

EXPRESION DE CO-RECEPTORES PARA EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH) LUEGO DEL CULTIVO DE LEUCOCITOS MONONUCLEARES (LM) DE PACIENTES VIH+

LILIANA BELMONTE, MARÍA MARTA DE ELIZALDE DE BRACCO, BEATRIZ RUIBAL-ARES

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

Resumen Se estudiaron variaciones en la expresión de los co-receptores CXCR4 y CCR5 luego del cultivo no estimulado de LM de pacientes VIH+ por periodos de 3 a 20 días. El porcentaje de células CCR5+ descendió tanto en linfocitos T CD4+ como en T CD8+ luego de 7 días, manteniéndose disminuido hasta los 20 días. En cambio los niveles de CXCR4 se mantuvieron estables durante el cultivo en ambas subpoblaciones. En los cultivos de LM de donantes VIH- no hubo cambios significativos en la expresión de CCR5 ni en la de CXCR4. Para comprobar si la disminución de CCR5 estaba asociada a la replicación viral, se infectaron LM VIH- (pre-cultivados por 6 días) con sobrenadantes de cultivos de LM VIH+. Luego de 3 días de infección, la expresión de CCR5 se redujo tanto en linfocitos T CD4+ como en linfocitos T CD8+, coincidiendo con la replicación viral durante el cultivo.

Palabras clave: Co-receptores, infección VIH, cultivo leucocitario, CCR5, CXCR4

Abstract *HIV co-receptors expression in mononuclear leucocytes of HIV+ patients.* Variations of the expression of CXCR4 and CCR5 HIV co-receptors after non stimulated culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV+ patients were studied. Expression of CCR5 on both CD4+ and CD8+ T lymphocytes was reduced after 7 days and remained low throughout the culture. CXCR4 levels remained stable in both lymphocyte subpopulations. No significant changes were observed in control HIV- PBMC cultures. In order to ascertain if the CCR5 changes were associated to in vitro HIV replication, 6 days pre-cultured HIV- PBMC were infected with HIV+ culture supernatants. After 3 days CCR5 expression was reduced both in CD4+ and in CD8+ T lymphocytes, while CXCR4 expression was not, coincident with initiation of HIV replication in culture. These results suggest that CCR5 down modulation in CD4+ or CD8+ T lymphocytes is a consequence of HIV replication.

Keywords: co-receptors, HIV infection, leucocytes, culture, CCR5, CXCR4

La interacción del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) con las células susceptibles se inicia con la unión del VIH con la molécula CD4 y con los co-receptores para las quimioquinas (CXCR4 y CCR5, respectivamente). El uso de un co-receptor determinado depende de características propias del virus infectante. Así, los virus aislados durante las etapas asintomáticas de la infección utilizan preferentemente el co-receptor CCR5 (virus R5) mientras que algunos virus aislados en etapas tardías de la infección, con tropismo por linfocitos T de líneas continuas, utilizan el CXCR4 (X4)¹. Por otra parte algunos aislados virales (cepas con tropismo dual, X4R5) pueden utilizar ambos co-receptores. En la membrana celular, la molécula CD4 forma un complejo con los co-receptores CCR5 o CXCR4. Este se une a la

glicoproteína gp120 de la envoltura viral formando un complejo trimolecular necesario para que suceda la fusión del virion con la célula infectada^{2, 3}. La mayoría de las células infectables por VIH expresan CXCR4, pero en macrófagos y linfocitos no pertenecientes a líneas de laboratorio, el VIH utiliza preferentemente el CCR5 y no el CXCR4 igualmente presente en la superficie celular¹. Recientemente describimos un método de cultivo de leucocitos mononucleares (LM) de pacientes VIH+ que permite la replicación de las variantes virales propias de cada paciente, en las células del mismo paciente, en ausencia de estimulación o co-cultivo alogeneico⁴. En este sistema la replicación ocurre fundamentalmente en linfocitos y macrófagos infectados con VIH R5⁵. En este trabajo estudiamos las variaciones en la expresión de los co-receptores CCR5 y CXCR4 que ocurren a lo largo del cultivo no estimulado de LM de pacientes VIH+ (LM VIH+) en comparación con LM de individuos seronegativos (LM VIH-). La expresión de los co-receptores de VIH en linfocitos CD4+ y CD8+ se valoró por

