosis meníngeas asociadas a SIDA.

6. OBJETIVO ESPECÍFICO 4:

Evaluar la actividad supresora de los Treg, aislados del LCR en meningitis criptocócica, sobre la proliferación in vitro de los linfocitos T.

6.1 Raciocinio y Justificación

La demostración de la función inmunológica supresora es fundamental para una correcta identificación de los linfocitos T reguladores (Treg), debido a que la caracterización fenotípica basada en la expresión de marcadores celulares tiene limitaciones. Los Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) se identifican y clasifican de acuerdo a la expresión de marcadores fenotípicos como son la expresión de CD4, CD25, FoxP3, CTLA-4, CD39 y/o la ausencia de CD127. Sin embargo la limitante de esta caracterización es que estos marcadores inmunológicos no son exclusivos para los Treg[57] y su expresión está regulada por el microambiente inflamatorio en el que se encuentran. En las infecciones virales crónicas persistentes, como el VIH, los Treg activados pueden perder la expresión de CD25 (fenotipo $CD4^+CD25^-FoxP3^+$) conservando la función supresora[100, 102] pero además el 10% de los $LTCD4^+$ convencionales y el 1% de los $LTCD8^+$ de sangre periférica sin funciones inmureguladoras también expresan CD25 [262]. Por otra parte se ha encontrado que aunque el marcador FoxP3 es esencial en la generación y función de los Treg[263, 264], este podría ser inducido en circunstancias especiales en los $LTCD4^+$ convencionales, sin conferirle a estas células una función supresora[265]. En conclusión, aunque los Treg identificados en el SNC de los pacientes con IO asociadas a VIH/SIDA (Objetivos 1, 2 y 3), tienen un fenotipo de linfocito T

regulador basado en la expresión de los marcadores clásicos (CD25⁺FoxP3⁺), este no predice completamente la función inmunomoduladora que pueden tener *in vivo*. Los ensayos funcionales *in vitro*, (principalmente la inhibición de la linfoproliferación) han permitido establecer una correlación entre el fenotipo celular de los Treg y la función supresora de estas células, así como entender mejor los mecanismos de inmunoregulación de los Treg en diferentes modelos de enfermedad. Los linfocitos T reguladores utilizan diversos mecanismos para modular la respuesta inmune, estos incluyen la supresión a través de la molécula CTLA-4 mediante la cual transmite señales inhibitorias en las células dendríticas o los linfocitos T efectores; o a través de la secreción de TGF- β , IL-10 y otras citoquinas que pueden suprimir la activación de los LT efectores y modificar la función de las células presentadoras de antígeno[266]. El efecto regulador de los Treg en las células dendríticas incluye la inhibición de la maduración celular y la expresión de CD80/CD86 o la activación de la enzima 2-3, indolamin desoxigenasa (IDO). Otra molécula que contribuye en la función reguladora de los nTreg es CD83, la cual actúa en la supresión los LT dependiente de contacto. Por último, los Treg pueden inducir apoptosis de los linfocitos T efectores, en especial de los LTCD8⁺ citolíticos por la vía granzima/perforina de los nTreg a[267] y mediante Fas-FasL en los iTreg [268].

La capacidad supresora de los Treg en VIH/SIDA tradicionalmente se ha evaluado a través de la inhibición de la proliferación *in Vitro* de los linfocitos T convencionales de sangre periférica[269], en respuesta a estimulación policlonal o antígeno específica. La evaluación *in Vitro* de la actividad inhibitoria de los Treg

aislados del LCR sobre la proliferación de los LT sería por lo tanto una manera adecuada y novedosa de anticipar su capacidad inmureguladora *in Vivo*. La técnica de inhibición de la linfoproliferación mediada por los Treg, se basa en un ensayo en que se cocultivan Treg en concentraciones variables, con un número constante de linfocitos T respondedores depletados de los Treg. Los linfocitos respondedores son estimulados a proliferar con mitógenos (estimulo inespecíficos) o con los antígenos de interés (estimulo específico) para demostrar la actividad supresora de los Treg en el cocultivo sobre la proliferación linfocitaria. La demostración de la inhibición o regulación de los mecanismos efectores inmunológicos en los linfocitos T de pacientes con NeuroSIDA, por parte de los Treg provenientes del foco de la patología, contribuiría a definir mejor su papel en la neuroinmunopatogénesis de las IO asociadas al VIH/SIDA.

Los ensayos de evaluación de la proliferación de linfocitos T incluyen varias metodologías, las más comunes son la incorporación de timidina tritiada (3H-TdR)[270] y la dilución de del fluorocromógeno carboxi-fluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE) en las células respondedoras[271]. En la tinción con CFSE se evalúa (por FACS) la disminución de la fluorescencia con respecto a las células parentales, debida a proliferación y se puede calcular el número de generaciones celulares[272]. Cada una de las técnicas tiene sus ventajas y desventajas; por ejemplo los ensayos de incorporación de 3H-TdR tienen una alta sensibilidad para detectar proliferación celular con un bajo número de células (5×10^3), mientras las técnicas de citometría de flujo requieren 10 veces más células. La principal ventaja del marcaje con fluorocromos y su detección por

citometría de flujo es el análisis simultáneo de marcadores celulares, lo cual permite fenotipificar inmunológicamente las poblaciones celulares proliferantes[271]. Otras ventajas del uso de CFSE son la bioseguridad por ausencia de radiación y la posibilidad de recuperar las células proliferantes para ensayos adicionales (inmunohistoquímica convencional, microscopia confocal o ensayos funcionales)[273].

En este objetivo, se buscó determinar la actividad supresora de los Treg aislados del LCR en pacientes con criptococosis meníngea, mediante el ensayo de inhibición de la proliferación *in Vitro* de linfocitos T marcados con CFSE. Inicialmente se intentó expandir por cultivo los Treg purificados del LCR utilizando el estímulo de activación policlonal anti-CD3/CD28 (Dynabeads) e IL-2. La expansión en cultivo de los Treg de origen neurológico no fue exitosa, razón por la cual se utilizaron en los ensayos los Treg “*ex Vivo*” directamente aislados y purificados del LCR obtenido de pacientes con criptococosis meníngea. Los resultados obtenidos en este objetivo son novedosos porque demuestran que los Treg infiltrantes del SNC, tienen actividad inmunosupresora *in vitro*.

6.2 Metodología

Para evaluar la capacidad inmunomoduladora de los Treg infiltrantes del LCR en las IO en SIDA, se realizaron ensayos de inhibición de la linfoproliferación de linfocitos T *in vitro*. Con este propósito se cocultivaron linfocitos T respondedores infiltrantes del LCR o de sangre periférica marcados con CFSE en presencia de un estímulo proliferativo, con diferentes dos concentraciones de los Treg purificados del LCR del mismo paciente. El análisis de la linfoproliferación se realizó mediante FACS.

6.2.1. Pacientes y muestras:

Se incluyeron 7 pacientes VIH/SIDA con criptococosis meníngea que presentaban pleocitosis (linfocitos ≥ 40 linfocitos/ μ L en el citoquímico del LCR), para recuperar el mayor número posible de Treg. Se utilizaron todas las muestras de LCR de las punciones lumbares evacuantes de cada paciente que hacían parte del protocolo de manejo clínico rutinario. Solamente se utilizó el LCR de las PL en los 5 días siguientes al diagnóstico e inicio de tratamiento, por el efecto potencialmente tóxico del tratamiento prolongado con Anfotericina B en la viabilidad o capacidad proliferante de las células del LCR *in vitro*. El botón celular obtenido por centrifugación del LCR de cada paciente se criopreservó en nitrógeno líquido hasta su uso. Una muestra pareada de sangre periférica (anticoagulada con EDTA) fue obtenida en cada paciente simultáneamente con la primera punción lumbar de diagnóstico para aislar los PBMC.

Aislamiento y criopreservación de células derivadas del LCR: El LCR obtenido en cada PL fué centrifugado por 10 minutos a 1500 rpm a 4 °C. El botón celular se resuspendió y se lavó dos veces en 10mL de buffer RPMI para remover el exceso de proteínas u otras moléculas inhibidoras presentes en el LCR. Finalmente las células se criopreservaron, para su posterior descongelamiento y purificación, utilizando una modificación de la técnica convencional usada para preservar PBMC, en la cual, el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio de congelamiento conteniendo 90% de suero fetal bovino (SFB) y 10% de DMSO. La viabilidad de los LT CD4⁺ del LCR utilizando este protocolo de procesamiento y congelación fue evaluada previamente en una cinética de la viabilidad celular a temperatura ambiente con muestras de LCR de pacientes con meningitis linfocítica y neurosífilis, mediante microscopía de luz (tinción con azul de tripan) y citometría de flujo (tinción con 7AAD), obteniéndose una viabilidad superior al 95% en la hora y media posterior a la realización de la punción lumbar). Todas las muestras de este estudio fueron aisladas y criopreservadas entre 30 y 45 minutos posterior a su colección.

El descongelamiento de las células del LCR criopreservadas se realizó con técnica estándar utilizada para los PBMC. En resumen, los crioviales se llevaron al baño María (temperatura 37°), antes de su completo descongelamiento se adicionó 1 mL de suero fetal bovino frío, la suspensión celular se lavó 2 veces con 10 ml de RPMI por 10 minutos a 1500 rpm. El botón celular se resuspendió, se cuantificó en cámara de Neubauer y determinó la viabilidad por exclusión de azul de Tripano. El

porcentaje (%) de viabilidad de las células en la muestras del estudio después del descongelamiento fue mayor al 85% en todos los casos incluidos.

Aislamiento de mononucleares de sangre periférica: Los PBMC autólogos se purificaron a partir de 10mL de sangre completa anticoagulada con EDTA, mediante un gradiente de densidad Ficoll-Hystopaque (Sigma, USA) y posteriormente se criopreservaron utilizando medio RPMI 1640 conteniendo 50% de SFB y 10% de DMSO[274]. Solamente los PBMC del paciente N137 fueron utilizados para ensayos de cocultivo con Treg del LCR, debido a que en los otros pacientes no se logró purificar un número suficiente de los Treg del LCR para hacer el cocultivo con los PBMC.

6.2.2 Purificación de los Treg ($CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$) del LCR:

Las células del LCR se descongelaron y se reunieron las aisladas en varias punciones para la purificación de los Treg. La purificación de las Treg se realizó utilizando el estuche comercial “Kit II” para separación inmunomagnética de linfocitos T reguladores $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$ de Miltenyi Biotec (Cat. No.130-094-775), siguiendo las instrucciones del fabricante. El procedimiento tiene 2 pasos; primero se realiza selección negativa o enriquecimiento de los $LTCD4^+CD127^{dim/-}$ por depleción de las otras subpoblaciones celulares (CD8, CD19, CD123 y CD127), utilizando anticuerpos monoclonales. En el segundo paso del proceso a partir de la población de $LTCD4^+CD127^{dim/-}$ se purifican luego por selección positiva las células $CD25^+$ obteniéndose finalmente Linfocitos T reguladores de un perfil $CD4^+CD25^+CD127^{dim/-}$. El protocolo detallado optimizado

para células infiltrantes criopreservados del LCR se presenta en el ANEXO VI. La fracción de células depletadas de los Treg pero enriquecida para LT CD4⁺ CD127⁺ CD25⁻, LT CD8⁺, LB y otras células infiltrantes del LCR se usaron como los linfocitos respondedores del LCR y se marcaron con CFSE para los ensayos de inhibición de la proliferación con la fracción de los Treg.

El porcentaje de pureza de los Treg se determinó por citometría de flujo mediante tinción de la superficie celular con los respectivos anticuerpos monoclonales (anti-CD4, anti-CD25) e intracelularmente con un anticuerpo específico para FoxP3, de acuerdo a los procedimientos descritos en el objetivo 1, y se expresó como el porcentaje (%) de LT CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ del total de las células purificadas (CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-}).

6.2.3 Expansión *in vitro* de los linfocitos Treg purificados del LCR:

Se intentó la expansión *in vitro* de los Treg del LCR con el propósito de aumentar el número de estas células para los ensayos y para determinar el potencial proliferativo de los Treg acumulados en el foco de la patología oportunista (LCR), los Treg purificados a partir del LCR se expandieron en cultivos *in vitro* utilizando Dynabeads® Human Treg Expander (Invitrogen Cat. No.111.29D). El ensayo había sido usado anteriormente para purificar Treg de sangre periférica[275] y sangre de cordón[276].

Los Treg se purificaron a partir de un volumen de 20mL de LCR con pleocitosis (>40 linfocitos/ μ L), conteniendo aproximadamente 500.000 linfocitos, de los cuales se estimó que entre 10.000-20.000 serían los Treg (CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-}). El

procedimiento de cultivo usando el “Dynabeads® Human Treg Expander” consistió cultivar los Treg con perlas de magnéticas recubiertas con anticuerpos anti-CD3/CD28 y altas concentraciones de IL-2 humana recombinante (rIL-2), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante (Ver protocolo detallado en Anexo VII). Inicialmente se optimizó el protocolo y se determinaron las concentraciones óptimas de las perlas anti-CD3/CD28 (20µL) y rIL-2 (1000µg/mL) en una cinética de expansión in vitro de los Treg que habían sido purificados de sangre de un voluntario sano. Posteriormente se utilizó el protocolo optimizado en las condiciones del laboratorio, con los Treg purificados de las células criopreservadas del LCR obtenido a cuatro de los pacientes. Se determinó la capacidad proliferativa in vitro de los Treg, por conteo celular en cámara de Neubauer y la viabilidad por exclusión de azul de tripano, a diferentes tiempos posteriores al cultivo y estimulación con anti-CD3/CD28 e rIL-2 (cada 96 horas) durante varios días hasta el momento en que los Treg detuvieron su proliferación. Las células del LCR criopreservadas de los otros tres pacientes se reservaron para realizar cuatro ensayos funcionales de inhibición de la proliferación de LT una vez ajustado el protocolo de purificación y expansión de los Treg del LCR.

6.2.4 Ensayo de inhibición de la linfoproliferación (Cocultivo Treg-LCR/LT-LCR respondedores o Treg-LCR/PBMC respondedores:

Para examinar la función supresora inmunológica de los Treg del LCR durante criptococosis meníngea, la infección oportunistas más común en pacientes con SIDA en Colombia y con la mayor acumulación de los Treg en el LCR (Objetivo 1), se determinó su actividad supresora o inhibitoria sobre la proliferación de las

subpoblaciones de linfocitos T no reguladores (LTCD8⁺ y LTCD4⁺) infiltrantes del LCR, designados LT-LCR respondedores (en tres ensayos) o sobre los linfocitos T en PBMC autólogos, denominados LT-PBMC respondedores (un ensayo). Los Linfocitos T respondedores del LCR o sangre fueron las células del LCR o PBMC depletadas de Treg, que correspondían a las células obtenidas por selección positiva con los anticuerpos anti- CD8 anti-CD127 anti-CD123 anti-CD19, en el primer paso de purificación de los Treg por separación magnética, más la fracción de los LTCD4⁺CD25⁻ generadas por selección negativa en el segundo paso de ese mismo proceso de purificación.

Se establecieron cocultivos de poblaciones purificadas de Treg del LCR (Treg-LCR) con los linfocitos T respondedores autólogos (LT-LCR o LT-PBMC) marcados con carboxi-fluorescein diacetato succinimidil ester (CFSE). Se utilizaron anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 como el estímulo para activación inmunológica y división celular de los LT respondedores.

La tinción de los LT respondedores CFSE (Molecular Probes-Invitrogen) se realizó de acuerdo al protocolo recomendado por el Dr. Carlos Garcia-Santana (Staff Advanced Research Scientist Beckman Coulter, Inc). Este protocolo ofrece fundamentalmente dos ventajas con respecto al protocolo estándar del fabricante, en primer lugar necesita menor cantidad de lavados y usa volúmenes mas pequeños de muestra (menor pérdida de células) y en segundo lugar requiere una menor concentración y tiempo de exposición al CFSE (menor efecto citotóxico). Ver ANEXO VIII.

Para el ensayo de inhibición de la proliferación se utilizaron 100.000 células respondedoras marcadas con CFSE (LT-LCR o LT-PBMC) por cada pozo de cultivo, y se cocultivaron con dos concentraciones diferentes de los Treg (100.000 o 50.000 Treg) y un pozo control de proliferación sin los Treg. Se usaron entonces las siguientes razones de Treg-LCR/LT-respondedores: 1:1, 0.5:1, 0:1. El medio de cultivo consistió en RPMI 1640 completo (C-RPMI) conteniendo SFB al 5%, penicilina/estreptomicina 1%, piruvato 1%, aminoácidos esenciales 1%, glutamina 1%. El estímulo antigénico para la proliferación de los LT consistió en anticuerpos anti-CD3(10ng/mL)/anti-CD28(1µg/mL), los cocultivos estimulados se incubaron en una atmosfera de CO₂ al 5% a 37°C por 96 horas. Las células se tiñeron posterior al cultivo con anticuerpos para CD3, CD8 y CD4 en la superficie celular para análisis por FACS. La proliferación de los LTCD4⁺ o LTCD8⁺ se determinó en todos los pozos con y sin los Treg, por citometria de flujo mediante la disminución de la intensidad de la fluorescencia del CFSE en esas subpoblaciones de linfocitos después de la estimulación con CD3/CD28. El resultado se expresó como porcentaje de células que habían disminuido la intensidad media de fluorescencia (MFI) del CFSE con respecto al valor MFI del CFSE en las células control sin estimulación antigénica y sin los Treg. La inhibición de la proliferación mediada por los Treg se expresó como la disminución de los picos de proliferación y la diferencias en el MFI del CFSE en los LT (CD4⁺ o CD8⁺) comparados con los valores en linfocitos respondedores activados en ausencia de Treg (100% proliferación). Los sobrenadantes de los cultivos se criopreservaron para análisis posteriores (medición de citocinas).

6.2.5. Tinción y análisis por citometría de flujo (FACS) y presentación de datos:

La fenotipificación celular y determinación de la proliferación celular de los LT respondedores CFSE positivos (LCR o PBMC) se realizó por tinción y análisis FACS. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales específicos contra los antígenos de superficie marcados con fluorocromos, anti-CD4APC y anti-CD8PE (BD Biosciences). Las muestras triplemente marcadas con los fluorocromos (CFSE, APC y PE) fueron adquiridas en un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson). Las señales de Forward (FSC) y Side Scatter (SSC) se usaron para seleccionar la región de los linfocitos. Se adquirieron al menos 5×10^4 eventos por muestra. Los parámetros y puntos de corte se modificaron de acuerdo a la muestra sin teñir para los marcadores CD4 o CD8 pero marcada con CFSE.

