

MACROFAGOS INFECTADOS POR HIV AISLADOS DE PACIENTES HIV+ CON CARGA VIRAL INDETECTABLE LUEGO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL COMBINADO*

LILIANA BELMONTE¹, PATRICIA BARE, MARCELO CORTI², MARIA MARTA BRACCO³, BEATRIZ RUIBAL-ARES³

Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina; Buenos Aires

Resumen Se desarrolló un método de cultivo prolongado de células mononucleares periféricas, sin estímulo (CMP s/e) que permite la proliferación y diferenciación completa de los macrófagos (M). Con el mismo se demostró la replicación *in vitro* del HIV en pacientes HIV+ con carga viral negativa luego de más de un año de tratamiento HAART. Las células infectadas siempre fueron M. Utilizando el sistema estándar de co-cultivo con CMP activadas con PHA e IL-2 (CM-PHA) no se habían logrado aislamientos en estos pacientes. Los sobrenadantes (SN) con p24 > 65 pg/ml fueron infectivos para *target* CMP s/e normales, pre-cultivados 6-7 días. En comparación se utilizaron CMP-PHA. En CMP s/e predominan los M proliferantes (CD64+, Ki67+) y en CMP-PHA los blastos T (CD3+, Ki67). La expresión de CCR5 fue mayor en CMP s/e que en CMP-PHA. Estas diferencias pueden explicar por qué el sistema CMP s/e es más sensible que CMP-PHA para detectar la infección por HIV en pacientes asintomáticos con carga viral indetectable, con cepas de HIV macrófago trópicas (R5).

Palabras clave: macrófagos, HIV, HAART

Abstract *HIV infected macrophages isolated from HIV+ patients with undetectable viral load undergoing highly active antiretroviral therapy.* A new method of culture of peripheral blood leukocytes (PBMC) from HIV+ patients, in the absence of exogenous stimuli (allogeneic cells or cytokines) (PBMC w/s) was used for the detection of persistent viral infection in HIV patients who had undergone successful highly active antiretroviral therapy (HAART) lowering their viral burden to undetectable levels (< 50 RNA copies/ml). Infected cells were always of the monocyte/macrophage lineage (M). No infection could be detected in these patients using the classical system (co-culture with HIV-CMP activated with PHA and IL-2). Differences in the class of target cells (higher proportion of proliferating M and CCR5 expressing cells in the PBMC w/s system than in PBMC-PHA cultures) may determine the relative sensitivity of each technique to achieve successful isolation of HIV from different patients.

Key words: macrophages, HIV, HAART

El advenimiento de los nuevos regímenes terapéuticos combinados de alta eficacia compuestos de dos inhibidores de la transcriptasa reversa y un componente anti-proteasa (HAART), logró reducir la carga viral plasmática a niveles no detectables, aumentar el número de linfocitos T CD4+ y mejorar la calidad de vida y el tiempo de supervivencia de los pacientes infectados con HIV¹. Sin embargo, no ha sido posible erradicar la infección, ya que la interrupción del tratamiento provoca la reaparición de partículas virales plasmáticas y el descenso de linfocitos T CD4, aun luego de períodos prolongados de tratamiento exitoso². La replicación del HIV es continua

a lo largo de todas las etapas de la enfermedad, aún en el período asintomático posterior a la infección primaria que antecede por años al desarrollo del SIDA³. Esto puede deberse a la existencia de un estado de latencia de la infección en células en reposo o a la presencia de replicación continuada a bajo nivel en células relativamente inaccesibles a la acción de los medicamentos antirretrovirales⁴. Ambos mecanismos contribuyen a hacer que la expectativa original de eliminar la infección con el tratamiento antirretroviral⁵ sea poco probable. Por estas razones resulta muy importante contar con sistemas de detección de la infección que permitan certificar la persistencia de la infección en distintos tipos celulares en los pacientes bajo tratamiento prolongado con HAART.

En este trabajo nos propusimos identificar las células que mantienen la infección persistente por el HIV, en los pacientes que logran disminuir su carga viral plasmática a valores no detectables con técnicas de gran sensibilidad.

¹ Becaria de la Academia Nacional de Medicina (Fundación René Baron),

² Fundación Argentina de Hemofilia, Buenos Aires

³ Miembro de la Carrera del Investigador del CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

dad. Esto tiene especial interés para monitorear el efecto del tratamiento antirretroviral sobre distintos tipos celulares capaces de albergar la infección por el HIV y diseñar esquemas terapéuticos adecuados a ese fin.