citometría de flujo luego de diferentes períodos de cultivo, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CCR5 y anti-CXCR4 marcados con fluorocromos (Pharmingen, Biosystems, Buenos Aires, Argentina). Se estudiaron pacientes con hemofilia VIH+ bajo tratamiento antiretroviral combinado ininterrumpido por 3 meses a 3 años. Los resultados presentados en la Tabla 1, demuestran que luego de 7 días de cultivo la expresión de CCR5 se redujo tanto en los linfocitos CD4+ como en los linfocitos CD8+ de LM VIH+, manteniéndose por debajo de los niveles originales. En cambio, la expresión de CXCR4 se elevó luego del cultivo de LM VIH+ y LM VIH-.

Para comprobar si el efecto de reducción de CCR5 observado al cultivar LM VIH+ estaba relacionado a la replicación de VIH *in vitro*, se infectaron LM VIH- que

habían sido pre-cultivados durante 6 días, con sobrenadantes libres de células (SN) cosechados en el momento óptimo de liberación de p24, alrededor de 15-20 días de cultivo de LM VIH+ ⁵. Los resultados presentados en la Figura 1 revelan que la expresión de CCR5 en linfocitos CD4+ se reduce abruptamente luego de 3 días de infección de LM VIH- con SN VIH+ (pre-infección: 13±2%; 3 días p.i. 2.4 ± 1.2; p<0.01, n=4). En cambio la expresión de CXCR4 no decae. Analizando la subpoblación CD8+ los resultados son similares.

Varios factores pueden determinar este efecto sobre las células cultivadas. En primer lugar, es notable la coincidencia temporal de la reducción de CCR5 con el momento de iniciación de la replicación de VIH *in vitro*, la cual a su vez está ligada a los cambios en la diferen-

TABLA 1.- Expresión de CCR5 y CXCR4 en linfocitos T CD4+ y CD8+.

	CCR5 / CD4 (%)					CCR5 / CD8 (%)				
	0	1	7	14	20	0	1	7	14	20 ^a
HIV+	15 ± 6	15 ± 4	7 ± 2*	13 ± 2	9 ± 1	31 ± 8	22 ± 5	8 ± 6*	30 ± 7	32 ± 13
N	14 ± 1	12 ± 4	21 ± 4	23 ± 2	23 ± 6	25 ± 3	24 ± 5	29 ± 5	37 ± 5	45 ± 4

	CXCR4 / CD4 (%)					CXCR4 / CD8 (%)				
	0	1	7	14	20	0	1	7	14	20
HIV+	69± 13	99±0.2	93 ± 3	87 ± 6	97 ± 3	63 ± 5	98 ± 1	98 ± 1	95 ±10	89 ± 3
N	80 ± 4	100 ± 0	97 ± 1	89 ± 3	77 ± 8	57 ± 7	100 ± 0	98 ± 0	95 ± 1	89 ± 3

Se aislaron por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque LM de pacientes HIV+ (n=6) y de controles seronegativos (n=6) y se cultivaron en ausencia de estímulo exógeno. A diferentes tiempos se determinó por citometría de flujo el porcentaje de linfocitos de las subpoblaciones CD4 o CD8 que portaban CCR5 o CXCR4. Se consignan los valores de la Media ± ES en cada caso. * p <0.01, test de Student.

^a Días de cultivo: 0, 1, 7, 14, 20.