Para la determinación de la proliferación celular y la inhibición de la misma se realizó la estrategia de análisis mostrada en la **Figura 15**, y resumida en los siguientes pasos:

- a. Selección de linfocitos viables de acuerdo a FSC y SSC (Dot Plot)
- b. Selección de linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ (Dot Plot) en la región de los linfocitos viables
- c. En cada subpoblación linfocitaria ($CD4^+$ o $CD8^+$) se evaluó la pérdida de la intensidad de la fluorescencia del CFSE en el canal FL1 (análisis de histograma). Se definió como proliferación la proporción de células (sumatoria de los picos de

proliferación) con una intensidad media de fluorescencia (MFI) del CFSE menor al MFI de las mismas células cultivadas sin activar (0% proliferación).

d. El análisis de la proliferación de los linfocitos CD4 requirió la exclusión de los Treg del análisis. Por lo cual no se tuvieron en cuenta los eventos con MFI menor a 10^1 (se excluyeron los eventos $CD4^+ CFSE^-$)

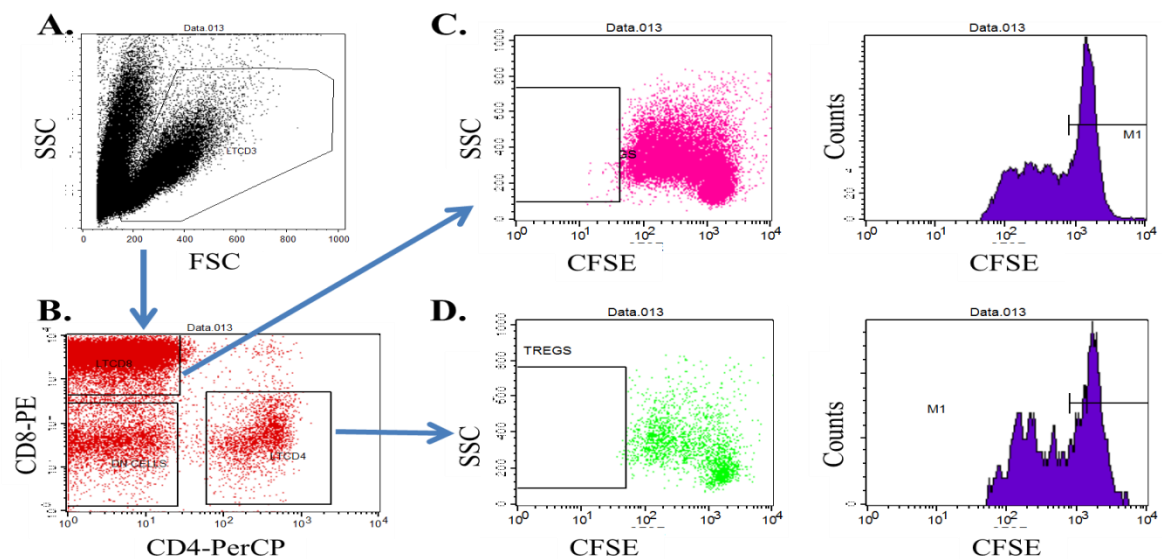


Figura 15 Estrategia de análisis por Citometría de flujo (FACS) del ensayo de linfoproliferación de los LT respondedores (depletados de Treg)-del LCR de un paciente representativo con criptococosis meníngea e infección VIH/SIDA. Selección de linfocitos viables en (A), identificación de los LT CD4 y LTCD8 en (B). Diagramas dot plot e histogramas de la positividad para CSFE de las poblaciones proliferantes de LT CD8 en (C) y LT CD4 en (D) después de 96 h de estimulación policlonal in vitro con rIL-2 y anti CD3/CD28. Las poblaciones con valores MFI en CSFE decrecientes (picos en los histogramas o dot plots) representan las poblaciones linfocitarias proliferantes.

La proliferación se normalizó asignando el 100% de proliferación a los linfocitos T respondedores estimulados con CD3/CD28 (LT-LCR o LT-PBMC) en ausencia de

los Treg. La proliferación de los LT en cocultivo con Treg se expresó como el porcentaje relativo de proliferación celular comparado con el control del 100% de proliferación de los mismos linfocitos.

6.2.6 Plan de análisis:

Los porcentajes de proliferación se analizaron de forma independiente para LTCD4⁺/LTCD8⁺ y los resultados se presentan en forma descriptiva para cada uno de los experimentos en las muestras de los siete casos estudiados. Los datos se presentan en gráficos de líneas en los que en la abscisa se muestra las relaciones Treg:LT respondedores o efectores y en las ordenadas el porcentaje de proliferación. También se muestran las gráficas de análisis por FACS en los que se obtuvieron los datos para trazar las curvas.

6.2.7 Consideraciones de bioseguridad:

La estimulación de PBMCs de individuos VIH⁺ con mitógenos inespecíficos como CD3/CD28, representaban un riesgo potencial de bioseguridad al inducir la replicación activa del VIH, razón por la cual se tuvo en cuenta todas las recomendaciones del instituto nacional de alergias y enfermedades infecciosas de Estados Unidos (NIAID) división SIDA (DAIDS 2004) para el manejo de cultivos de VIH y/o cultivos de PBMC de pacientes VIH⁺. Se sabe que entre el 5-10% de los LTCD4⁺ y monocitos de individuos con SIDA están infectados con VIH y se estima que en 96 horas de cultivo, se puede recuperar del sobrenadante aproximadamente 10^4 - 10^5 copias/mL de VIH, lo cual representa una concentración similar a la manipulada en muestras clínicas de pacientes infectados con VIH. De

acuerdo a las recomendaciones del NIAD no se requieren precauciones especiales de bioseguridad para el manejo de estos cultivos, adicionales a las utilizadas para el manejo de muestras clínicas (Bioseguridad nivel II)[277].

6.3 Resultados

Se avaluó la funcionalidad (capacidad de proliferación in vitro y actividad supresora de la proliferación policlonal de los LT) de los Treg acumulados en el LCR de siete pacientes con criptococosis meníngea y enfermedad por VIH/SIDA avanzada.

Previamente a los experimentos con las muestras del estudio, se realizó una cinética de la viabilidad de los LT en el LCR (**Figura 2**), lo cual permitió establecer el tiempo límite después de la PL para el aislamiento, fenotipificación por FACS y criopreservación de los LT con la mejor viabilidad posible. Después de una hora post PL, los linfocitos conservaban una excelente viabilidad del 98.6%, posteriormente fue disminuyendo al 95.2% a los 90 minutos y 87.4% a las 2 horas de la PL. Por lo tanto, se decidió procesar las muestras para aislar los linfocitos del LCR antes una hora después de la punción lumbar.

El total de células infiltrantes del LCR criopreservadas a partir de 20 a 30 mL de LCR de las PL evacuantes por paciente fue entre 800.000 y 2.200.000 células (**Tabla 9**). Concordante con el valor de la pleocitosis, también el valor absoluto de Treg purificado a partir de las células criopreservadas del LCR fue muy variable

(25.000 a 300.000), lo cual corresponde al 3-13% del total de linfocitos infiltrantes del LCR.

El método de purificación de los Treg que se optimizó, permitió obtener una pureza de 70% o más de linfocitos T CD4⁺CD25⁺CD127^{-dim}FoxP3⁺. **Figura 16.**

Tabla 9. Rendimiento de la purificación de Treg a partir del LCR y ensayos de expansión *in vitro* e inhibición de la proliferación con los Treg

	Células del LCR	Tregs Purificadas	Procedimiento Realizado	Resultado
N089	1.100.000	50.000	Expansión Tregs (Perlas CD3/CD28 + IL-2) x 4 días	Viabilidad celular al 4to día <20%; se desecha el cultivo
N090	1.400.000	25.000	Expansión Tregs (Perlas CD3/CD28 + IL-2) x 4 días	Contaminación (levaduras) al 4to día; se desecha el cultivo
N166	1.000.000	30.000	Expansión Tregs (Perlas CD3/CD28 + IL-2) x 28 días	Expansión al doble c/4días hasta el día 16 luego caída en la viabilidad a <50%
N167	1.500.000	50.000	Expansión Tregs (Perlas CD3/CD28 + IL-2) x 32 días	Expansión al doble c/4días hasta el día 24 luego caída en la viabilidad a <50%
N137 (Ensayo #1)	2.200.000	300.000	Cocultivo con linfocitos efectores LCR 0.5:1 y 1:1	Inhibición de la linfoproliferación de LTCD4+ y LTCD8+ del LCR
N137 (Ensayo #2)	1.700.000	175.000	Cocultivo con linfocitos PBMC 0.5:1 y 1:1	Inhibición de la linfoproliferación de LTCD4+ y LTCD8+ de sangre periférica
N138	1.400.000	150.000	Cocultivo con linfocitos efectores LCR 0.5:1 y 1:1	Inhibición de la linfoproliferación de LTCD4+ y LTCD8+ del LCR
N142	1.200.000	150.000	Cocultivo con linfocitos efectores LCR 0.5:1 y 1:1	Inhibición de la linfoproliferación de LTCD4+ y LTCD8+ del LCR

Las muestras con mayor número esperado de los Treg (N137, N138 y N142) por tener mayor frecuencia de Treg en el LCR y mayor número de células preservadas fueron reservadas para ensayos de inhibición de la linfoproliferación *ex vivo* sin previa expansión *in vitro* de los Treg de LCR, en caso de que los Treg del LCR

tuvieran una limitada capacidad proliferativa *in vitro*, como efectivamente ocurrió en los cuatro ensayos de expansión.

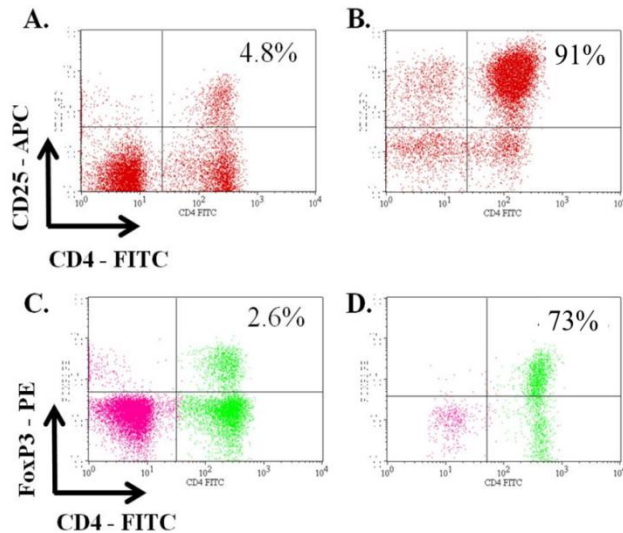


Figura 16: Purificación de Tregs del LCR de pacientes con criptococosis meníngea. Se muestran la expresión de CD25 y FoxP3 en el total linfocitos antes (A y C) y después de las dos etapas de purificación (B y D) con perlas magnéticas (Treg isolation Kit)

Los Treg del LCR de pacientes con criptococosis meníngea muestran una limitada capacidad de proliferar *in vitro* en respuesta a IL-2 y coestimulación CD3/CD28.

Los Treg purificados a partir de las células infiltrantes del LCR de cuatro pacientes se utilizaron para los ensayos de expansión *in vitro*. Sólo los Treg purificados del LCR de los pacientes N166 y N167 presentaron escasa proliferación en cultivo, con una expansión aproximada de solamente 1.5 veces cada 4 días (recuento por microscopia de luz), hasta el día 16 y 24 respectivamente, cuando la viabilidad celular se redujo al 50% en ambos cultivos. La magnitud de expansión al compararlos con el control de los linfocitos Treg de sangre periférica de un sujeto sano fue muy baja **Figura 17**. Los Treg del caso N089 fallaron en expandirse tras 4 días en cultivo con IL-2 y estimulación del CD3/CD28.

En resumen, se obtuvo una expansión de Treg correspondiente a máximo 5 veces el numero inicial cultivado de Treg después de aproximadamente 20 días en cultivo (N166; 5,2 veces vs. Control 17,3 veces al día 16 y N167; 4,8 veces vs.

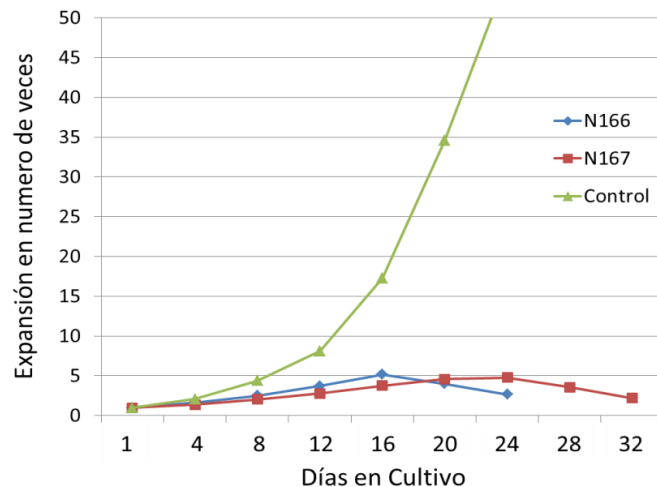


Figura 17. Pobre expansión *in vitro* de los Treg purificados del LCR. Proliferación *in vitro* de Tregs del LCR de pacientes VIH/SIDA con criptococosis meníngea (N166 azul y N167 rojo) comparados con la proliferación de los Treg de sangre periférica de un control sano (verde).

Control 55,3 veces el día 24), seguido de una rápida reducción en la viabilidad y detención de la proliferación. Debido a la limitada capacidad de expansión de los Treg purificados del LCR en casos de criptococosis meníngea y ante la posibilidad de que el cultivo *in vitro* de alguna manera modificara la capacidad inmunoreguladora exhibida por estos linfocitos *in Vivo*, los ensayos funcionales de inhibición de la proliferación de las subpoblaciones de LT se realizaron con los Treg purificados *ex vivo* (sin expansión *in vitro*), a partir de las células infiltrantes del LCR que habían sido criopreservadas.

Los linfocitos Treg aislados *ex Vivo* del LCR inhiben la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ estimulados con anti CD3/CD28 *in vitro*.

Se realizaron cocultivos de Treg-LCR con LT respondedores (LT-LCR o en uno de los casos también LT-PBMC) marcados con CFSE y estimulados a proliferar con

rIL-2 y antiCD3/CD28. Se seleccionaron las muestras con mayor número esperado de Treg (N137, N138 y N142) de acuerdo al alto número de células criopreservadas, la alta proporción de Treg y buena viabilidad al momento del congelamiento de la muestra **Tabla 9**.

Los LT respondedores del LCR (LT-LCR) activados con rIL-2 y anti CD3/CD28 por 96 horas, en ausencia de Treg, demostraron una adecuada capacidad proliferativa según la disminución de la intensidad de fluorescencia (MFI) para el CFSE (Ejemplo representativo en **Figura 15**), en el diagrama dot plot y los picos con decreciente valor MFI para CFSE en el histograma. El porcentaje de linfocitos MFI CFSE inferiores al control sin activar se consideró como el 100% de proliferación, no se observó diferencias en la capacidad proliferativa entre los LT CD4⁺ y LT CD8⁺.

Los Treg del LCR inhibieron la proliferación policlonal de los linfocitos T infiltrantes del LCR homólogos, de una manera dosis dependiente. En la **Figura 18** se presentan los análisis FACS de inhibición de la proliferación de los LTCD4⁺ por Treg del LCR. El control de LT respondedores sin activar y sin Treg se utilizó para determinar la expresión basal de CFSE (0% de proliferación). En los histograma de los experimentos de inhibición con los Treg-LCR, se observa que en todos los casos hubo disminución en los picos de proliferación (picos con decreciente valor MFI en CFSE) y aumentó del porcentaje de células con altos valores MFI en CFSE, comparado con su respectivo control del 100% de proliferación y este efecto fué dependiente de las dosis de Treg-LCR usadas. Los Treg de LCR

tuvieron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los LTCD4⁺ (**Figura 18 y Figura 19 panel A**), y los LTCD8⁺ (**Figura 19 panel B**), pero el efecto supresor fue más prominente sobre la proliferación de los LT CD8⁺ del LCR.