Se realizaron cultivos de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes HIV+ y controles HIV-, en ausencia de estímulo (CMP s/e), como fuera descrito previamente⁶. La replicación del HIV en los cultivos se demostró midiendo por ELISA la concentración de la proteína del core viral p24 en el sobrenadante (SN) de los cultivos. Para comprobar la infectividad de los SN p24+, se infectaron CMP s/e HIV- pre-cultivados por 6-7 días, evaluando la liberación de p24 entre 7 y 20 días post infección (p.i.). En comparación se utilizó la técnica estándar

de detección de infectividad, infectando cultivos primarios de CMP estimuladas con mitógenos (PHA) e interleukina-2 (IL-2) (CMP-PHA), y midiendo la liberación de p24 entre 2-14 días p.i.⁷. La naturaleza de las células infectadas se determinó analizando su morfología y fenotipo por microscopía de fluorescencia y por citometría de flujo (citómetro de flujo FACScalibur, programa CellQuest para análisis), utilizando anticuerpos monoclonales para linfocitos (CD3, CD4, CD8, CD20), para células de estirpe monocito macrofágica (M/M) (CD14, CD64) y para los co-receptores del HIV (anti CXCR4, anti CCR5). La infección de las células por el HIV se estudió determinando la presencia de p24 intracelular (en células permeabilizadas) marcadas con el anticuerpo monoclonal

TABLA 1.- *Replicación de HIV en cultivos de CMP de pacientes con carga viral no detectable*

Paciente	Fecha	CDC	Tratamiento	Meses de tratamiento	CD4 cel/ml	p24 en SN pg/ml
A) Carga viral plasmática < 400 copias de RNA HIV/ml						
N° 1	28-7-97	C3	AZT+3TC+IND	8	138	2 300
N° 2	10-4-97	A2	AZT+ddl+SAQ	7	319	41
N° 3a	6-9-98	C3	AZT+3TC+IND	10	685	140
N° 4a	3-3-99	A1	d4T+3TC+NFV	18	893	1 500
N° 4b	10-8-99	A1	d4T+3TC+IND	23	811	34
N° 5	20-11-97	A2	AZT+3TC+IND	5	458	Neg
N° 6a	30-3-98	A3	AZT+3TC+NFV	8	63	63
N° 7a	22-4-97	B3	AZT+3TC+IND	2	339	91
N° 7b	1-4-98	B3	AZT+3TC+IND	14	69	90
N° 8	11-5-98	A3	d4T+3TC+NFV	8	105	42
N° 9a	22-7-98	B2	AZT+ddC+SAQ	22	772	81
N° 10	8-2-99	A2	AZT+3TC+IND	13	512	218
N° 11	27-10-99	C3	AZT+3TC+IND	22	182	2 800
N° 12	4-11-99	B2	AZT+3TC+IND	18	246	61
N° 13	23-9-99	B2	d4T+3TC+NVP	12	450	2 610
B) Carga viral plasmática < 50 copias de RNA HIV/ml						
N° 3b	31-3-99	C3	AZT+3TC+IND	17	525	Neg
N° 3c	28-7-99	C3	AZT+3TC+IND	21	547	65
N° 14	30-7-99	B2	AZT+ddl+IND	24	1036	78
N° 15	10-3-99	C3	d4T+3TC+IND	11	151	Neg
N° 9b	30-7-99	B2	AZT+ddC+NFV	22	629	113
N° 16	2-12-98	B3	AZT+3TC+IND	18	238	Neg
N° 6b	3-11-98	A3	AZT+3TC+IND	14	137	Neg
N° 17a	2-2-99	A1	AZT+3TC+IND	20	931	31
N° 17b	22-6-99	A1	AZT+3TC+IND	24	1448	121
N° 18	11-3-99	C3	d4T+3TC+NFV	11	317	26

Se colocaron CMP de pacientes HIV+ con carga viral menor que 400 copias de RNA HIV/ml (A, técnica estándar) o menor que 50 copias de RNA HIV/ml (B, técnica ultrasensible), en cultivo de CMP sin estímulo. Los resultados de p24 en los SN de cultivo corresponden a los valores máximos hallados en SN tomados entre los días 5 y 21 de cultivo. Se consideraron positivos los valores superiores a 25 pg/ml.

KC57 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) o con ficoeritrina (PE) o con los correspondientes controles de isotipo marcados con FITC o PE. Para descartar el marcaje inespecífico luego del cultivo, se compararon los resultados con los obtenidos con controles de CMP HIV- cultivadas en forma similar. Para evaluar la activación celular, se determinó el nivel de expresión de CD38⁸ y en el caso de M/M, la expresión de CD16⁹. Para determinar qué células estaban en la fase proliferativa del ciclo celular, se estudió la expresión del antígeno Ki67. La carga viral (CV) plasmática se midió con la técnica de RT-PCR estándar (Amplicor, Roche, límite inferior 400 copias RNA viral/ml) o ultrasensible (límite de detección 50 copias RNA viral/ml).