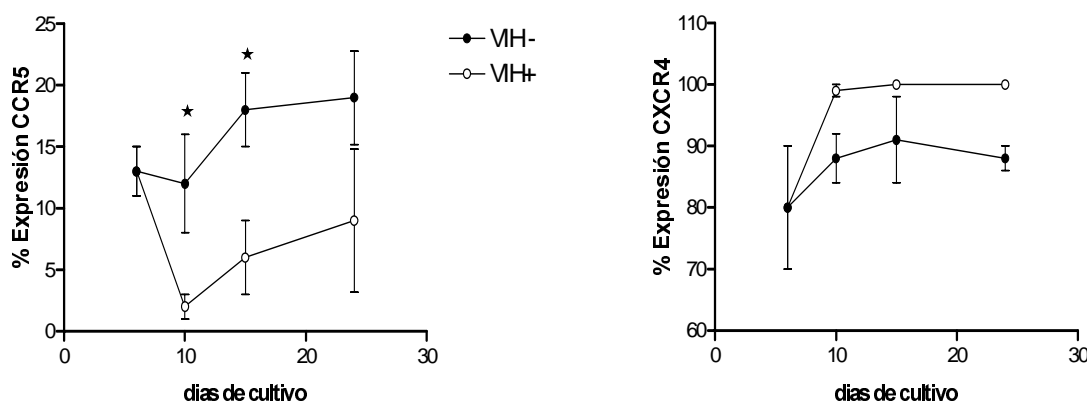


Fig. 1.- Cambios en la expresión de CCR5 y CXCR4 en linfocitos T CD4+ provocados por la infección de LM VIH- por sobrenadantes libres de células conteniendo VIH infeccioso. Se cultivaron LM VIH- por 6 días para lograr la organización de agregados celulares. Luego se infectaron los cultivos con sobrenadante libre de células conteniendo VIH infeccioso derivado de un cultivo no estimulado de LM HIV+. A diferentes tiempos post infección (3, 6-8 y 17 días) se determinó la proporción de CCR5 / CD4 y CXCR4 / CD4 y se compararon los resultados con los de los mismos LM VIH- sin el agregado de VIH. Los resultados corresponden a la Media±ES. * Valores significativamente diferentes, p< 0.01, test de Student.

ciación y entrada en el ciclo celular de las LM en el cultivo⁵. Ya que CCR5 forma con CD4 y gp 120 un complejo trimolecular, la internalización del mismo al ocurrir la fusión del virion con la membrana plasmática podría explicar en parte los resultados obtenidos con las células CD4+^{2, 3}. Sin embargo, los cambios de expresión de CCR5 en linfocitos CD8+ no pueden atribuirse a este mecanismo. Alternativamente, se pueden considerar mecanismos indirectos de modulación de la expresión de CCR5 post infección que pueden operar tanto en linfocitos CD4+ como en los linfocitos CD8+ que están en contacto con ellos. Así, se sabe que la infección por VIH suscita la liberación de quimioquinas estas podrían intervenir regulando negativamente la expresión de CCR5 que es uno de los principales receptores para las mismas⁶. Este mecanismo no requiere de la presencia de CD4 y por lo tanto podría actuar tanto sobre los linfocitos CD4+ como sobre los linfocitos CD8+.

En todo caso, resulta importante analizar los factores que determinan la expresión de CCR5 sobre los linfocitos pues pueden afectar la eficiencia de la infección por el VIH. Esto es de particular importancia al encarar el tratamiento con antagonistas sintéticos del CCR5 como agentes de interferencia durante las etapas iniciales de fusión viral en el período asintomático de la enfermedad⁷ o para evitar la transmisión de la madre VIH+ al feto que involucra fundamentalmente al CCR5¹.

Referencias

1. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 657-700.
2. Xiao X, Wu L, Stantchev TS et al. Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7496-7501.
3. Lee S, Lapham CK, Chen H et al. Coreceptor competition for association with CD4 may change susceptibility of human cells to infection with T-tropic or macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type-1. *J Virol* 2000; 74: 5016-23.
4. Ruibal-Ares B, Riera NE, de Bracco MME. Macrophages, multinucleated giant cells and apoptosis in HIV+ patients and normal blood donors. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82: 102-116.
5. Ruibal-Ares B, Belmonte L, Bare P, Bayo-Hanza C, Mendez G, Perez Bianco R, Tezanos Pinto M, de Bracco MME. Monocyte differentiation and HIV replication after prolonged culture of peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected individuals. *Cell Immunol* 2001; 210: 11-20.
6. Vila-Coro AJ, Mellado M, Martín de Ana A, Martínez C, Rodríguez Frade JM. Characterization of RANTES and amino oxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of G protein-coupled receptor complex. *J Immunol* 1999; 163: 3037-44.
7. Mosier DE, Picchio GR, Gulizia RJ et al. Highly potent RANTES analogues either prevent CCR5-using human immunodeficiency virus type-1 infection in vivo or rapidly select CXCR4-using variants. *J Virol* 1999; 73: 3544-50.

Ganador Premio "Dr. Patricio M. Cossio"