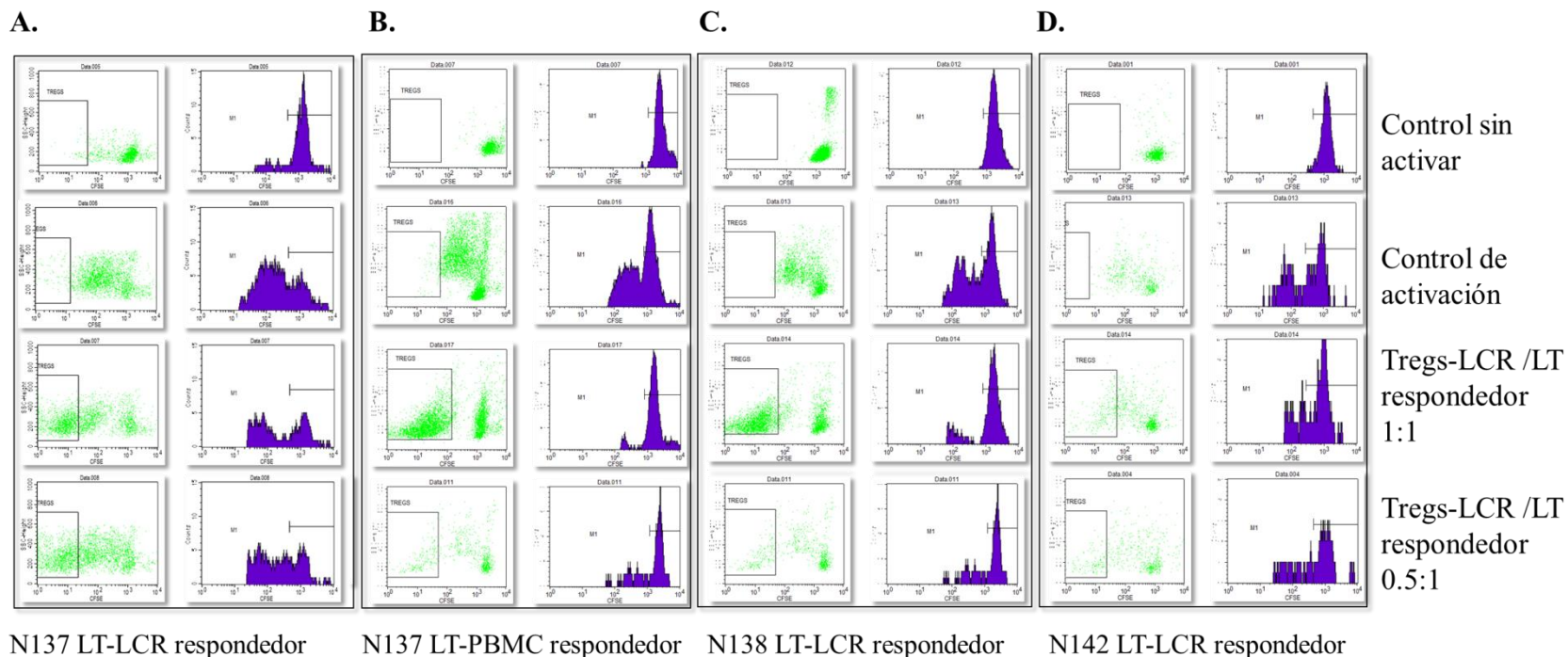
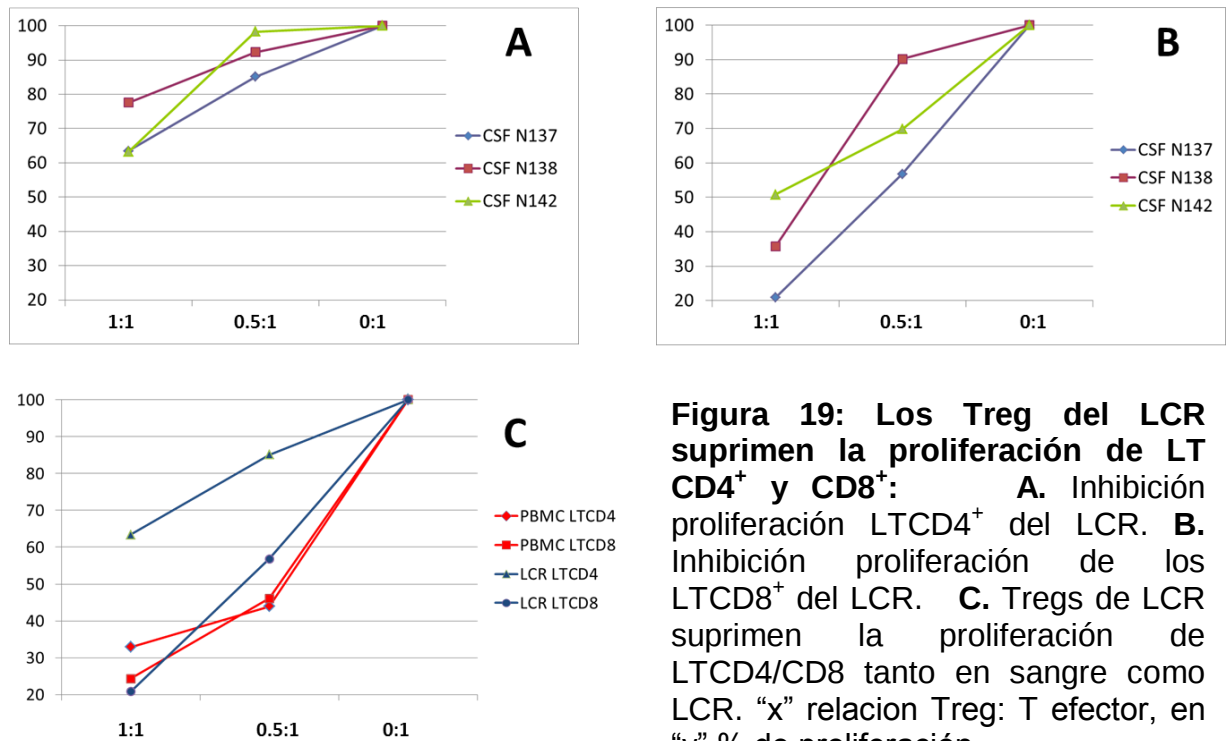


Figura 18: Inhibición de la proliferación de los LTCD4⁺ (células respondedoras) del LCR en A, C, D y de sangre periférica en B mediado por los Treg del LCR autólogos. Graficas de histograma de los controles sin activar o expresión basal de CFSE en los LT respondedores (0% proliferación) en los paneles superiores; Control activado de los LT respondedores sin Treg-LCR (100% proliferación). Proliferación de los LT-respondedores en cocultivo con Treg-LCR a dos razones Treg-LCR /LT respondedores (1:1 o 0.5:1)

En un ensayo adicional se comparó el potencial supresor de los Treg del LCR (N137) sobre las células efectoras en la de sangre periférica autóloga (**Figura 19 panel C**) y se encontró un nivel similar de inhibición de la proliferación de las dos subpoblaciones de los linfocitos T $CD4^+$ o $CD8^+$ de sangre periférica y LCR.



6.4 Discusión

El resultado más relevante de este estudio es que los Tregs purificados *ex vivo* del LCR de casos de criptococosis meníngea son capaces de suprimir la proliferación de los LT convencionales activados *in vitro* y el efecto supresor fué más pronunciado sobre los LT CD8⁺ del foco de la infección oportunista. Esta habilidad es congruente con nuestra hipótesis de que los Treg en el SNC pueden inmunomodular la función de los LTCD8⁺ durante el curso de la criptococosis meníngea. El efecto regulador de los Treg del LCR en la linfoproliferación fué mayor en los LTCD8⁺ T del SNC (60-80%) comparado con los LTCD4⁺ (20%-40%). Por el contrario, las dos subpoblaciones de LT de la sangre fueron igualmente inhibidas por los Tregs aislados del LCR en el único caso evaluado en la sangre.

En el modelo de ensayo de inhibición de la linfoproliferación, (cocultivo Treg con LT respondedores), estimulados con antiCD3/CD28 los mecanismos dependientes de contacto directo o los relacionados con secreción de citoquinas son tal vez los mas relevantes, mas si se tiene en cuenta que en este modelo la proliferación celular es independiente de presentación antigénica (la activación ocurre directamente sobre el TCR). Posiblemente los Tregs compiten por la IL-2 con los LT respondedores y la “secuestran”, disminuyendo la cantidad de IL-2 disponible en el cultivo, impidiendo que se de esta señal necesaria para la activación del linfocito T.[278, 279]. Los Tregs además pueden suprimir la respuesta inmune a

través de la molécula CTLA-4 que transmite señales inhibitorias a los linfocitos T efectores[280]; o a través de la secreción de TGF- β o IL-10 que pueden suprimir la activación de los LT efectores [266]. También podrían suprimir la proliferación al aumentar la expresión de CD83, (dependiente de contacto) o inducir la apoptosis de los linfocitos T efectores, en especial de los LTCD8⁺ citolíticos por la vía granzima/perforina de los nTregs a[267] y/o mediante Fas-FasL en los iTregs [268].

Los LTCD8⁺ presentan una mayor inhibición de la proliferación por los Tregs del LCR que los LTCD4⁺. Una posibilidad es que los LTCD8⁺ son más susceptibles a la depleción de la IL-2 en el medio, debido a que producen cantidades menores de IL-2 con acción autocrina[278, [281, 282] ,que los LTCD4⁺.

La supresión inmune de los LTCD8⁺ a nivel del SNC por los Tregs podría tener un impacto en la patogenéesis de las CM. Los Treg podrían prevenir inmunopatología mediada por los LTCD8⁺, que son los principales linfocitos infiltrantes en las CM y se asocian con protección.[124, 162]. Sin embargo, una consecuencia adversa de la supresión de los LTCD8⁺ en criptocosis meníngea podría ser una supresión generalizada a nivel del SNC, debido a la naturaleza inespecífica de la supresión de los Treg, lo cual podría explicar el aumento de la replicación viral del VIH en el SNC asociada a las CM (Figura 4A, Objetivo 1; referencia [25]) y la persistencia del *Cryptococcus neoformans* en la mayoría de los individuos sobrevivientes a las CM [283], o asociarse con mayor mortalidad. La presencia en el SNC de los Treg con actividad supresora potente para los LT CD8⁺ en estos individuos con SIDA

podría explicar el riesgo incrementado de estos pacientes para desarrollar tumores o ciertas malignidades, especialmente las asociadas con virus como el linfoma primario asociado a EBV o LMP asociada a JCV [284], en los cuales las respuestas inmunes mediadas a través de los LT CD8 son muy importantes

La demostración de la inhibición o regulación de respuestas inmunes antígeno-específicas en los linfocitos T de pacientes con NeuroSIDA, por parte de los Tregs provenientes del foco de la patología, puede tener un impacto en el futuro diseño de terapias inmunomoduladoras basadas en estrategias de bloqueo o estimulación de estas células, tal como se ha demostrado en algunos modelos tumorales murinos[285, 286] o en cáncer en humanos, en los cuales bloquear los Tregs usando anticuerpos específicos anti-CD25 mejora las respuestas inmunes anti-tumorales sin el riesgo de que aparezcan enfermedades autoinmunes[287, 288]. La inhibición de la proliferación de los LTCD4⁺ y LTCD8⁺ por los Tregs del LCR demostrada en este estudio, posiblemente tiene un efecto deletéreo sobre la respuesta inmune específica anti *Cryptococcica*, se ha demostrado que los PBMC depletados de Tregs tienen mejores respuestas inmunes e inhiben la proliferación de las levaduras [124]

Otro resultado interesante es que los Treg del LCR de pacientes VIH/SIDA con criptococosis meníngea tienen una limitada capacidad de proliferar *in Vitro* al compararlos con los Treg de Sangre periférica de sujetos sanos. La expansión con CD3/CD28 + IL-2 de los Tregs del LCR logró una expansión máxima de 5 veces el

número inicial de Tregs seguido de una rápida reducción en la viabilidad y detención de la proliferación, comparado con una expansión de 32 veces el número inicial en Treg de sangre periférica del control sano (20 días en cultivo). Este defecto en la proliferación puede relacionarse con la limitada respuesta a la estimulación con IL-2 que ha sido ampliamente demostrada en los linfocitos de pacientes VIH/SIDA[289, 290] . Los LT CD4+ en personas con VIH/SIDA sin terapia antiretroviral, con cargas virales de VIH-1 elevadas, son incapaces de activar funcionalmente STAT5 en respuesta a la estimulación con IL-2. Además presentan una alteración en la activación de la JAK3, independiente de la expresión del IL-2R o la capacidad para unirse a la IL-2[291], tras de 6 meses de tratamiento con terapia antiretroviral, se restaura la activación de la vía de señalización JAK3 inducida por IL-2.[291]. La IL-2 producida por Linfocitos T convencionales puede inducir la pérdida en la expresión de FOXP3 en los Treg naturales y en los linfocitos T convencionales es capaz de favorecer la inducción del marcador Foxp3[290]. Estudios tanto in vivo como in vitro han demostrado que la IL-2 es esencial para la supervivencia y función de los nTregs pero no para su generación en el timo[292], además se ha visto que esta citoquina favorece la expansión de poblaciones celulares (CD4+CD25+FOXP3+) ya que en situaciones en las cuales hay neutralización de la IL-2, se produce una disminución en el número de Tregs concomitantemente con el desarrollo de patologías autoinmunes[292]. La menor sensibilidad a la IL-2 de los Tregs de pacientes VIH+ podría explicar inhabilidad para proliferar a altas concentraciones de rIL-2 en los cultivos en este estudio.

La IL-2 es un factor fundamental para la proliferación de linfocitos T, además de que se considera un factor de crecimiento crítico para los nTregs, ya que estas células no son capaces de producir su propia IL-2, lo que sugiere que la señalización de la IL-2 en los Tregs parece ser muy importante en el mantenimiento de su función en la periferia [291]. Sin embargo, se ha considerado que la acción de esta citoquina, requiere de la acción conjunta de citoquinas como la IL-7 e IL-15 para favorecer la expansión celular, que son citoquinas que inducen la expansión antígeno-independiente, además de que ayudan a mantener la viabilidad celular[293].

Contrastate con la necesidad de IL-2 para la proliferación y supervivencia de los nTreg, los iTreg diferenciados en la periferia por antígeno tienen una limitada capacidad de proliferar en respuesta a IL-2. Esta baja respuesta proliferativa se ha atribuido a un bloqueo en el ciclo celular cuando los LT CD4+ convencionales son diferenciados a iTreg en presencia de señales fuertes a través del TCR, una baja coestimulación con CD28 en presencia de TGFb e IL-2[63, 246]. La resistencia de los Treg del LCR en este estudio a las altas concentraciones de IL-2 y alta coestimulación con CD28 de los cultivos probablemente son un reflejo de su fenotipo regulador inducido (iTreg) a partir de LT CD4+. Por el contrario los Treg en sangre del control sano, que en su mayoría se espera sean nTreg proliferaron dramáticamente con los mismos estímulos. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en el objetivo 3, los cuales también sugieren que al menos una proporción de los linfocitos T CD4+ FoxP3+ en el LCR de las CM son iTregs que comparten especificidad antigénica con los LTCD4+ convencionales infiltrantes.

Otra razón que podría explicar la baja eficiencia de proliferación *in vitro* de los Treg podría ser su incrementada susceptibilidad a sufrir apoptosis. Tanto los LTCD4 como los LTCD8 de personas con VIH-1 muestran una mayor susceptibilidad de sufrir apoptosis en cultivo, en parte por la reactivación de la replicación del VIH *in vitro*[294] que se traduce en activación persistente, llevando a muerte celular y por ende depleción del número de LT CD4+ [295]. En nuestro estudio no examinamos si los Treg del LCR están infectadas con VIH, y desconocemos si este protocolo de expansión de Tregs es capaz de inducir la replicación del virus que se encuentre latente en esos Tregs.

El potencial proliferante de los Tregs de pacientes VIH+ es desconocido. Las perlas magnéticas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28, proporcionan una fuerte señal de proliferación al unirse al receptor de células T (TCR) y al CD28 garantizando la amplificación de la primera señal por medio de la señal coestimuladora, induciendo la proliferación celular[293]. Esta metodología ha probado ser efectiva para la expansión de linfocitos T convencionales y Tregs de personas sanas sin embargo estos mismos protocolos no han sido tan eficientes en la expansión de LT convencionales de personas con patologías como tumores malignos[296] o con enfermedades virales crónicas como Hepatitis B[297] y VIH[298]. Recientemente fue publicado el único artículo, en el cual se han expandido *in vitro* Tregs purificados de sangre periférica de pacientes VIH+[299], sin embargo no se mencionan las características inmunes o virológicas de estos pacientes, ni su estadio clínico, lo cual hace muy difícil la interpretación de los hallazgos. En los ensayos clínico con pacientes VIH+ recibiendo TARGA con

supresión virológica completa que recibieron esquemas de IL-2 humana recombinante subcutánea (con el objetivo de expandir los LTCD4+), la población celular que se expande son predominantemente Tregs CD4+CD25+FOXP3+ (tanto naive como efectores)[292], esto indica que los Tregs tienen un gran potencial proliferante *in vivo*. Considero necesario a futuro evaluar el potencial proliferante *in vitro* de los Tregs en VIH con y sin terapia antiretroviral y en los diferentes estadios de la enfermedad con el fin de determinar el efecto de estas condiciones en la proliferación de los Tregs.

La Anfotericina B tiene un efecto toxico sobre los linfocitos T, que se traduce en disminución de su capacidad proliferativa. La Anfotericina B el tráfico de los linfocitos T a través de su acción sobre receptores específicos como CXCR4 y el receptor M1, que interactúan con las caveolinas, produciendo redistribución de estos receptores sobre la membrana celular generado por una alteración en el reciclaje de estos receptores por los endosomas[300]. En conjunto se ha observado que además de una perforación de la membrana plasmática, la Anfotericina suprime el gradiente de pH entre los compartimientos citosolicos como los endosomas y las vacuolas, como resultado de esto, los iones escapan de los endosomas /vacuolas al citosol, lo que resulta en abolición del gradiente de pH, que puede conducir a la inhibición o bloqueo de algunas vías de tráfico celular indispensable, generando un desequilibrio que conduce a la muerte celular. Todos los pacientes evaluados estaban recibiendo tratamiento con Anfotericina B deoxicolato, un antifúngico sistémico potente que atraviesa la barrera hematoencefálica que busca inhibir el crecimiento de las levaduras, pero también

afecta los linfocitos del paciente, se desconoce si las concentraciones fisiológicas de este medicamento en el LCR son suficientes para inhibir la proliferación de los LT convencionales o de los Tregs. En estudios posteriores se podría evaluar si las concentraciones de anfotericina en el LCR se correlacionan con el potencial proliferante de las células en el LCR.

En resumen, las causas de la inability de los Treg del LCR para proliferar en respuesta a estimulación de su TCR en presencia de altas concentraciones de IL-2, se pueden explicar por su fenotipo de iTreg (resistencia a anti CD3/CD28 y altas concentraciones de rhIL-2) o por defectos en su función o por toxicidad del tratamiento antimicótico. Sin embargo se necesitan estudios adicionales, con más pacientes, modificando las condiciones del cultivo, como por ejemplo, adicionar antiretrovirales (AZT), cambiando las técnicas de purificación de los Tregs (por ejemplo selección por formación de inmunorosetas[301] entre otras para concluir definitivamente que los Tregs del LCR de pacientes con Neurosida por IO no proliferan.

Otros estudios ha reportado que los Tregs pueden inhibir efectivamente la respuesta inmune en el SNC, evitando los síntomas y la progresión de enfermedades como la esclerosis múltiple (EM). Los Tregs de los pacientes que se encuentran en remisión de la EM han sido extraídos, purificados y expandidos in vitro, demostrando una potencia y pureza similar a la de los donantes sanos [302]. En nuestro conocimiento este es el segundo estudio en el cual se utilizan Treg purificados del LCR en ensayos de inhibición de linfoproliferación. Se ha

demostrado que los Tregs del LCR de pacientes con meningitis carcinomatosa o linfomatosa inhiben la proliferación de LT efectores (células respondedoras) de sangre periférica[303] No se encontró en la literatura otros estudios donde se demostre la inhibición de la linfoproliferación de LT infiltrantes del LCR. Este hallazgo nos permite afirmar los Treg del LCR conservan un potencial supresor de la respuesta inmune intacto, aun cuando su capacidad proliferativa este disminuida, además aporta una estrategia novedosa para demostrar la capacidad funcional de los Tregs en los compartimentos donde ocurre la patología, que ha sido uno de los campos mas contradictorios y difíciles de evaluar en la funcionalidad de los Tregs.