Los resultados indican que la técnica de cultivo de CMP s/e permite rescatar el HIV de CMP de pacientes HIV+ cuya CV se negativizó luego del tratamiento HAART por más de 1 año (Tabla 1). En 15/15 pacientes con CV < 400 copias RNA/ml, los cultivos fueron positivos (p24 en el SN de 9-28 días: 857 ± 301 pg/ml). En 6/10 pacientes con CV < 50 copias RNA/ml, también se obtuvieron resultados positivos (p24 en el SN de 5-21 días: 72 ± 16 pg/ml). Los métodos convencionales con CMP-PHA+IL-2, no tuvieron éxito en estos casos. Las células infectadas (p24+) en estos cultivos eran M/M. Los SN con p24 > 65 pg/ml fueron infectivos para CMP s/e pre-cultivadas por 6-7 días. La sensibilidad de CMP-PHA fue diez veces menor. Al comparar la composición de las células utilizadas como blanco de la infección por SN p24+ (CMP s/e vs CMP-PHA) se observó que diferían en la proporción y estado de activación de M/M y en la expresión de los co-receptores CCR5 (Tabla 2). En CMP s/e, los M/M presentaban marcadores de activación (CD16 y CD38) y 57 ± 4% de las células CD64+ estaban en la fase proliferativa a juzgar por la expresión de Ki67¹⁰.

En cambio, en CMP-PHA 83 ± 3% de los linfocitos T (CD3+) eran Ki67+, pero sólo 6% de los M/M (CD64+) eran Ki67+. Se sabe que la infección productiva de HIV en M/M requiere que estas células, además de portar los receptores y co-receptores adecuados (CD4, CCR5), hayan sobrepasado la etapa tardía de G1 en el ciclo celular⁹. Las diferencias observadas entre CMP s/e y CMP-PHA podrían explicar por qué el sistema de cultivo CMP s/e es más adecuado para sustentar la replicación de HIV en M/M que el método estándar con CMP-PHA. Además de la mayor expresión del co-receptor CCR5, requerido para la replicación de las cepas macrófago-trópicas presentes preferentemente en los pacientes asintomáticos, el cultivo de CMP s/e provee mayor proporción de M/M en fase proliferativa. Los resultados de este estudio sugieren que es conveniente evaluar la persistencia de infección por HIV en los M/M de los pacientes que reciben HAART, pues pueden desempeñar un importante papel como reservorios de la infección, cuan-

TABLA 2.– Comparación entre las células utilizadas como blanco de la infección por HIV en la técnica de cultivo clásica con estímulo mitogénico (CMP-PHA) y la técnica de cultivo de CMP sin estímulo exógeno (CMP s/e)

Expresión antigénica al tiempo de infección n=4	CMP-PHA+IL-2 (48-72 hs) %	CMP s/e (6-7 días) %
CD3	80 ± 8	79 ± 1
CD64	5 ± 3	10 ± 1*
CCR5	3 ± 2	24 ± 5**
CXCR4	89 ± 1	96 ± 4
Ki67,CD3	83 ± 3	12 ± 4*
Ki67, CD64	6 ± 2	57 ± 4

Diferencias entre CMP-PHA y CMP s/e, * $p < 0.02$; ** $p < 0.001$. Se determinó la expresión antigénica (%) en la región de células vivas de cultivos de CMP-PHA y CMP s/e, en los tiempos correspondientes al día de infección con HIV (SN HIV+), utilizando los anticuerpos monoclonales correspondientes. Los estudios de expresión de Ki67 se realizaron sobre células permeabilizadas y fijadas, analizando la región correspondiente a linfocitos (CD3) o macrófagos (CD64).

do ésta es controlada por el tratamiento en los linfocitos T CD4 activados.

Bibliografía

1. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. and the HIV Outpatient Study Investigators. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998; 338: 853.
2. Sharkey ME, Teo I, Greenough T, et al. Persistence of episomal HIV-1 infection intermediates in patients on highly active antiretroviral therapy. *Nature Med* 2000; 6: 76.
3. Dornadula G, Zhang H, Van Uiter B, et al. Residual HIV-1 RNA in blood plasma of patients taking suppressive highly active antiretroviral therapy. *JAMA* 1999; 282: 1627.
4. Chun T-W, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997; 387: 183.
5. Finzi D, Blankson J, Siliciano J, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nature Med* 1999; 5: 512.
6. Ruibal-Ares B, Riera NE, de Bracco M.M.E. Macrophages, multinucleated giant cells and apoptosis in HIV+ patients and normal blood donors. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82: 102.
7. Coligan JE, Kruisbek AM, Margulies, E, et al. Isolation and quantitation of HIV in peripheral blood. *Curr Protocols Immunol* 1993; Suppl 5: 12.2.1.
8. Mehta Z, Shaid U, Malavasi F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J* 1996; 10: 424-8.
9. Kootstra NA, Schuitemaker H. Proliferation dependent replication in primary macrophages of macrophage-tropic HIV type-1 variants. *AIDS Res Hum Retrovir* 1998; 14: 339-45.
10. Sachsenberg N, Perelson AS, Yerly S, et al. Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J Exp Med* 1998; 187: 1295-303.