Otra forma de evaluar los efectos reguladores de los Tregs es medir su efecto sobre la producción de citoquinas (IFN- γ TNF- α) por los LT, tal como se ha demostrado en los Tregs aislados de sangre de individuos VIH+, los cuales son capaces de inhibir la producción de citoquinas específicas a antígenos de citomegalovirus y VIH[304], o en los Tregs de pacientes con hepatitis crónica, con similar capacidad para regular la producción de IFN- γ [305]. Inicialmente en este estudio se había planteado evaluar el número de células productoras de TNF- α , IL-2 y/o IFN- γ con el objetivo de determinar si los Tregs son capaces de inhibir las respuestas polifuncionales de los LTCD4+, que han demostrado ser parte fundamental en la respuesta protectora al VIH[306, 307]. Sin embargo estas respuestas no pudieron ser evaluadas por no contar con el numero suficiente de tregs del LCR, dado el fracaso en su expansión. A futuro nos hemos planteado evaluar si los Tregs del LCR inhiben las respuestas antígeno específicas, la

propuesta es determinar por citometría de flujo las células productoras de TNF- α , IL-2 y/o IFN- γ , así como evaluar el perfil de citoquinas en el sobrenadante del cocultivo (Treg:Trespondedoras) en respuesta a antígenos purificados de VIH (proteínas recombinantes de Gag, Pol y Env) y/o la respuesta a antígenos proteicos de *C. neoformans*, (por ejemplo homogenizado de levaduras inactivado por calentamiento de la cepa acapsular cap67).

Finalmente considero que es necesaria una fenotipificación más extensa de los Treg infiltrantes del LCR puesto que esta permitiría establecer si la causa de su pobre proliferación es un estado de gran activación que se pudiera traducir en muerte por sobreactivación. Desde hace un par de años se habla que los pacientes VIH tienen una gran cantidad de subpoblaciones de Tregs, esta clasificación está basada en la expresión de marcadores de superficie como CD45RA (naive), HLA-DR (efectoras) e intracelulares como Ki67 que permite subdividir los Tregs naturales en: Tregs vírgenes (FOXP3^{LOW}, CD45RA+) o Tregs efectoras (CD25^{high}, CD45⁻, FOXP3^{high}, CD127^{low}), que a su vez se pueden diferenciar en Tregs efectoras terminales caracterizados por la expresión de HLA-DR[308] y Ki67[309]. Con respecto a los Tregs inducidos tenemos que para su caracterización no existen marcadores fenotípicos que predigan por completo se podría tener en cuenta la expresión de CD25 y CD127, que aparentemente la cual se ve favorecida en los Tregs inducidos[114], sin embargo no existen marcadores fenotípicos que predigan por completo el origen natural o inducible de los Tregs, por lo cual es necesario estrategias adicionales que permitan identificar el origen de esta población celular.

7. CONCLUSIONES GENERALES

7.1 Los linfocitos T reguladores ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$) se acumulan en el SNC de los individuos con neuroSIDA por Infecciones oportunistas. La magnitud de la infiltración por los Treg en el LCR se correlacionó positivamente con un microambiente inflamatorio caracterizado por carga viral del VIH elevada, elevación de la interleuquina-10 (IL-10), una citoquina anti-inflamatoria asociada a la actividad inmunomoduladora de los Treg, pero también con una abundante infiltración de LT $CD8^+$ y elevada expresión de otras citoquinas/quimiocinas. Esta la primera vez que se describen los Treg en el LCR de individuos infectados por VIH/SIDA.

7.2 Los Treg en el SNC tienen un proceso activo de migración y localización específica a los sitios de infección oportunista reflejando el proceso patogénico. En el caso de las meningitis (criptococosis y tuberculosis meníngea) la mayor concentración de los Treg está en las meninges y el espacio perivascular y en el caso de la toxoplasmosis cerebral en el tejido activamente inflamado a nivel parenquimatoso. La magnitud de la infiltración de los Treg en el tejido se correlaciona directamente con la magnitud del infiltrado linfocitario en los sitios de la inflamación. Es la primera vez que se describe la presencia de los Treg en el proceso neuropatológico de las IO asociadas a SIDA.

7.3 Los Treg infiltrantes del LCR en criptococosis meníngea comparten especificidad antigénica con los LTCD4⁺ convencionales y son incapaces de proliferar *in vitro* en respuesta a la inducción por altas concentraciones de hrIL-2 y alta coestimulación, lo cual nos permite concluir que al menos una porción importante de estos linfocitos en el SNC son iTreg inducidos por los antígenos de la coinfección VIH/IO.

7.4 Los Treg en el LCR en las CM retienen *ex vivo* su capacidad supresora de la proliferación mediada a través del TCR de los LT convencionales del foco de la infección, con un efecto inhibitorio más pronunciado sobre los LT CD8, linfocitos críticos para el control y protección en CM y el VIH.

8. PERSPECTIVAS

Estudios que determinen el efecto de los Treg del SNC en la sobrevida y evolución de las IO son necesarios para establecer el impacto de los resultados de este estudio. A futuro planteamos desarrollar un estudio que evalúe la mortalidad de los pacientes con NeuroSIDA por IO en el cual se pueda establecer si la frecuencia o número absoluto de Treg en el LCR se correlaciona con un desenlace fatal o si por el contrario los Treg tienen un efecto protector. En este estudio además se buscará determinar el efecto del tratamiento específico contra las IO en la infiltración de los Treg como una forma de demostrar si son dependientes de la presencia de los antígenos del patógeno oportunista, así como el efecto del tratamiento oportunista sobre la replicación viral del VIH-1 (carga viral en el LCR) sobre la pleocitosis y la frecuencia de Treg.

Una más extensa caracterización fenotípica de los Treg infiltrantes del LCR evaluando la expresión de los nuevos marcadores en los Treg se podría realizar en los nuevos estudios. El estudio propuesto evaluará marcadores de proliferación en los Treg del LCR como son Ki-67, así como la expresión de marcadores de los Treg naturales recientemente descritos como son Helios y Neuropilin- 1 (Nrp-1), como una estrategia para identificar su origen inducible o natural. Estas estrategias contribuirían a una caracterización mas completa de las poblaciones de Treg en neuroSIDA con miras a establecer si estas patologías podrían ser susceptibles de inducción, por ejemplo con la administración de citoquinas como IL-2, o supresión con la administración de anticuerpos anti-CD25 (Daclizumab).

Futuras estrategias para determinar el origen (natural o inducible) y la especificidad de los LTCD4⁺ y Treg en pacientes con criptococosis meníngeas, pudieran ser:

La evaluación del repertorio TCR V β pre y post tratamiento de la IO del SNC con el objetivo de determinar si las perturbaciones de los TCR V β desaparecen con la eliminación del patógeno

Expansión in vitro de linfocitos de pacientes inducida por antígenos de *C. neoformans* con el objetivo de identificar si se produce la expansión de un grupo específico de familias V β en respuesta al patógeno.

Determinar en un ensayo de trans migración, si el LCR y las sustancias químico atrayentes en el (quimioquinas) induce una migración específica de Treg mas que LT convencionales, como ha sido demostrado en carcinomatosis meníngea[303]

Estrategias futuras podrían evaluar la respuesta in vitro a la estimulación con antígenos específicos del VIH o el patógeno oportunista. Además se podría evaluar la inhibición de las respuestas inmunes efectoras antígeno específicas (producción de citoquinas), utilizando un ensayo de ELISPOT para IFN- γ la detección de respuestas polifuncionales en los LT efectores (TNF- α , IL-2 y/o IFN- γ) y la detección de de citoquinas en el sobrenadante de cultivo.

Bibliografía

1. UNGASS, *Seguimiento de la Declaración de compromiso sobre el VIH/Sida. Informe mundial de avances en la lucha contra el Sida. Colombia 2012*. Ministerio de Salud y Protección Social Republica de Colombia., 2012.
2. WHO, UNAIDS, and UNICEF, *Global HIV/AIDS response: epidemic update and health sector progress towards universal access: progress report 2011*. UNAIDS, 2011: p. 1-229.
3. UNGASS, *Seguimiento de la Declaración de compromiso sobre el VIH/sida*. Ministerio de la Protección Social Republica de Colombia., 2010.
4. Herrera-Martinez, A.D., Y. Herrera-Martinez, and A.M. Pineda, *Neurological opportunistic diseases in HIV infected patients in a western hospital of Venezuela, 2007 -2009*. Braz J Infect Dis, 2010. **14**(6): p. 643-4.
5. Soares, V.Y., et al., *Clinical and epidemiological analysis of patients with HIV/AIDS admitted to a reference hospital in the northeast region of Brazil*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2008. **50**(6): p. 327-32.
6. Spudich, S.S. and B.M. Ances, *Central nervous system complications of HIV infection*. Top Antivir Med, 2011. **19**(2): p. 48-57.
7. Joseph, J., et al., *Global NeuroAIDS roundtable*. J Neurovirol, 2013. **19**(1): p. 1-9.
8. Tan, D.H. and S.L. Walmsley, *Management of persons infected with human immunodeficiency virus requiring admission to the intensive care unit*. Crit Care Clin, 2013. **29**(3): p. 603-20.
9. Liu, J., et al., *Neuromodulatory activities of CD4+CD25+ regulatory T cells in a murine model of HIV-1-associated neurodegeneration*. J Immunol, 2009. **182**(6): p. 3855-65.
10. Minagar, A., et al., *NeuroAIDS: characteristics and diagnosis of the neurological complications of AIDS*. Mol Diagn Ther, 2008. **12**(1): p. 25-43.
11. Power, C., et al., *NeuroAIDS: an evolving epidemic*. Can J Neurol Sci, 2009. **36**(3): p. 285-95.
12. Maschke, M., et al., *Incidence and prevalence of neurological disorders associated with HIV since the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART)*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000. **69**(3): p. 376-80.
13. d'Arminio Monforte, A., et al., *Changing incidence of central nervous system diseases in the EuroSIDA cohort*. Ann Neurol, 2004. **55**(3): p. 320-8.
14. Kaplan, J.E., et al., *Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy*. Clin Infect Dis, 2000. **30 Suppl 1**: p. S5-14.
15. LIZARAZO, J., et al., *Infecciones oportunistas del sistema nervioso central en pacientes con VIH atendidos en el Hospital Universitario Erasmo Meoz, Cúcuta, 1995-2005*. Infectio, 2006. **10**: p. 226-231.
16. Mamidi, A., J.A. DeSimone, and R.J. Pomerantz, *Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection*. J Neurovirol, 2002. **8**(3): p. 158-67.

17. Luft, B.J. and J.S. Remington, *Toxoplasmic encephalitis in AIDS*. Clin Infect Dis, 1992. **15**(2): p. 211-22.
18. Majumder, S., S.K. Mandal, and D. Bandyopadhyay, *Prognostic markers in AIDS-related cryptococcal meningitis*. J Assoc Physicians India, 2011. **59**: p. 152-4.
19. Saag, M.S., et al., *Practice guidelines for the management of cryptococcal disease*. Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis, 2000. **30**(4): p. 710-8.
20. Vidal, J.E., et al., *Cerebral tuberculomas in AIDS patients: a forgotten diagnosis?* Arq Neuropsiquiatr, 2004. **62**(3B): p. 793-6.
21. Marra, C.M., *Neurosyphilis*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2004. **4**(6): p. 435-40.
22. Levine, A.J., et al., *An exploratory study of long-term neurocognitive outcomes following recovery from opportunistic brain infections in HIV+ adults*. J Clin Exp Neuropsychol, 2008: p. 1-8.
23. Luchsinger, V., A. Luzoro, and M.J. Martinez, *[High seroprevalence of cytomegalovirus, herpes simplex type 1 virus and Epstein Barr virus infection among human immunodeficiency virus-infected adults]*. Rev Med Chil, 2010. **138**(7): p. 809-14.
24. Christo, P.P., et al., *Factors influencing cerebrospinal fluid and plasma HIV-1 RNA detection rate in patients with and without opportunistic neurological disease during the HAART era*. BMC Infect Dis, 2007. **7**: p. 147.
25. Christo, P.P., et al., *HIV-1 RNA levels in cerebrospinal fluid and plasma and their correlation with opportunistic neurological diseases in a Brazilian AIDS reference hospital*. Arq Neuropsiquiatr, 2005. **63**(4): p. 907-13.
26. Mahadevan, A., et al., *Characterization of human immunodeficiency virus (HIV)-infected cells in infiltrates associated with CNS opportunistic infections in patients with HIV clade C infection*. J Neuropathol Exp Neurol, 2007. **66**(9): p. 799-808.
27. Collins, K.R., et al., *Impact of tuberculosis on HIV-1 replication, diversity, and disease progression*. AIDS Rev, 2002. **4**(3): p. 165-76.
28. Liuzzi, G.M., et al., *Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases*. J Neurovirol, 2000. **6**(2): p. 156-63.
29. Monteiro de Almeida, S., et al., *Dynamics of monocyte chemoattractant protein type one (MCP-1) and HIV viral load in human cerebrospinal fluid and plasma*. J Neuroimmunol, 2005. **169**(1-2): p. 144-52.
30. Brew, B.J. and S.L. Letendre, *Biomarkers of HIV related central nervous system disease*. Int Rev Psychiatry, 2008. **20**(1): p. 73-88.
31. Pereira-Chiocola, V.L., J.E. Vidal, and C. Su, *Toxoplasma gondii infection and cerebral toxoplasmosis in HIV-infected patients*. Future Microbiol, 2009. **4**(10): p. 1363-79.
32. Suzuki, Y., *Immunopathogenesis of cerebral toxoplasmosis*. J Infect Dis, 2002. **186 Suppl 2**: p. S234-40.
33. Siddiqui, A.A., et al., *IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1746-50.
34. Schop, J., *Protective immunity against cryptococcus neoformans infection*. McGill J Med, 2007. **10**(1): p. 35-43.

35. Maffei, C.M., et al., *Cytokine and inducible nitric oxide synthase mRNA expression during experimental murine cryptococcal meningoencephalitis*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2338-49.
36. Xiao, B.G. and H. Link, *Immune regulation within the central nervous system*. J Neurol Sci, 1998. **157**(1): p. 1-12.
37. Lipovsky, M.M., et al., *Cryptococcal glucuronoxylomannan delays translocation of leukocytes across the blood-brain barrier in an animal model of acute bacterial meningitis*. J Neuroimmunol, 2000. **111**(1-2): p. 10-4.
38. Monari, C., F. Bistoni, and A. Vecchiarelli, *Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(4): p. 537-42.
39. Galea, I., I. Bechmann, and V.H. Perry, *What is immune privilege (not)?* Trends Immunol, 2007. **28**(1): p. 12-8.
40. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: history and perspective*. Methods Mol Biol, 2011. **707**: p. 3-17.
41. Shevach, E.M., *Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-45.
42. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 733-58.
43. Bennett, C.L., et al., *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 20-1.
44. Wildin, R.S., et al., *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 18-20.
45. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
46. Zhou, Z., et al., *FOXP3 and its partners: structural and biochemical insights into the regulation of FOXP3 activity*. Immunol Res, 2008. **42**(1-3): p. 19-28.
47. Zhou, Z., et al., *Structural aspects of the FOXP3 regulatory complex as an immunopharmacological target*. Int Immunopharmacol, 2009. **9**(5): p. 518-20.
48. Li, B. and M.I. Greene, *FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex*. Cell Cycle, 2007. **6**(12): p. 1432-6.
49. Xiao, Y., et al., *Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(5): p. 583-91.
50. Allan, S.E., et al., *The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs*. J Clin Invest, 2005. **115**(11): p. 3276-84.
51. Ono, M., et al., *Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1*. Nature, 2007. **446**(7136): p. 685-9.
52. Ohkura, N., M. Hamaguchi, and S. Sakaguchi, *FOXP3+ regulatory T cells: control of FOXP3 expression by pharmacological agents*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(3): p. 158-66.
53. Hori, S., et al., *Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 8213-8.

54. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ regulatory T cell subsets*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(4): p. 471-8.
55. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
56. Sakaguchi, S., *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance*. Cell, 2000. **101**(5): p. 455-8.
57. Schmetterer, K.G., A. Neunkirchner, and W.F. Pickl, *Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation*. FASEB J, 2012. **26**(6): p. 2253-76.
58. O'Garra, A., et al., *IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1372-8.
59. Belkaid, Y., *Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(11): p. 875-88.
60. Lin, X., et al., *Advances in distinguishing natural from induced Foxp3(+) regulatory T cells*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(2): p. 116-23.
61. Pot, C., L. Apetoh, and V.K. Kuchroo, *Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity*. Semin Immunol, 2011. **23**(3): p. 202-8.
62. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?* International Immunology, 2009. **21**(10): p. 1105-1111.
63. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 531-64.
64. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. **6**(11): p. 1142-51.
65. Pandiyan, P., et al., *CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.
66. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
67. Borsellino, G., et al., *Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1225-32.
68. Kobie, J.J., et al., *T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6780-6.
69. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1303-10.
70. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1257-65.
71. Huang, C.T., et al., *Role of LAG-3 in regulatory T cells*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 503-13.
72. Liang, B., et al., *Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5916-26.

73. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 48-57.
74. Sarris, M., et al., *Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition*. Immunity, 2008. **28**(3): p. 402-13.
75. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
76. Sharma, M.D., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6102-11.
77. Yang, H., et al., *Hyperexpression of Foxp3 and IDO during acute rejection of islet allografts*. Transplantation, 2007. **83**(12): p. 1643-7.
78. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 546-58.
79. Jin, Y.X., et al., *TGF-beta1 inhibits protracted-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis by activating dendritic cells*. J Autoimmun, 2000. **14**(3): p. 213-20.
80. Askenasy, N., A. Kaminitz, and S. Yarkoni, *Mechanisms of T regulatory cell function*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(5): p. 370-5.
81. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
82. Gondek, D.C., et al., *Transplantation survival is maintained by granzyme B+ regulatory cells and adaptive regulatory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(7): p. 4752-60.
83. Cao, X., et al., *Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance*. Immunity, 2007. **27**(4): p. 635-46.
84. Rowe, J.H., J.M. Ertelt, and S.S. Way, *Foxp3(+) regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection*. Immunology, 2012. **136**(1): p. 1-10.
85. Long, S.A. and J.H. Buckner, *CD4+FOXP3+ T regulatory cells in human autoimmunity: more than a numbers game*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2061-6.
86. Burrell, B.E., et al., *Regulatory T cell induction, migration, and function in transplantation*. J Immunol, 2012. **189**(10): p. 4705-11.
87. Agrawal, R., J.A. Wisniewski, and J.A. Woodfolk, *The role of regulatory T cells in atopic dermatitis*. Curr Probl Dermatol, 2011. **41**: p. 112-24.
88. von Boehmer, H. and C. Daniel, *Therapeutic opportunities for manipulating T(Reg) cells in autoimmunity and cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2013. **12**(1): p. 51-63.
89. Okamoto, A., et al., *Regulatory T-cell-associated cytokines in systemic lupus erythematosus*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 463412.
90. Nistala, K. and L.R. Wedderburn, *Th17 and regulatory T cells: rebalancing pro- and anti-inflammatory forces in autoimmune arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2009. **48**(6): p. 602-6.
91. Schwarz, A., et al., *Fine-tuning of regulatory T cell function: the role of calcium signals and naive regulatory T cells for regulatory T cell deficiency in multiple sclerosis*. J Immunol, 2013. **190**(10): p. 4965-70.

92. Beyer, M. and J.L. Schultze, *Regulatory T cells: major players in the tumor microenvironment*. Curr Pharm Des, 2009. **15**(16): p. 1879-92.
93. Belkaid, Y. and K. Tarbell, *Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*)*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 551-89.
94. Campanelli, A.P., et al., *CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells*. J Infect Dis, 2006. **193**(9): p. 1313-22.
95. Rodriguez-Pinto, D., et al., *Regulatory T cells in the pathogenesis and healing of chronic human dermal leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) species*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(4): p. e1627.
96. Qin, X.J., et al., *CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in tuberculous pleural effusion*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(7): p. 581-6.
97. Mahan, C.S., et al., *CD4+ CD25(high) Foxp3+ regulatory T cells downregulate human Vdelta2+ T-lymphocyte function triggered by anti-CD3 or phosphoantigen*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 398-407.
98. Molling, J.W., et al., *CD4(+)CD25hi regulatory T-cell frequency correlates with persistence of human papillomavirus type 16 and T helper cell responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia*. Int J Cancer, 2007. **121**(8): p. 1749-55.
99. Weiss, L., et al., *Human immunodeficiency virus-driven expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells, which suppress HIV-specific CD4 T-cell responses in HIV-infected patients*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3249-56.
100. Andersson, J., et al., *The prevalence of regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients*. J Immunol, 2005. **174**(6): p. 3143-7.
101. Kinter, A., et al., *Suppression of HIV-specific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3390-5.
102. Nilsson, J., et al., *HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS*. Blood, 2006. **108**(12): p. 3808-17.
103. Rueda, C.M., et al., *HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30307.
104. Seddiki, N. and A.D. Kelleher, *Regulatory T cells in HIV Infection: Who's Suppressing What?* Curr Infect Dis Rep, 2008. **10**(3): p. 252-258.
105. Chevalier, M.F. and L. Weiss, *The split personality of regulatory T cells in HIV infection*. Blood, 2013. **121**(1): p. 29-37.
106. Saison, J., et al., *CD4+CD25+CD127- assessment as a surrogate phenotype for FOXP3+ regulatory T cells in HIV-1 infected viremic and aviremic subjects*. Cytometry B Clin Cytom, 2013. **84**(1): p. 50-4.
107. Moreno-Fernandez, M.E., et al., *Human regulatory T cells are targets for human immunodeficiency Virus (HIV) infection, and their susceptibility differs depending on the HIV type 1 strain*. J Virol, 2009. **83**(24): p. 12925-33.
108. Oswald-Richter, K., et al., *HIV infection of naturally occurring and genetically reprogrammed human regulatory T-cells*. PLoS Biol, 2004. **2**(7): p. E198.

109. Pion, M., et al., *HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene*. AIDS, 2013. **27**(13): p. 2019-29.
110. Abdel-Hameed, E.A., et al., *Epigenetic modification of FOXP3 in patients with chronic HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013.
111. Imamichi, H. and H.C. Lane, *Regulatory T cells in HIV-1 infection: the good, the bad, and the ugly*. J Infect Dis, 2012. **205**(10): p. 1479-82.
112. Angin, M., et al., *Preserved function of regulatory T cells in chronic HIV-1 infection despite decreased numbers in blood and tissue*. J Infect Dis, 2012. **205**(10): p. 1495-500.
113. Mendez-Lagares, G., et al., *Severe immune dysregulation affects CD4(+)CD25(hi)FoxP3(+) regulatory T cells in HIV-infected patients with low-level CD4 T-cell repopulation despite suppressive highly active antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 2012. **205**(10): p. 1501-9.
114. Simonetta, F. and C. Bourgeois, *CD4+FOXP3+ Regulatory T-Cell Subsets in Human Immunodeficiency Virus Infection*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 215.
115. Simonetta, F., et al., *Early and long-lasting alteration of effector CD45RA(-)Foxp3(high) regulatory T-cell homeostasis during HIV infection*. J Infect Dis, 2012. **205**(10): p. 1510-9.
116. Kinter, A.L., et al., *CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+) and CD8(+) HIV-specific T cell immune responses in vitro and are associated with favorable clinical markers of disease status*. J Exp Med, 2004. **200**(3): p. 331-43.
117. Eggena, M.P., et al., *Depletion of regulatory T cells in HIV infection is associated with immune activation*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4407-14.
118. Jiao, Y., et al., *The decrease of regulatory T cells correlates with excessive activation and apoptosis of CD8+ T cells in HIV-1-infected typical progressors, but not in long-term non-progressors*. Immunology, 2009. **128**(1 Suppl): p. e366-75.
119. Chase, A.J., et al., *Preservation of FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected elite suppressors correlates with low CD4+ T-cell activation*. J Virol, 2008. **82**(17): p. 8307-15.
120. Baker, C.A., et al., *Peripheral CD4 loss of regulatory T cells is associated with persistent viraemia in chronic HIV infection*. Clin Exp Immunol, 2007. **147**(3): p. 533-9.
121. Gaardbo, J.C., et al., *Regulatory T cells in human immunodeficiency virus-infected patients are elevated and independent of immunological and virological status, as well as initiation of highly active anti-retroviral therapy*. Clin Exp Immunol, 2008. **154**(1): p. 80-6.
122. Epplé, H.J., et al., *Mucosal but not peripheral FOXP3+ regulatory T cells are highly increased in untreated HIV infection and normalize after suppressive HAART*. Blood, 2006. **108**(9): p. 3072-8.
123. Chen, W., S. Perruche, and J. Li, *CD4+CD25+ T regulatory cells and TGF-beta in mucosal immune system: the good and the bad*. Curr Med Chem, 2007. **14**(21): p. 2245-9.
124. Siddiqui, A.A., R.J. Shattock, and T.S. Harrison, *Role of capsule and interleukin-6 in long-term immune control of Cryptococcus neoformans infection by specifically*

- activated human peripheral blood mononuclear cells. Infect Immun*, 2006. **74**(9): p. 5302-10.
125. Feger, U., et al., *Increased frequency of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients. Clin Exp Immunol*, 2007. **147**(3): p. 412-8.
 126. Hamzaoui, K., H. Houman, and A. Hamzaoui, *Regulatory T cells in cerebrospinal fluid from Behcet's disease with neurological manifestations. J Neuroimmunol*, 2007. **187**(1-2): p. 201-4.
 127. Grauer, O.M., et al., *CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. Int J Cancer*, 2007. **121**(1): p. 95-105.
 128. Saresella, M., et al., *CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺PD1⁻ regulatory T cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. FASEB J*, 2008. **22**(10): p. 3500-8.
 129. Venken, K., et al., *Compromised CD4⁺ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. Immunology*, 2008. **123**(1): p. 79-89.
 130. Sugihara, A.Q., C.E. Rolle, and M.S. Lesniak, *Regulatory T cells actively infiltrate metastatic brain tumors. Int J Oncol*, 2009. **34**(6): p. 1533-40.
 131. Heimberger, A.B., et al., *Incidence and prognostic impact of FoxP3⁺ regulatory T cells in human gliomas. Clin Cancer Res*, 2008. **14**(16): p. 5166-72.
 132. Wagner, A., et al., *Immunoregulation by Toxoplasma gondii infection prevents allergic immune responses in mice. Int J Parasitol*, 2009. **39**(4): p. 465-72.
 133. Rahman, S., et al., *Compartmentalization of immune responses in human tuberculosis: few CD8⁺ effector T cells but elevated levels of FoxP3⁺ regulatory t cells in the granulomatous lesions. Am J Pathol*, 2009. **174**(6): p. 2211-24.
 134. Sharma, P.K., et al., *FoxP3⁺ regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med*, 2009. **179**(11): p. 1061-70.
 135. Chen, X., et al., *CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) regulatory T cells suppress Mycobacterium tuberculosis immunity in patients with active disease. Clin Immunol*, 2007. **123**(1): p. 50-9.
 136. Mantilla, J.C. and N. Cardenas, *Hallazgos neuropatológicos de la infección por VIH-SIDA: estudio de autopsias en el Hospital Universitario de Santander, Bucaramanga, Colombia. Vol. 40. 2010.*
 137. Everall, I., et al., *Cliniconeuropathologic correlates of human immunodeficiency virus in the era of antiretroviral therapy. J Neurovirol*, 2009. **15**(5-6): p. 360-70.
 138. Tan, I.L., et al., *HIV-associated opportunistic infections of the CNS. Lancet Neurol*, 2012. **11**(7): p. 605-17.
 139. Sarciron, M.E. and A. Gherardi, *Cytokines involved in Toxoplasmic encephalitis. Scand J Immunol*, 2000. **52**(6): p. 534-43.
 140. Carruthers, V.B. and Y. Suzuki, *Effects of Toxoplasma gondii infection on the brain. Schizophr Bull*, 2007. **33**(3): p. 745-51.

141. Wozniak, K.L., et al., *Insights into the mechanisms of protective immunity against Cryptococcus neoformans infection using a mouse model of pulmonary cryptococcosis*. PLoS One, 2009. **4**(9): p. e6854.
142. Margolick, J.B., et al., *Flow cytometric quantitation of T cell phenotypes in cerebrospinal fluid and peripheral blood of homosexual men with and without antibodies to human immunodeficiency virus, type I*. J Neuroimmunol, 1988. **20**(1): p. 73-81.
143. McArthur, J.C., et al., *Identification of mononuclear cells in CSF of patients with HIV infection*. Neurology, 1989. **39**(1): p. 66-70.
144. George, E.L., et al., *Predictors of mortality in patients with meningeal tuberculosis*. Neurol India, 2012. **60**(1): p. 18-22.
145. Chavarria, A. and G. Cardenas, *Neuronal influence behind the central nervous system regulation of the immune cells*. Front Integr Neurosci, 2013. **7**: p. 64.
146. Weidner, J.M. and A. Barragan, *Tightly regulated migratory subversion of immune cells promotes the dissemination of Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 2013.
147. Patel, V.B., et al., *Cerebrospinal T-cell responses aid in the diagnosis of tuberculous meningitis in a human immunodeficiency virus- and tuberculosis-endemic population*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(4): p. 569-77.
148. Christo, P.P., et al., *Cerebrospinal fluid levels of chemokines in HIV infected patients with and without opportunistic infection of the central nervous system*. J Neurol Sci, 2009. **287**(1-2): p. 79-83.
149. Jarvis, J.N., et al., *Adjunctive interferon-gamma immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial*. AIDS, 2012. **26**(9): p. 1105-13.
150. Shaw, J.M., et al., *Increased frequency of regulatory T cells accompanies increased immune activation in rectal mucosae of HIV-positive noncontrollers*. J Virol, 2011. **85**(21): p. 11422-34.
151. Seddiki, N., et al., *Proliferation of weakly suppressive regulatory CD4⁺ T cells is associated with over-active CD4⁺ T-cell responses in HIV-positive patients with mycobacterial immune restoration disease*. Eur J Immunol, 2009. **39**(2): p. 391-403.
152. Huang, X., et al., *Functional proteomic analysis for regulatory T cell surveillance of the HIV-1-infected macrophage*. J Proteome Res, 2010. **9**(12): p. 6759-73.
153. Chen, S., et al., *Regulatory T cell in stroke: a new paradigm for immune regulation*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 689827.
154. Neuenburg, J.K., et al., *HIV-producing T cells in cerebrospinal fluid*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2004. **37**(2): p. 1237-44.
155. Neuenburg, J.K., et al., *T-cell activation and memory phenotypes in cerebrospinal fluid during HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2005. **39**(1): p. 16-22.
156. *From the Centers for Disease Control and Prevention. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults*. JAMA, 1993. **269**(6): p. 729-30.
157. Janssen, R.S., et al., *Human immunodeficiency virus (HIV) infection and the nervous system: report from the American Academy of Neurology AIDS Task Force*. Neurology, 1989. **39**(1): p. 119-22.
158. Sattui, S., et al., *Cryopreservation modulates the detection of regulatory T cell markers*. Cytometry B Clin Cytom, 2012. **82**(1): p. 54-8.

159. Bhadra, R. and I.A. Khan, *Redefining chronic toxoplasmosis--a T cell exhaustion perspective*. PLoS Pathog, 2012. **8**(10): p. e1002903.
160. Green, A.M., R. Difazio, and J.L. Flynn, *IFN-gamma from CD4 T cells is essential for host survival and enhances CD8 T cell function during Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 2013. **190**(1): p. 270-7.
161. Hansen, S.G., et al., *Evasion of CD8⁺ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus*. Science, 2010. **328**(5974): p. 102-6.
162. Ma, L.L., et al., *CD8 T cell-mediated killing of Cryptococcus neoformans requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5787-95.
163. Spudich, S., et al., *Treatment benefit on cerebrospinal fluid HIV-1 levels in the setting of systemic virological suppression and failure*. J Infect Dis, 2006. **194**(12): p. 1686-96.
164. Marshall, D.W., et al., *Spectrum of cerebrospinal fluid findings in various stages of human immunodeficiency virus infection*. Arch Neurol, 1988. **45**(9): p. 954-8.
165. Ho, E.L., et al., *Cellular Composition of Cerebrospinal Fluid in HIV-1 Infected and Uninfected Subjects*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66188.
166. Hollander, H., *Cerebrospinal fluid normalities and abnormalities in individuals infected with human immunodeficiency virus*. J Infect Dis, 1988. **158**(4): p. 855-8.
167. Oldenhove, G., et al., *Decrease of Foxp3⁺ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection*. Immunity, 2009. **31**(5): p. 772-86.
168. Tenorio, E.P., et al., *Reduction of Foxp3⁺ cells by depletion with the PC61 mAb induces mortality in resistant BALB/c mice infected with Toxoplasma gondii*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 786078.
169. Tenorio, E.P., et al., *CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells mediate Toxoplasma gondii-induced T-cell suppression through an IL-2-related mechanism but independently of IL-10*. Eur J Immunol, 2011. **41**(12): p. 3529-41.
170. Salinas, N., et al., *T cell-suppression in vitro during Toxoplasma gondii infection is the result of IL-2 competition between Tregs and T cells leading to death of proliferating T cells*. Scand J Immunol, 2013.
171. Vidal, J.E., et al., *Strategies to reduce mortality and morbidity due to AIDS-related cryptococcal meningitis in Latin America*. Braz J Infect Dis, 2013. **17**(3): p. 353-62.
172. Ellerbroek, P.M., et al., *Cryptococcal glucuronoxylomannan interferes with neutrophil rolling on the endothelium*. Cell Microbiol, 2004. **6**(6): p. 581-92.
173. Monari, C., et al., *Differences in outcome of the interaction between Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan and human monocytes and neutrophils*. Eur J Immunol, 2003. **33**(4): p. 1041-51.
174. Liu, T., et al., *Glucuronoxylomannan promotes the generation of antigen-specific T regulatory cell that suppresses the antigen-specific Th2 response upon activation*. J Cell Mol Med, 2009. **13**(8B): p. 1765-74.
175. Jarvis, J.N., et al., *The phenotype of the Cryptococcus-specific CD4⁺ memory T-cell response is associated with disease severity and outcome in HIV-associated cryptococcal meningitis*. J Infect Dis, 2013. **207**(12): p. 1817-28.
176. Guyot-Revol, V., et al., *Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(7): p. 803-10.

177. Caramori, G., et al., *Immune response to Mycobacterium tuberculosis infection in the parietal pleura of patients with tuberculous pleurisy*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e22637.
178. Semple, P.L., et al., *Regulatory T cells attenuate mycobacterial stasis in alveolar and blood-derived macrophages from patients with tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **187**(11): p. 1249-58.
179. Pinheiro, R.O., et al., *Different immunosuppressive mechanisms in multi-drug-resistant tuberculosis and non-tuberculous mycobacteria patients*. Clin Exp Immunol, 2013. **171**(2): p. 210-9.
180. Larson, R.P., S. Shafiani, and K.B. Urdahl, *Foxp3(+) regulatory T cells in tuberculosis*. Adv Exp Med Biol, 2013. **783**: p. 165-80.
181. Frisullo, G., et al., *Regulatory T cells fail to suppress CD4T⁺-bet⁺ T cells in relapsing multiple sclerosis patients*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 418-28.
182. Gelman, B.B., et al., *Neurovirological correlation with HIV-associated neurocognitive disorders and encephalitis in a HAART-era cohort*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **62**(5): p. 487-95.
183. Moskowitz, L.B., et al., *The neuropathology of acquired immune deficiency syndrome*. Arch Pathol Lab Med, 1984. **108**(11): p. 867-72.
184. Petito, C.K., et al., *Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS): an autopsy review*. J Neuropathol Exp Neurol, 1986. **45**(6): p. 635-46.
185. Gray, F., R. Gherardi, and F. Scaravilli, *The neuropathology of the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). A review*. Brain, 1988. **111 (Pt 2)**: p. 245-66.
186. Lee, S.C., A. Casadevall, and D.W. Dickson, *Immunohistochemical localization of capsular polysaccharide antigen in the central nervous system cells in cryptococcal meningoencephalitis*. Am J Pathol, 1996. **148**(4): p. 1267-74.
187. Lee, S.C., D.W. Dickson, and A. Casadevall, *Pathology of cryptococcal meningoencephalitis: analysis of 27 patients with pathogenetic implications*. Hum Pathol, 1996. **27**(8): p. 839-47.
188. Falangola, M.F., B.S. Reichler, and C.K. Petito, *Histopathology of cerebral toxoplasmosis in human immunodeficiency virus infection: a comparison between patients with early-onset and late-onset acquired immunodeficiency syndrome*. Hum Pathol, 1994. **25**(10): p. 1091-7.
189. Rock, R.B., et al., *Central nervous system tuberculosis: pathogenesis and clinical aspects*. Clin Microbiol Rev, 2008. **21**(2): p. 243-61, table of contents.
190. Sonabend, A.M., C.E. Rolle, and M.S. Lesniak, *The role of regulatory T cells in malignant glioma*. Anticancer Res, 2008. **28**(2B): p. 1143-50.
191. Sanchez, G.I., et al., *Molecular epidemiology of human immunodeficiency virus-infected individuals in Medellin, Colombia*. Am J Trop Med Hyg, 2006. **74**(4): p. 674-7.
192. Villarreal, J.L., et al., *Characterization of HIV type 1 envelope sequence among viral isolates circulating in the northern region of Colombia, South America*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2012. **28**(12): p. 1779-83.
193. Santos, A.F. and M.A. Soares, *HIV Genetic Diversity and Drug Resistance*. Viruses, 2010. **2**(2): p. 503-31.
194. Fleury, H.J., et al., *Susceptibility to antiretroviral drugs of CRF01_AE, CRF02_AG, and subtype C viruses from untreated patients of Africa and Asia: comparative*

- genotypic and phenotypic data*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(4): p. 357-66.
195. Huang, A., et al., *Global analysis of sequence diversity within HIV-1 subtypes across geographic regions*. Future Virol, 2012. **7**(5): p. 505-517.
 196. Jakobsen, M.R., et al., *Longitudinal Analysis of CCR5 and CXCR4 Usage in a Cohort of Antiretroviral Therapy-Naive Subjects with Progressive HIV-1 Subtype C Infection*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65950.
 197. de Mendoza, C., et al., *Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(4): p. 698-704.
 198. Samikkannu, T., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells: Implications for neuroAIDS*. J Neurovirol, 2010. **16**(4): p. 255-63.
 199. Campbell, G.R., et al., *Differential induction of rat neuronal excitotoxic cell death by human immunodeficiency virus type 1 clade B and C tat proteins*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011. **27**(6): p. 647-54.
 200. Morris, L., et al., *CCR5 is the major coreceptor used by HIV-1 subtype C isolates from patients with active tuberculosis*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(8): p. 697-701.
 201. Sharer, L.R., *Pathology of HIV-1 infection of the central nervous system. A review*. J Neuropathol Exp Neurol, 1992. **51**(1): p. 3-11.
 202. Wolf, D., et al., *The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(23): p. 8326-31.
 203. Roncador, G., et al., *FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2247-53.
 204. Gundersen, H.J., et al., *The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis*. APMIS, 1988. **96**(10): p. 857-81.
 205. Zerrate, M.C., et al., *Neuroinflammation and behavioral abnormalities after neonatal terbutaline treatment in rats: implications for autism*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **322**(1): p. 16-22.
 206. Pardo, C.A., et al., *The pathology of Rasmussen syndrome: stages of cortical involvement and neuropathological studies in 45 hemispherectomies*. Epilepsia, 2004. **45**(5): p. 516-26.
 207. Gong, N., et al., *Brain ingress of regulatory T cells in a murine model of HIV-1 encephalitis*. J Neuroimmunol, 2011. **230**(1-2): p. 33-41.
 208. Kramer-Hammerle, S., et al., *Cells of the central nervous system as targets and reservoirs of the human immunodeficiency virus*. Virus Res, 2005. **111**(2): p. 194-213.
 209. Gray, L., et al., *Tissue-specific sequence alterations in the human immunodeficiency virus type 1 envelope favoring CCR5 usage contribute to persistence of dual-tropic virus in the brain*. J Virol, 2009. **83**(11): p. 5430-41.
 210. Brew, B.J., et al., *Levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in cerebrospinal fluid correlate with AIDS dementia stage*. J Infect Dis, 1997. **175**(4): p. 963-6.

211. Blackard, J.T., *HIV compartmentalization: a review on a clinically important phenomenon*. Curr HIV Res, 2012. **10**(2): p. 133-42.
212. Valcour, V.G., B.T. Shiramizu, and C.M. Shikuma, *HIV DNA in circulating monocytes as a mechanism to dementia and other HIV complications*. J Leukoc Biol, 2010. **87**(4): p. 621-6.
213. Morampudi, V., et al., *Partial depletion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T regulatory cells significantly increases morbidity during acute phase Toxoplasma gondii infection in resistant BALB/c mice*. Microbes Infect, 2011. **13**(4): p. 394-404.
214. Yamane, H. and W.E. Paul, *Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets*. Immunol Rev, 2013. **252**(1): p. 12-23.
215. Cozzo Picca, C., et al., *CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cell formation requires more specific recognition of a self-peptide than thymocyte deletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(36): p. 14890-5.
216. Joosten, S.A. and T.H. Ottenhoff, *Human CD4 and CD8 regulatory T cells in infectious diseases and vaccination*. Hum Immunol, 2008. **69**(11): p. 760-70.
217. McKee, A.S. and E.J. Pearce, *CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1224-31.
218. Hisaeda, H., et al., *Resistance of regulatory T cells to glucocorticoid-induced [corrected] TNFR family-related protein (GITR) during Plasmodium yoelii infection*. Eur J Immunol, 2005. **35**(12): p. 3516-24.
219. Shafiani, S., et al., *Pathogen-specific Treg cells expand early during mycobacterium tuberculosis infection but are later eliminated in response to Interleukin-12*. Immunity, 2013. **38**(6): p. 1261-70.
220. Knosp, C.A., et al., *Regulation of Foxp3+ inducible regulatory T cell stability by SOCS2*. J Immunol, 2013. **190**(7): p. 3235-45.
221. Thornton, A.M., et al., *Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells*. J Immunol, 2010. **184**(7): p. 3433-41.
222. Josefowicz, S.Z. and A. Rudensky, *Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 616-25.
223. Schwele, S., et al., *Cytomegalovirus-specific regulatory and effector T cells share TCR clonality--possible relation to repetitive CMV infections*. Am J Transplant, 2012. **12**(3): p. 669-81.
224. Jager, R., et al., *Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms*. Leukemia, 2010. **24**(7): p. 1290-8.
225. Lal, G. and J.S. Bromberg, *Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression*. Blood, 2009. **114**(18): p. 3727-35.
226. Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi, *Development and maintenance of regulatory T cells*. Immunity, 2013. **38**(3): p. 414-23.
227. Himmel, M.E., et al., *Helios+ and Helios- cells coexist within the natural FOXP3+ T regulatory cell subset in humans*. J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2001-8.
228. Floess, S., et al., *Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(2): p. e38.

229. Pacholczyk, R., et al., *Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 249-59.
230. Liu, X., et al., *T cell receptor CDR3 sequence but not recognition characteristics distinguish autoreactive effector and Foxp3(+) regulatory T cells*. Immunity, 2009. **31**(6): p. 909-20.
231. Fohse, L., et al., *High TCR diversity ensures optimal function and homeostasis of Foxp3+ regulatory T cells*. Eur J Immunol, 2011. **41**(11): p. 3101-13.
232. Gratama, J.W., et al., *Reduction of interlaboratory variability in flow cytometric immunophenotyping by standardization of instrument set-up and calibration, and standard list mode data analysis*. Cytometry, 1997. **30**(1): p. 10-22.
233. van den Beemd, R., et al., *Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls*. Cytometry, 2000. **40**(4): p. 336-45.
234. Hodges, E., et al., *Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes*. J Clin Pathol, 2003. **56**(1): p. 1-11.
235. MacIsaac, C., et al., *Rapid analysis of the Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in whole blood*. J Immunol Methods, 2003. **283**(1-2): p. 9-15.
236. Kasow, K.A., et al., *Human CD4+CD25+ regulatory T cells share equally complex and comparable repertoires with CD4+CD25- counterparts*. J Immunol, 2004. **172**(10): p. 6123-8.
237. Fujishima, M., et al., *TCRalphabeta repertoire diversity of human naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells*. Immunol Lett, 2005. **99**(2): p. 193-7.
238. Wong, J., et al., *Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells*. J Immunol, 2007. **178**(11): p. 7032-41.
239. Kharbanda, M., et al., *Alterations in T-cell receptor Vbeta repertoire of CD4 and CD8 T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected children*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(1): p. 53-8.
240. Giacoia-Gripp, C.B., et al., *Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor Vbeta repertoire among HIV-1 infected individuals before and after antiretroviral therapy*. J Clin Immunol, 2005. **25**(2): p. 116-26.
241. Wei, S., et al., *The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire*. Immunogenetics, 1994. **40**(1): p. 27-36.
242. Suter, T., et al., *The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation*. Eur J Immunol, 2003. **33**(11): p. 2998-3006.
243. Oyella, J., et al., *Prevalence and factors associated with cryptococcal antigenemia among severely immunosuppressed HIV-infected adults in Uganda: a cross-sectional study*. J Int AIDS Soc, 2012. **15**(1): p. 15.
244. Patel, S., et al., *The prevalence of cryptococcal antigenemia in newly diagnosed HIV patients in a Southwest London cohort*. J Infect, 2013. **66**(1): p. 75-9.
245. Ding, Y., J. Xu, and J.S. Bromberg, *Regulatory T cell migration during an immune response*. Trends Immunol, 2012. **33**(4): p. 174-80.
246. Geiger, T.L. and S. Tauro, *Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function*. Hum Immunol, 2012. **73**(3): p. 232-9.
247. Lowther, D.E. and D.A. Hafler, *Regulatory T cells in the central nervous system*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 156-69.

248. McLean-Tooke, A., et al., *T cell receptor Vbeta repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children*. Clin Exp Immunol, 2008. **151**(1): p. 190-8.
249. Pacholczyk, R. and J. Kern, *The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells*. Immunology, 2008. **125**(4): p. 450-8.
250. Malhotra, U., et al., *CD4+ T cell receptor repertoire perturbations in HIV-1 infection: association with plasma viremia and disease progression*. Clin Immunol, 2006. **119**(1): p. 95-102.
251. Biojone, E., et al., *Minimal residual disease in cerebrospinal fluid at diagnosis: a more intensive treatment protocol was able to eliminate the adverse prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Lymphoma, 2012. **53**(1): p. 89-95.
252. Tembhare, P., et al., *Flow cytometric immunophenotypic assessment of T-cell clonality by vbeta repertoire analysis in fine-needle aspirates and cerebrospinal fluid*. Am J Clin Pathol, 2012. **137**(2): p. 220-6.
253. Lee, S.J., et al., *Common T-cell receptor V beta usage in oligoclonal T lymphocytes derived from cerebrospinal fluid and blood of patients with multiple sclerosis*. Ann Neurol, 1991. **29**(1): p. 33-40.
254. Hafler, D.A., et al., *Oligoclonal T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis*. J Exp Med, 1988. **167**(4): p. 1313-22.
255. Skulina, C., et al., *Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2428-33.
256. Jacobsen, M., et al., *Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients*. Brain, 2002. **125**(Pt 3): p. 538-50.
257. Netea, M.G., et al., *Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(32): p. 4195-201.
258. Koch, M.A., et al., *The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation*. Nat Immunol, 2009. **10**(6): p. 595-602.
259. de Vedia, L., et al., *Relevance of intracranial hypertension control in the management of Cryptococcus neoformans meningitis related to AIDS*. Infection, 2013.
260. Anekthananon, T., et al., *Predictors of poor clinical outcome of cryptococcal meningitis in HIV-infected patients*. Int J STD AIDS, 2011. **22**(11): p. 665-70.
261. Boulware, D.R., et al., *Paucity of initial cerebrospinal fluid inflammation in cryptococcal meningitis is associated with subsequent immune reconstitution inflammatory syndrome*. J Infect Dis, 2010. **202**(6): p. 962-70.
262. Kuniyasu, Y., et al., *Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation*. Int Immunol, 2000. **12**(8): p. 1145-55.
263. Brunkow, M.E., et al., *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet, 2001. **27**(1): p. 68-73.

264. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(4): p. 330-6.
265. Kmiecik, M., et al., *Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function*. J Transl Med, 2009. **7**: p. 89.
266. Duthoit, C.T., et al., *Uncoupling of IL-2 signaling from cell cycle progression in naive CD4⁺ T cells by regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 155-63.
267. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 1783-6.
268. Weiss, E.M., et al., *Foxp3-mediated suppression of CD95L expression confers resistance to activation-induced cell death in regulatory T cells*. J Immunol, 2011. **187**(4): p. 1684-91.
269. Jenabian, M.A., et al., *Regulatory T cells in HIV infection: can immunotherapy regulate the regulator?* Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 908314.
270. Brusko, T.M., et al., *Assessing the in vitro suppressive capacity of regulatory T cells*. Immunol Invest, 2007. **36**(5-6): p. 607-28.
271. Hilchey, S.P. and S.H. Bernstein, *Use of CFSE to monitor ex vivo regulatory T-cell suppression of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation within unseparated mononuclear cells from malignant and non-malignant human lymph node biopsies*. Immunol Invest, 2007. **36**(5-6): p. 629-48.
272. Lyons, A.B. and C.R. Parish, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. J Immunol Methods, 1994. **171**(1): p. 131-7.
273. Tang, Q. and M.F. Krummel, *Imaging the function of regulatory T cells in vivo*. Curr Opin Immunol, 2006. **18**(4): p. 496-502.
274. Boyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 7.
275. Litjens, N.H., K. Boer, and M.G. Betjes, *Identification of circulating human antigen-reactive CD4⁺ FOXP3⁺ natural regulatory T cells*. J Immunol, 2012. **188**(3): p. 1083-90.
276. Bresatz, S., et al., *Isolation, propagation and characterization of cord blood derived CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells*. J Immunol Methods, 2007. **327**(1-2): p. 53-62.
277. Foreman, K.E., *HIV protocols*. Arch Pathol Lab Med, 2000. **124**(1): p. 168.
278. Barthlott, T., et al., *CD25⁺ CD4⁺ T cells compete with naive CD4⁺ T cells for IL-2 and exploit it for the induction of IL-10 production*. Int Immunol, 2005. **17**(3): p. 279-88.
279. Thornton, A.M., et al., *Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺CD25⁺ T cell suppressor function*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6519-23.
280. Wing, K., et al., *CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function*. Science, 2008. **322**(5899): p. 271-5.
281. McNally, A., et al., *CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control CD8⁺ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(18): p. 7529-34.

282. de Goer de Herve, M.G., et al., *FoxP3(+) regulatory CD4 T cells control the generation of functional CD8 memory*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 986.
283. Jhamb, R., et al., *Symptomatic relapse of HIV-associated cryptococcal meningitis: Recurrent cryptococcal meningitis or cryptococcus-related immune reconstitution inflammatory syndrome?* Int J STD AIDS, 2013.
284. Deckert, M., et al., *Modern concepts in the biology, diagnosis, differential diagnosis and treatment of primary central nervous system lymphoma*. Leukemia, 2011. **25**(12): p. 1797-807.
285. Maes, W., et al., *DC vaccination with anti-CD25 treatment leads to long-term immunity against experimental glioma*. Neuro Oncol, 2009. **11**(5): p. 529-42.
286. Goforth, R., et al., *Immune stimulatory antigen loaded particles combined with depletion of regulatory T-cells induce potent tumor specific immunity in a mouse model of melanoma*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(4): p. 517-30.
287. Rech, A.J. and R.H. Vonderheide, *Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1174**: p. 99-106.
288. Sampson, J.H., et al., *A pilot study of IL-2/Ralpha blockade during lymphopenia depletes regulatory T-cells and correlates with enhanced immunity in patients with glioblastoma*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31046.
289. Vingerhoets, J., et al., *Altered receptor expression and decreased sensitivity of T-cells to the stimulatory cytokines IL-2, IL-7 and IL-12 in HIV infection*. Immunol Lett, 1998. **61**(1): p. 53-61.
290. Pett, S.L., A.D. Kelleher, and S. Emery, *Role of interleukin-2 in patients with HIV infection*. Drugs, 2010. **70**(9): p. 1115-30.
291. Sirskyj, D., et al., *Disruption of the gamma c cytokine network in T cells during HIV infection*. Cytokine, 2008. **43**(1): p. 1-14.
292. Weiss, L., et al., *In vivo expansion of naive and activated CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cell populations in interleukin-2-treated HIV patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(23): p. 10632-7.
293. Shi, Y., et al., *Impact of polyclonal anti-CD3/CD28-coated magnetic bead expansion methods on T cell proliferation, differentiation and function*. Int Immunopharmacol, 2013. **15**(1): p. 129-37.
294. Gougeon, M.L., 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**(9): p. 3509-20.
295. Fevrier, M., K. Dorgham, and A. Rebollo, *CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: role of apoptosis*. Viruses, 2011. **3**(5): p. 586-612.
296. Scrivener, S., et al., *Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia*. Leuk Lymphoma, 2003. **44**(3): p. 383-9.
297. Das, A., et al., *Functional skewing of the global CD8 T cell population in chronic hepatitis B virus infection*. J Exp Med, 2008. **205**(9): p. 2111-24.
298. Levine, B.L., et al., *Antiviral effect and ex vivo CD4+ T cell proliferation in HIV-positive patients as a result of CD28 costimulation*. Science, 1996. **272**(5270): p. 1939-43.

299. Angin, M., M. King, and M.M. Addo, *New tools to expand regulatory T cells from HIV-1-infected individuals*. J Vis Exp, 2013(75): p. e50244.
300. Kagan, S., et al., *Toxicity mechanisms of amphotericin B and its neutralization by conjugation with arabinogalactan*. Antimicrob Agents Chemother, 2012. **56**(11): p. 5603-11.
301. Onlamoon, N., et al., *Influence of cell isolation method on the optimization of CD4+ T cell expansion using anti-CD3/CD28 coated beads*. Asian Pac J Allergy Immunol, 2013. **31**(2): p. 99-105.
302. Keever-Taylor, C.A., et al., *Rapamycin enriches for CD4(+) CD25(+) CD27(+) Foxp3(+) regulatory T cells in ex vivo-expanded CD25-enriched products from healthy donors and patients with multiple sclerosis*. Cytotherapy, 2007. **9**(2): p. 144-57.
303. Haas, J., et al., *Specific recruitment of regulatory T cells into the CSF in lymphomatous and carcinomatous meningitis*. Blood, 2008. **111**(2): p. 761-6.
304. Aandahl, E.M., et al., *Human CD4+ CD25+ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens*. J Virol, 2004. **78**(5): p. 2454-9.
305. Xu, D., et al., *Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 739-47.
306. Van Braeckel, E., et al., *Polyfunctional CD4(+) T cell responses in HIV-1-infected viral controllers compared with those in healthy recipients of an adjuvanted polyprotein HIV-1 vaccine*. Vaccine, 2013. **31**(36): p. 3739-46.
307. Brandt, L., et al., *HIV-1-infected individuals in antiretroviral therapy react specifically with polyfunctional T-cell responses to Gag p24*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2013. **63**(4): p. 418-27.
308. Presicce, P., et al., *Frequency of circulating regulatory T cells increases during chronic HIV infection and is largely controlled by highly active antiretroviral therapy*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28118.
309. Bi, X., et al., *High frequency and proliferation of CD4+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts*. Eur J Immunol, 2009. **39**(1): p. 301-9.

ANEXOS

ANEXO I: PROTOCOLO TINCIÓN TREG (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP⁺) DEL LCR PARA ANÁLISIS POR FACS

SOP No. 001
Emergentes y Enfermedad

Grupo: Virus
Sección: Perfil de marcadores de Neuroinflamación

Título: <i>TINCIÓN DE SUPERFICIE E INTRACELULAR PARA CELULAS T REGULADORAS POR CITOMETRIA DE FLUJO - LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO</i>		
Aprobación / Fecha : Mayo 10 2007		
Autor/Responsable	Dirección	Control Calidad
/ /	/ /	/ /
Nombre: Andrés Felipe Zea V Gerardo A. Libreros	Nombre: Beatriz Parra	Nombre:
Firma:	Firma:	Firma:
Fecha de Aplicación: / /	Período Revisión: / /	

1. Objetivo

Determinar la proporción de células T reguladoras en el liquido cefalorraquídeo de pacientes con infecciones oportunistas del sistema nervioso central asociadas a SIDA.

2. Equipos y Materiales

- Gradillas para tubos de 12 x75 mm
- Tubos 12x75 mm de poliestireno transparentes con tapa
- Micropipetas de 1-10 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl.
- Puntas para micropipetas estériles de 50-200 µl y 100-1000 µl.
- Puntas para fluorocromos de baja retención estériles de 1-10 µL
- Centrífuga, Refrigerador y Cabina de flujo laminar

3. Reactivos

Human Regulatory T Cell Whole Blood Staining Kit Cat No88-8996-40

- Cocktail FITC anti-human CD4 y APC anti-human CD25
- PerCP anti-human CD3
- PE anti-human FoxP3
- PE Rat IgG2a control de isotipo
- Buffer de tincion de ebioscience
- Fixation/Permeabilization concentrado 4x y diluente de ebioscience (Preparar 1 hora antes de permeabilizar y preservar refrigerado agregando 3cc de diluente por cada 1cc de Fixation/Permeabilization, descartar el reactivo que no se utilice)
- Permeabilization buffer de ebioscience

4. Procedimiento

4.1 Marcar 2 tubos de 12x75 mm de poliestireno de la siguiente manera:

1. Control FoxP3
2. Treg CD4/CD25/FoxP3

4.2 Retirar con micropipeta el LCR sobrante. Resuspender el pellet en buffer de tinción.

4.3 Adicionar 10uL del cocktail CD4/25 a cada tubo. Incubar 30 minutos en la oscuridad a 4°

4.4 Lavar en 1mL de buffer de tinción frío.

4.5 Decantar retirando con micropipeta (nunca descartar por inversión), resuspender el pellet en el volumen residual y adicione 1mL de Fixation/Permeabilization recién preparado.

4.6 Incubar 30 minutos a 4° en la oscuridad.

4.7 Realice dos lavados con 1mL de buffer de permeabilizacion

4.8 Después de descartar en el volumen residual adicione 10uL de anti-human FoxP3 y 10uL al tubo de control de isotipo.

4.9 Lave las células con 1mL de permeabilization buffer.

4.10 Repita el paso anterior.

4.11 Resuspenda cada tubo en 500uL de buffer de tinción.

4.12 Almacenar hasta la lectura en el citometro a 4°C en oscuridad.

5. Bioseguridad

- Todas las muestras de sangre deben ser manipuladas como potencialmente infecciosas.
- Se deben utilizar sin excepción guantes y bata de laboratorio como protección personal durante el procesamiento de muestras biológicas. Las muestras y reactivos se deben manipular en cabina de bioseguridad.
- Los materiales que se utilicen deben ser estériles y después de usados deben descartarse en bolsa roja antes de esterilizar en autoclave.

6. Administración de la información

Registrar todos los datos en el cuaderno de laboratorio.

Realizar Back Up trimestral de la información registrada en el citómetro de flujo.

7. Referencias

Prussin, C. et al. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J. Immunol. Meth.* 1995;188: 117-128

Nylander S. et al. Brefeldin A, but not monensin, completely blocks CD69 expression on mouse lymphocytes: efficacy of inhibitors of protein secretion in protocols for intracellular cytokine staining by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* 1999. 224:69–76

Rukavina, D. et al. Perforin expression in peripheral blood lymphocytes in rejecting and tolerant kidney transplant recipients. *Transplantation.* 1996. 61:285-291

ANEXO II: FRECUENCIA DE TREG INFILTRANTES DEL LCR (% DEL TOTAL DE LTCD4⁺) Y CARACTERÍSTICAS DEL CITOQUÍMICO DEL LCR EN LOS 76 CASO EVALUADOS.

Codigo	Diagnostico	% Treg LCR (CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺)	Linfocitos LCR (celulas/uL)	LDH LCR (mg/dL)	Glucosa LCR (mg/dL)	Proteinas LCR (mg/dL)
N051	Control	17,91	0	2	46	47
N057	Control	1,95	2	38	36	6
N058	Control	1,84	0	16	44	9
N062	Control	10,37	0	1	28	20
N074	Control	3,27	0		52	15
N078	Control	1,4	2	21	44	30
N081	Control	1,05	0	8	38	34
N085	Control	0,58	0	33	42	20,1
N092	Control	18,32	2	25	44	28
N100	Control	7,69	1			
N101	Control	4,62	1			
N105	Control	4,11	13	17	40	38
N110	Control	7,69	0			
N111	Control	3,56	1			
N114	Control	9,69	2			
N136	Control	11,78	0		12	307
N025	Criptococosis Meningea	18,91	2	54	23	86
N052	Criptococosis Meningea	23,67	2	35	62	2
N053	Criptococosis Meningea	33,52	12	22	21	49
N063	Criptococosis	6,67	79	14	0	220

	Meningea					
N070	Criptococosis Meningea	35,64	3		29	165.2
N071	Criptococosis Meningea	30,07	3		48	41,6
N083	Criptococosis Meningea	8,59	53	42	40	41
N084	Criptococosis Meningea	10,89	122	41	39	204
N093	Criptococosis Meningea	34,08	35	31	20	59
N096	Criptococosis Meningea	9,79	1	13	47	21
N098	Criptococosis Meningea	21,49	50	75	19	318
N104	Criptococosis Meningea	8,2	5	24	77	33
N106	Criptococosis Meningea	19,98	240	143	17	254
N107	Criptococosis Meningea	18,13	7	19	44	64
N108	Criptococosis Meningea	30,02	114	39	10	242
N112	Criptococosis Meningea	37,33	11			
N116	Criptococosis Meningea	18,3	146			
N137	Criptococosis Meningea	14,19	66	39	50	35
N138	Criptococosis Meningea	11,74	100	48	16	278
N139	Criptococosis Meningea	18,58	80		3	69
N146	Criptococosis Meningea	15,49	78	17	35	42
N147	Criptococosis Meningea	16,96	75		59	25
N160	Criptococosis Meningea	31	30	28	25	105
N163	Criptococosis Meningea	12	28	38	29	291
N166	Criptococosis Meningea	13,9	46	18	37	24
N167	Criptococosis Meningea	9,3	36	43	50	42

N049	Meningitis Tuberculosa	9,22	8	238	23	204
N059	Meningitis Tuberculosa	28,53	3	54	14	160
N087	Meningitis Tuberculosa	11,36	132	141	8	226
N090	Meningitis Tuberculosa	2,11	47	281	6	24
N091	Meningitis Tuberculosa	19,96	63	168	21	372
N094	Meningitis Tuberculosa	16,8	58	564	37	310
N018	Toxoplasmosis Cerebral	18,96	9	38	53	67
N020	Toxoplasmosis Cerebral	9,29	0	103	29	55
N022	Toxoplasmosis Cerebral	28,81	1	93	29	93
N023	Toxoplasmosis Cerebral	18,26	2			
N027	Toxoplasmosis Cerebral	23,56	15	84	53	118
N029	Toxoplasmosis Cerebral	19,37	0	54	47	37
N030	Toxoplasmosis Cerebral	17,91	4			
N055	Toxoplasmosis Cerebral	17,19	0	23	40	40
N061	Toxoplasmosis Cerebral	2,69	2	26	55	85
N066	Toxoplasmosis Cerebral	17,79	10	36	26	151
N077	Toxoplasmosis Cerebral	10,95	8	26	39	32
N088	Toxoplasmosis Cerebral	20,42	6	32	44	53
N099	Toxoplasmosis Cerebral	15	1		49	28
N019	HCMV	11,97	10	233	59	157
N069	HCMV	17,77	14	751	15	478
N109	HCMV	9,99	20			
N026	Meningitis Linfocitaria	2,84	18	43	41	53
N050	Meningitis Linfocitaria	30,36	64	3860	1	114

N072	Meningitis Linfocitaria	20,9	40			
N080	Meningitis Linfocitaria	6	228	26	36	162
N089	Meningitis Linfocitaria	9,31	40	109	15	115
N075	Neurosifilis	7,11	9		45	164
N076	Neurosifilis	12,91	50			
N086	Neurosifilis	0,97	3	40	40	81
N144	Neurosifilis	6,19	130	22	18	126
N054	Masa SNC	4,81	1	10	81	26
N068	Masa SNC	2,09	5	21	44	39,8
N103	Masa SNC	6,17	9	55	30	84

ANEXO III: DOBLE TINCIÓN (CD3, FoxP3) PARA INMUNOHISTOQUIMICA EN TEJIDO CEREBRAL PRESERVADO EN PARAFINA.

Neuroimmunopathology Lab. Johns Hopkins Baltimore, MD, USA
Last review, January 6th, 2009 Dr. Carlos Pardo-Villamizar

DOUBLE STAINING CD3/FoxP3 FOR PARAFFIN SECTIONS

PBS: Prepare fresh 0.1M PBS for Immunostaining:

Sodium Phosphate Monobasic (A)	13.8g / 500ml dH2O
Sodium Phosphate Dibasic (B)	107.2g/ 2000ml dH2O

0.1 M PBS:

B	1600ml
A	400ml
NaCl	36g
dH2O	to 4000ml

Or reconstitute 1x PBS from 10xPBS with dH2O

SODIUM CITRATE BUFFER (10mM Sodium Citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0):

Tri-sodium citrate (dihydrate)	----- 2.94 g
Distilled water	----- 1000 ml

Mix to dissolve. Adjust pH to 6.0 with 1N HCl and then add 0.5 ml of Tween 20 and mix well. Store this solution at room temperature for 3 months or at 4 C for longer storage.

Note: this buffer is commonly used and works perfectly with many antibodies. It gives very nice intense staining with very low background.

Fresh 100 mM Tris-HCl, pH 8.2 Buffer

Prepare it Using 0.5M Tris-HCl pH 8 (Arun's Lab)

SECTIONS: Paraffin sections are cut at 10um.

REAGENTS:

DAKO Polyclonal Rabbit Anti-Human **CD3**, Code-Nr. A 0452
eBioscience Clone PCH101 Rat Anti-human **FoxP3**, Cat. No 14-4776
ABC Kit / VECTOR / PK-6101 **Peroxidase**
DAB Kit / VECTOR / SK-4100

ABC-AP KIT /VECTOR/AK-5000 **Alkaline Phosphatase**
Vector® Blue / VECTOR / SK-5300

Mounting media:

VectaMount™ AQ (Cat. No. H-5501).

PROCEDURE

1. Deparaffinize the slides in oven at 60 C for 60 min.
2. Rehydrate the slides:
 - Xylene 4 min X 3 times (Shake every minute the slides to remove the excess of paraffin)
 - 100% Ethyl Alcohol 3 min X 3 times
 - 95% Ethyl Alcohol 3 min X 3 times
 - 70% Ethyl Alcohol 3 min X 2 times
 - 50% Ethyl Alcohol 3 min X 2 times
 - dH2O 3 min x 2 times
3. ANTIGEN RETRIEVAL:
 - A-Boil **SODIUM CITRATE BUFFER** for 2 minutes in microwave HI power
 - B. Boil the slides in the hot **SODIUM CITRATE BUFFER** for 20m (twenty minutes) in microwave 20% of power.
Check every 2 minutes the level of buffer and replace the volume if it is necessary.
Avoid desiccation of the slides.
 - C. For an homogeneous cooling of the slides retire the slides of the microwave and add 1000mL dH2O (room temperature). **Never allow the hot slides expose to the air.**
4. Rinse the slides with PBS 5 min X 3 times.
*** FoxP3 - First Staining (Peroxidase)**
5. Incubate the slides with blocking solution at RT at least for 1 hour.
 - Normal Goat Serum (NGS) 3 %
 - Triton 0.4 %
 - In PBS Buffer

Remember The Triton that we use in the lab is 10%, It means you have to use 10 times more. For example for 1000uL of blocking solution 30uL of NGS, 40uL of 10%Triton and 930uL of PBS.

6. Incubate the slides with primary antibody at 4 Celsius degree overnight. Primary Antibody Rat Anti-human **FoxP3 1:100**

3% NGS

0.01% Triton

In PBS Buffer

For example for 1000uL of primary antibody dilution:

30uL of NGS, 1uL of 10%Triton, 10uL of FoxP3 Ab and 959uL of PBS.

7. Rinse slides with PBS 3 min X 3 times.

8. Incubate slides with secondary antibody at RT for 1 hour.

Biotinylated Goat anti Rat 1 : 200

3% Normal Serum

In PBS Buffer

9. Combine reagents A and B (ABC Vector kit) for the next reaction. The reagents A and B should mixed in PBS (or TBS) at least 30 min and at RT before the incubation.

A 1:100 PBS

B 1:100 / PBS

10. Rinse the slides with PBS 3 min X 3 times.

11. Incubate the slides with AB mix at RT for 1 hour.

12. Rinse the slides with PBS 3 min X 3 times.

13. Develop the slides with DAB at RT for 5-8 min (evaluate the level of staining at the 4th minute).

The developing DAB solution should be prepared as follow:

dH2O 5 ml

DAB Buffer 2 drops, mix very well

DAB Solution 4 drops, mix very well

Hydrogen Peroxide (H2O2)Solution 2 drops, mix very well

14. Stop the DAB reaction with dH2O.

15. Rinse the slides with PBS 5 min X 3 times.

*** CD3 - Second Staining (Alkaline Phospatase)**

16. Incubate the slides with blocking solution at RT at least for 1 hour.

Normal Goat Serum (NGS) 3 %

Triton 0.4 %

In PBS Buffer

17. Incubate the slides with primary antibody at 4 Celsius degree overnight.

Primary Antibody Rabbit Anti-human **CD3 1:100**

3% NGS

0.01% Triton

In PBS Buffer

18. Rinse slides with PBS 3 min X 3 times.

19. Incubate slides with secondary antibody at RT for 1 hour.

Biotinylated Goat anti Rabbit 1 : 200

3% Normal Serum

In PBS Buffer

20. Combine reagents A and B (ABC-AP KIT /VECTOR/AK-5000) for the next reaction. The reagents A and B should mixed in PBS at least 30 min and at RT before the incubation.

A 1:100 / PBS

B 1:100 / PBS

21. Rinse the slides with PBS 3 min X 3 times.

22. Incubate the slides with ABC-AP mix at RT for 1 hour.

23. Rinse the slides with PBS 3 min X 3 times.

24. Develop the slides with Vector® Blue at RT for 30 min in the dark (evaluate the level of staining at the 20th minute).

The developing Vector® Blue solution should be prepared as follow:

5 ml of 100 mM Tris-HCl, pH 8.2 buffer,

Add 2 drops of Reagent 1. Mix well.

Add 2 drops of Reagent 2. Mix well.

Add 2 drops of Reagent 3. Mix well.

25. Stop the Blue reaction with Buffer (PBS).

26. Rinse the slides with dH2O 5 min X 2 times

27. Vector® Blue is partially soluble in xylene. Proceed to aqueous mounting: Use an aqueous-based mounting medium **VectaMount™ AQ** (Cat. No.H-5501).

Store the slides in the dark at 4 degrees and Analyse as soon as be possible

Adapted by Andres Zea-Vera, MD.

ANEXO IV: CARACTERÍSTICAS DE LOS CASOS EVALUADOS POR INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LOS MARCADORES CD3 Y FoxP3 EN MUESTRAS PROVENIENTES DE AUTOPSIAS DE PACIENTES FALLECIDOS POR INFECCIONES OPORTUNISTAS DEL SNC ASOCIADAS A SIDA.

Caso	País de Origen	Diagnostico	Número del Bloque	Area (mm ²)	No. Celulas CD3 ⁺ /mm ²	No. Celulas CD3 ⁺ FoxP3 ⁺ /mm ²
1	India	TBM	A41/03-10	11,09	13,17	1,17
			A41/03-5	13,62	1,32	0,07
2	India	TC	A41/04 F	11,98	12,19	0,67
3	India	CM	A46/01 E	10,46	2,39	0
			A46/01 K	11,29	14,97	0
4	India	CM	A61 E/00	14,72	17,66	1,36
			A61 Q/00	16,40	6,65	0,30
5	India	TC	A69/03 D	8,50	27,40	4,35
			A69/03 L	8,82	85,19	10,66
6	India	CM	A74 H/02	10,03	21,84	3,49
			A74 P/02	9,40	11,28	3,09
7	India	TC	A75/02 D	12,50	19,45	1,36
			A75/02 H	14,98	12,01	1,74
8	India	CM	A7M/02	8,04	8,08	2,11
			A7R/02	10,83	8,87	1,02
9	India	CM	A85 00 C	7,72	5,70	0,13
			A85/00 Q	13,74	1,24	0
10	India	TBM	A88/03 E	5,41	15,36	1,85
11	India	TBM	M93/03 D	7,20	14,59	0,97
12	JHU 15	TC	44660-42	7,11	41,19	4,64
			44660-44	7,26	148,63	8,54
			44660-53	6,40	85,66	0

13	JHU 65	CM	45563-26	20,83	11,47	0
			45563-28	21,59	9,08	0,74
			45563-34	9,98	49,92	3,01
			45563-37	8,78	36,66	0
			45563-38	2,81	19,60	2,85
14	JHU 73	CM	45675-25	50,18	6,42	0
			45675-26	8,84	85,10	0
			45675-28	20,36	19,01	0
15	JHU 87	CM	45899-43	15,57	38,98	1,80
			45899-46	10,32	21,52	0,58
			45899-49	8,34	10,44	0,12
16	JHU 99	TC	46030-25	8,30	9,52	0,60
			46030-27	11,36	5,90	1,06
			46030-34	3,72	12,63	0,27
			46030-36	14,64	7,44	0,20
17	JHU 107	TC	46107-41	19,95	40,91	0,65
			46107-45	13,28	57,36	4,44
18	JHU 120	CM	46241-37	10,13	7,01	0,10
			46241-46	24,87	40,13	2,01
			46241-50	15,30	3,73	0,39
19	JHU 128	TC	46324-52	15,51	9,93	2,39
			46324-54	36,78	11,31	0,98

ANEXO V: PORCENTAJE DE EXPRESIÓN DE LAS FAMILIAS DEL TCR V β EN TREG Y LTCD4⁺ (CONVENCIONALES) EN 6 CASOS DE CRIPTOCOCOSIS MENINGEA ASOCIADA A SIDA.

N137

	Líquido Cefalorraquídeo		Sangre Periferica	
	LTCD4 LCR	Treg LCR	LTCD4 PBMC	Treg PBMC
V β 1	3,51	3,56	2,77	2,78
V β 2	11,28	8,98	6,14	8,28
V β 3	3,12	4,91	4,24	4,72
V β 4	1,04	1,79	0,23	1,08
V β 5.1	5,77	5,68	3,67	7,02
V β 5.2	0,84	0,91	0,82	1,21
V β 5.3	1,54	2	0,89	1,65
V β 7.1	1,75	3,5	4,75	3,18
V β 7.2	1,4	1,58	2,21	1,92
V β 8	5,35	5,59	4,88	5,35
V β 9	6,47	5,72	3,23	4,43
V β 11	1,29	2,73	1,3	1,4
V β 12	2,26	2,08	1,83	2,87
V β 13.1	3,69	3,89	1,94	4,01
V β 13.2	2,38	4,27	0,59	2,88
V β 13.6	2,51	1,43	11,36	1,9
V β 14	2,35	2,16	2,36	2,22
V β 16	0,76	0,76	0,95	2,55
V β 17	4,75	5,09	3,12	5,03
V β 18	1,47	1,58	3,6	2,44
V β 20	3,13	4,04	2,71	4,33
V β 21.3	2,57	2,91	2,17	3,69
V β 22	2,18	2,12	1,61	1,51

Vβ23	3,12	0,81	1,35	1,08
	74,53	78,09	68,72	77,53

N146

	Líquido Cefalorraquídeo		Sangre Periferica	
	LTCD4 LCR	Treg LCR	LTCD4 PBMC	Treg PBMC
Vβ1	2,2	3,84	3,22	2,82
Vβ2	9,2	8,99	10,23	10,33
Vβ3	2,96	2,32	3,41	2,9
Vβ4	2,43	2,09	0,35	0,4
Vβ5.1	8,56	6,52	8,21	7,63
Vβ5.2	0,74	1,05	0,84	1,57
Vβ5.3	1,05	1,16	0,92	1,31
Vβ7.1	2,21	1,68	2,38	1,59
Vβ7.2	1,77	1,91	3,77	3,86
Vβ8	5,44	6,52	5,61	5,57
Vβ9	1,62	2,21	3,43	3,59
Vβ11	0,77	0,83	3,39	3,02
Vβ12	1,84	5,55	2,3	2,83
Vβ13.1	3,85	4,95	3,59	3,07
Vβ13.2	3,31	4,6	4,62	5,36
Vβ13.6	1,69	2,68	2,49	2,83
Vβ14	1,62	2,69	2,52	3,02
Vβ16	0,5	1,43	0,86	0,91
Vβ17	7,81	5,9	5,3	5,59
Vβ18	2,15	1,86	4,88	4,77
Vβ20	2,18	2,19	2,84	2,56
Vβ21.3	3,37	2,29	3,97	4,18
Vβ22	6,39	3,07	2,62	2,75
Vβ23	0,53	1,15	1,25	1,86
	74,19	77,48	83	84,32

N147

	Líquido Cefalorraquídeo		Sangre Periferica	
	LTCD4 LCR	Treg LCR	LTCD4 PBMC	Treg PBMC
Vβ1	2,46	2,67	4,61	ND
Vβ2	6,95	8,37	10,49	ND
Vβ3	4,46	5,53	2,4	ND
Vβ4	0,47	0,88	0	ND

Vβ5.1	6,71	7,53	5,81	ND
Vβ5.2	0,8	3,28	1,46	ND
Vβ5.3	1	0,82	0,85	ND
Vβ7.1	1,91	3,16	2,25	ND
Vβ7.2	0,12	0	3,92	ND
Vβ8	4,51	4,62	5,61	ND
Vβ9	2,5	2,77	2,25	ND
Vβ11	2,45	0,57	5,73	ND
Vβ12	1,07	2,2	0,64	ND
Vβ13.1	5,7	5,9	4,71	ND
Vβ13.2	1,43	13	1,18	ND
Vβ13.6	3,04	2,09	3,92	ND
Vβ14	1,79	1,69	1,81	ND
Vβ16	1,28	0,31	0,89	ND
Vβ17	5,29	2,83	4,62	ND
Vβ18	2,73	2,08	4,53	ND
Vβ20	3,95	1,93	4,01	ND
Vβ21.3	3,77	2,03	0,86	ND
Vβ22	4,99	3,83	0,1	ND
Vβ23	0,28	0,23	0,7	ND
69,66 78,32 73,35 0				

N160

	Líquido Cefalorraquídeo		Sangre Periferica	
	LTCD4 LCR	Treg LCR	LTCD4 PBMC	Treg PBMC
Vβ1	5,74	3,2	2,79	2,75
Vβ2	18,14	14,02	10,63	11,34
Vβ3	1,43	2,17	3,22	2,22
Vβ4	14,83	2,62	2,33	2,06
Vβ5.1	10,21	9	5,99	8,78
Vβ5.2	1,26	0,79	1,66	1,81
Vβ5.3	1,43	1,24	1,42	1,08
Vβ7.1	12,32	1,24	2,7	2,59
Vβ7.2	1,09	0,79	0,96	0,61
Vβ8	4,49	4,84	5,24	5,06
Vβ9	2,62	1,85	5	5,66
Vβ11	0,14	0,59	1,59	1,28
Vβ12	1,39	2,91	1,66	1,58
Vβ13.1	4,35	5,65	3,4	3,63
Vβ13.2	4,22	3,66	1,89	2,04

Vβ13.6	5,85	2,19	2,01	2,67
Vβ14	4,73	3,26	3,2	3,75
Vβ16	0,19	0,74	2,23	1,07
Vβ17	5,24	5,9	4,79	5,23
Vβ18	3,71	1,84	2,29	4,81
Vβ20	1,86	0,82	1,45	1,55
Vβ21.3	3,28	3,2	4,13	4,02
Vβ22	11,62	3,86	2,17	1,76
Vβ23	0,82	0,53	0,63	1,13
	120,96	76,91	73,38	78,48

N162

	Líquido Cefalorraquídeo		Sangre Periferica	
	LTCD4 LCR	Treg LCR	LTCD4 PBMC	Treg PBMC
Vβ1	5,31	16,07	5,29	11,39
Vβ2	10,8	18,87	8,74	10,8
Vβ3	5,52	2,35	5,8	3,7
Vβ4	ND	ND	0,98	2,47
Vβ5.1	9,69	11,67	2,59	12,29
Vβ5.2	1,28	0,86	1,49	0,9
Vβ5.3	1,25	0,88	1,63	3,7
Vβ7.1	3,25	2,05	2,29	2,47
Vβ7.2	ND	ND	2,46	2,47
Vβ8	4,84	6,47	7,52	10,87
Vβ9	2,9	3,42	5,93	9,2
Vβ11	0,87	2,5	2,18	0
Vβ12	1,32	1,54	2,45	6,31
Vβ13.1	1,67	1,85	2,21	0
Vβ13.2	ND	ND	2,95	4,95
Vβ13.6	2,5	1,62	2,97	3,26
Vβ14	1,95	2,5	1,17	1,85
Vβ16	1,03	0	1,86	1,84
Vβ17	7,34	2,56	4,66	5,52
Vβ18	2,21	3,08	2,39	5,51
Vβ20	2,05	2,2	3,92	4,66
Vβ21.3	2,41	6,6	4,06	6,33
Vβ22	5,29	2,12	0,51	4,17
Vβ23	0,44	0,85	2,64	6,33
	73,92	90,06	78,69	120,99

N163

	Líquido Cefalorraquídeo		Sangre Periferica	
	LTCD4 LCR	Treg LCR	LTCD4 PBMC	Treg PBMC
Vβ1	8,48	8,5	3,06	ND
Vβ2	13,84	10,95	14,53	ND
Vβ3	4,25	7,82	3,66	ND
Vβ4	3,65	1,85	3,15	ND
Vβ5.1	8,19	13,93	3,21	ND
Vβ5.2	1,77	3,85	3,35	ND
Vβ5.3	2,19	2,79	2,09	ND
Vβ7.1	2,66	1,12	2,62	ND
Vβ7.2	2,54	2,78	1,89	ND
Vβ8	8,57	5,33	7,94	ND
Vβ9	5,43	5,61	3,46	ND
Vβ11	1,54	0,5	3,56	ND
Vβ12	1,22	1,48	3,63	ND
Vβ13.1	3,05	1,78	5,63	ND
Vβ13.2	3,49	3,24	2,21	ND
Vβ13.6	6,5	3,56	3,85	ND
Vβ14	3,42	6,53	2,37	ND
Vβ16	0,49	1,25	0,74	ND
Vβ17	5,21	12,14	5,15	ND
Vβ18	1,01	2,5	3,21	ND
Vβ20	8,38	7,5	2,92	ND
Vβ21.3	5,07	1,62	8,61	ND
Vβ22	5,61	4,52	5,34	ND
Vβ23	1,43	0,4	0,56	ND
	107,99	111,55	96,74	

ANEXO VI: PROTOCOLO DE PURIFICACION DE LOS Treg (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}) DEL LCR.

Grupo: Virus Emergentes y Enfermedad
Neuroinflamación

Sección: Perfil de marcadores de

Título: PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES (Treg)		
Aprobación / Fecha : Noviembre 10 de 2011		
Autor/Responsable	Dirección	Control Calidad
/ /	/ /	/ /
Nombre: Andrés Felipe Zea V	Nombre: Beatriz Parra	Nombre:
Firma:	Firma:	Firma:
Fecha de Aplicación: / /	Período Revisión: / /	

1. OBJETIVO

Purificar los linfocitos T reguladores (Treg) por separación inmunomagnética de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺CD127^{dim/-} de líquido cefalorraquídeo de pacientes con infecciones oportunistas del sistema nervioso central asociadas a SIDA.

2. EQUIPOS Y MATERIALES

- Gradillas para tubos de 12 x75 mm
- Tubos 12x75 mm de poliestireno transparentes con tapa
- Micropipetas de 1-10 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl.
- Puntas para micropipetas estériles de 50-200 µl y 100-1000 µl.
- Puntas para fluorocromos de baja retención estériles de 1-10 µL
- Centrífuga, Refrigerador y Cabina de flujo laminar
- Pipetas y Puntas 50-200uL y 100-1000U
- columnas MS

3. REACTIVOS

- CD4⁺CD25⁺CD127^{-/-} Regulatory T cell Isolation Kit (130-094-775)
 - Buffer de purificación:
- Preparar PBS pH7.2 (sin calcio), BSA 0.5%, EDTA 2mM y degasificar.
- Tubos falcon 15mL

- Columnas MS

4. PROCEDIMIENTO

Purificación LT CD4⁺ CD127^{-/-}

1. Descongelar PBMCs (Acorde al SOP)
2. Cuantificar el numero total de PBMC y su viabilidad
3. Resuspender el pellet de células en 40uL de buffer por 10^7 células totales.
4. Adicionar 10uL de CD4⁺CD25⁺CD127^{-/-} Biotinilado. (por $c/10^7$ células totales)
5. Incubar 15min (2-8°C)
6. Adicionar 30uL de buffer y 20uL de anti-Biotina (por $c/10^7$ células totales).
7. Mezclar e incubar 15min (2-8°C)
8. Lavar con 1-2mL de buffer (por $c/10^7$ células totales) y centrifugar a 300xg por 10 min (3.5-7mL buffer)
9. Resuspender en 500uL de buffer.
- 10.

Separación en columnas MS (Selección Negativa)

1. Purgar con 0.5mL la columna
2. Aplicar la suspensión de células (500uL)
3. Recolectar las células que pasen a través de la columna (selección Negativa)
4. Lavar 3 veces con 0.5mL de buffer
- 5.

Purificación de Treg (CD25⁺)

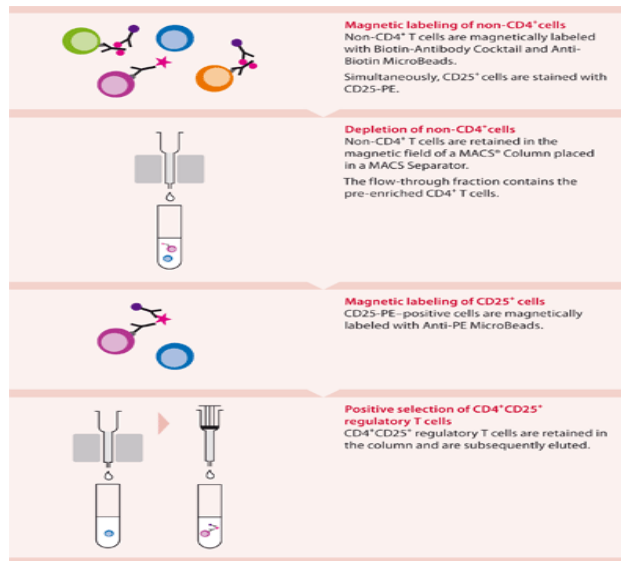
1. Centrifugue a 300xg por 10 min a 10°C
2. Resuspender el pellet de células en 90uL de buffer por 10^7 células totales
3. Adicionar 10 uL de CD25 microbeadsII
4. Mezcle e incube por 30 minutos (2-8°C)
5. Lavar con 1-2mL de buffer y centrifugar a 300xg por 10 min
6. Resuspender en 500uL de buffer.

Selección Positiva LTCD4⁺CD127^{-/-}CD25⁺ con columna MS.

1. Purgar con 500uL de buffer
2. Aplicar las células en suspensión
3. Lavar la columna 3 veces con 500uL de buffer
4. Si se va a hacer un segundo round se debe adicionar 1mL directamente a la columna #1(alejada del magneto) sobre la columna #2

5. REFERENCIAS

1. <https://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001600/I M0001692.ashx>



ANEXO VII: PROTOCOLO DE EXPANSION DE TREG DEL LCR

SOP No. 00

Grupo: Virus Emergentes y Enfermedad

Página 198 de 201

Sección: Perfil de marcadores de Neuroinflamación

Título: EXPANSIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES (Treg) EN CULTIVO		
Aprobación / Fecha : -----		
Autor/Responsable	Dirección	Control Calidad
/ /	/ /	/ /
Nombre: Andrés Felipe Zea V	Nombre: Beatriz Parra	Nombre:
Firma:	Firma:	Firma:
Fecha de Aplicación: / /	Período Revisión: / /	

1. OBJETIVO

Aumentar la cantidad de linfocitos Treg del LCR para evaluar su potencial proliferativo en el foco de la patología oportunista (LCR) asociada al VIH/SIDA.

2. EQUIPOS Y MATERIALES

- Tubos falcón 15mL
- Pipetas y Puntas 50-200uL y 100-1000UI
- Gradillas para tubos de 12 x75 mm
- Tubos 12x75 mm de poliestireno transparentes con tapa
- Micropipetas de 1-10 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl.
- Puntas para micropipetas estériles de 50-200 µl y 100-1000 µl.
- Puntas para fluorocromos de baja retención estériles de 1-10 µL
- Centrífuga, Refrigerador y Cabina de flujo lamina

- Cajas de cultivo de 96 pozos fondo redondo

3. REACTIVOS

- Culture Medium RPMI 1640
- 2mM L-glutamine
- Suero fetal Bovino
- penicillin/streptomycin
- Dynabeads® Human Treg Expander Cat. no. 111.29D
- rIL-2 Gibco® PHC0021

4. PROCEDIMIENTO

Protocolo de Expansión de Treg humanas

Día 0:

1. Se debe iniciar con 10^5 células (por pozo de placa de 96)
2. Cultivar en un plato de 96 pozos de fondo redondo
3. Adicionar 20 μ l de Dynabeads Human Treg Expander en una relación de 4 perlas por cada Treg como se muestra en la Tabla 1.
4. Adicionar 500-1000 U/ml rIL-2 (Gibco PHC0021) tener en cuenta que 1 μ g=16000U

Día 3-4:

Resuspender y dividir a la mitad o las veces que sea necesario segun el recuento celular y adicionar medio de cultivo fresco con IL-2 a una concentración de 500-1000 U/ml

Día 5-7:

Dividir el cultivo cuando lo necesite. Examinar el cultivo diariamente. Contar las celulas al menos 2 veces a la semana. Cuando la densidad exceda 2×10^6 cells/ml o el medio se torne amarillo se debe dividir el cultivo a una densidad de $0.5-1.0 \times 10^6$ cells/ml.

Día 8:

Remueva las Dynabeads por resuspensión de las células en medio de cultivo (sin IL-2) y el paso por un magneto por 1-2 minutos (Puede ser el MCP-1 disponible en el laboratorio). Centrifugue el sobrenadante resuspenda en medio de cultivo nuevo con 100 U/ml rIL-2. Divida el cultivo cuando sea necesario para obtener la cantidad de células que necesita. Cultive hasta por 21-24 días.

5. BIBLIOGRAFÍA.

http://www.b2b.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and_Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Cell-Isolation-and-Expansion/Dynabeads-Regulatory-CD4-CD25-T-Cell-Kit.html#expansion.

Table 1

Volume/Number of Treg Cells	1×10^5 Treg Cells	1×10^6 Treg Cells
Type of Culture	Per well in 96-well tissue culture plate	Per well in 24-well tissue culture plate
Dynabeads Treg Expander	20 μ l	200 μ l
rIL-2	500 U/ml rIL-2	500 U/ml rIL-2
Seeding Volume (medium)	100 μ l	1 ml

ANEXO VIII: PROTOCOLO DE TINCION CON CFSE PARA EVALUACION DE LA PROLIFERACION CELULAR

Nota: Protocolo optimizado por Carlos A. Garcia-Santana M.D., Ph.D

1. OBJETIVO

Evaluar en los linfocitos T (CD4 o CD8) la perdida de la intensidad de la fluorescencia del CFSE (**carboxi**-fluorescein diacetato succinimidil ester) por citometría de flujo después de la estimulación del CD3/CD28.

2. PROCEDIMIENTO

- Diluir CFSE: Preparar 2.5 ul CFSE Stock sol (5 mM in DMSO*) to 20 ml PBS (fresh)
- Lavar las células (1 to 20 millón) dos veces en PBS (no suero) (1500 rpm 5 min RT)
- Adicionar 500 ul PBS y mezclar
- Dejar 1 million de celulas en un tubo para un control sin tincion.
- Adicionar 500 ul de CFSE diluido a 500 ul de suspension celular (1- 20 million cells)
- Incubar las celulas a temperature ambiente (RT) por 5 minutes. (Respetar el tiempo es importante.)
- Adicionar igual volumen de SFB frio(1 ml)
- Incubar por 1 min at 4°C
- Adicionar 10 ml de PBS Frio a las celulas.
- Centrifugar at 1500 rpm for 5 min, RT
- Resuspender en medio de cultivo completo.
- Contar en cámara de newbauer y evaluar la viabilidad ajustando a 1×10^6 /ml en medio completo.

* El CFSE se disuelve en DMSO y se congelan alicuotas a su decision. Las alicuotas solo se utilizan para los experimentos del día.

Carlos GS

Carlos A. Garcia-Santana M.D., Ph.D.
Staff Advanced Research Scientist
Beckman Coulter, Inc.