

SESIÓN DE MESA REDONDA N.º 1 (MR1)

ETIOPATOGENIA Y DIAGNÓSTICO VÍRICO DE LABORATORIO

Moderadora:

MR1.m1 **L. Pérez Álvarez**
Centro Nacional de Biología Fundamental.
Instituto de Salud "Carlos III".
Majadahonda.

Comoderadora:

MR1.c1 **M.I. Herrera Calvet**
Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud "Carlos III".
Majadahonda.

Características patogénicas de las proteínas accesorias del VIH

MR1.p1 **M.E. González Portal** y **C. Perales**.
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa".
CSIC-Universidad Autónoma de Madrid.
Madrid.

La infección por el VIH produce citopatogenicidad directa y como consecuencia la pérdida progresiva de linfocitos T portadores del marcador CD4 en su membrana celular. Además, las variantes de VIH con mayor potencial citopático son los tipos dominantes que surgen durante la progresión hacia las últimas etapas de la infección¹. Entre los linfocitos T CD4+ infectados se distinguen dos poblaciones, una mayoritaria que permanece activada y soporta una replicación vírica muy activa, y otra minoritaria que permanece en estado de reposo y no produce replicación vírica o en todo caso ésta es mínima. Sin embargo, en este último grupo de linfocitos el virus produce numerosas alteraciones fenotípicas; durante el curso de la enfermedad los linfocitos T memoria sufren una sobreexpresión de determinados marcadores celulares, que normalmente están ausentes o se expresan en bajo nivel en las células no activadas y sin infectar. Así, las células T CD4+ en estado de proliferación mueren por el efecto citopático del virus o son destruidas por la respuesta inmune, mientras que las células T CD4+ memoria permanecen crónicamente infectadas e invisibles al sistema inmune. Esto hace que la vida media de un linfocito CD4+ con infección productiva sea de entre 1 y 2 días², mientras que la vida media de una célula T CD4+ con infección latente tenga una vida media de entre 6 y 30 meses. Recientemente se ha calculado la tasa de eliminación natural de esta subpoblación de linfocitos memoria, obteniéndose que deben transcurrir entre 10 y 60 años³ para que los pacientes sometidos a los actuales regímenes de terapia antirretrovírica de alta eficacia (TAAE) queden totalmente libres de estas células portadoras de virus. La amenaza constante que supone la posible activación de las células memoria y la aparición de mutantes resistentes a los fármacos utilizados ha planteado la necesidad de combinar, con las terapias actuales, algún agente activador de la expresión del virus. Una vez activada la expresión vírica, la respuesta inmune y el efecto citopático del virus completarían la destrucción de estas células refractarias a los actuales fárma-

cos y así se conseguiría la erradicación total del virus en el paciente. El análisis detallado de los factores que determinan el efecto citopático nos reportará información clave para aumentar en los pacientes la eficacia de los tratamientos terapéuticos.

Las proteínas accesorias del VIH desempeñan un papel decisivo en los mecanismos patogénicos desempeñados por el virus. Mediante interacciones con factores celulares implicados en el mantenimiento de los procesos metabólicos celulares, las proteínas accesorias consiguen optimizar la utilización por el virus de la maquinaria celular. El LTR del virus es más activo en la fase G2 del ciclo celular. La proteína *Vpr* detiene el ciclo de la célula infectada en esta fase y así maximiza la producción vírica en el corto período de supervivencia de la célula. Además, *Vpr* regula la activación e induce la apoptosis de los linfocitos infectados. La proteína *Vif*, en determinadas células y perdiendo su carácter accesorio, desempeña un papel esencial durante la replicación del virus. Así, en las células no permisivas, la proteína *Vif* incrementa de 10 a 100 veces la infectividad del VIH. De alguna manera, *Vif* contrarresta el efecto antivírico de las células. El mecanismo molecular desarrollado por *Vif* no se conoce, pero sí se sabe que su efecto se localiza en una de las últimas etapas del ciclo de replicación del virus (ensamblaje, gemación o maduración). Las proteínas accesorias *Vpu* y *Nef* han sido señaladas como responsables de la inhibición de proteínas de la superficie de los linfocitos infectados. Ambas proteínas colaboran en la eliminación del MHC-I de la superficie celular y de esta forma evitan que los linfocitos citotóxicos detecten la presencia de las células infectadas. Por un lado, la proteína *Vpu* induce la pérdida inmediata de las moléculas del MHC-I que se está sintetizando en la célula, impidiendo su exposición en la superficie de la célula⁴. Por otro lado, la proteína *Nef* induce la endocitosis de las moléculas de MHC-I que ya están expuestas en la superficie de la célula⁵. Esta inhibición de las moléculas del MHC-I es selectiva, sólo afecta a los alelos HLA-A y HLA-B. Si bien esta inhibición de la exposición de las moléculas de MHC-I no afecta a los alelos HLA-C y HLA-E y no es total para los alelos HLA-A y HLA-B, el virus utiliza este mecanismo para, sin llegar a una protección completa frente al sistema inmune, conseguir debilitar la respuesta inmune.

Igualmente, la proteína *Nef* y la proteína *Vpu* colaboran en la inhibición de la expresión del receptor CD4 en la superficie celular, mediante mecanismos similares a los uti-

lizados para inhibir las moléculas del MHC-I. El virus optimiza su infectividad utilizando dos estrategias: por un lado evita la reinfección por los viriones que están gemando de la célula infectada mediante la endocitosis del CD4 que está expuesto en la superficie de la célula infectada, y por otro lado facilita la incorporación de la proteína de la envuelta a la nucleocápsida mediante la rotura de las interacciones iniciales que se producen entre el CD4 y la proteína de la envuelta, inmediatamente después de haber sido sintetizadas ambas proteínas. Durante el ciclo de replicación vírica, la proteína *Nef* es dispensable en el período transcurrido desde la transcripción hasta la producción de virus. Sin embargo, la proteína *Nef* es crítica en las etapas tempranas del ciclo de replicación, correspondientes al período que va desde la adsorción del virión hasta la integración. En ausencia de proteína *Vpu* activa, el virus producido por la célula infectada permanece unido a la membrana de la célula y formando cadenas de partículas víricas unidas entre sí. Los virus deficientes en proteína *Vpu* que producen este tipo de infecciones aberrantes también producen efecto citopático, probablemente debido a la mayor concentración de glucoproteína de la envuelta y de molécula CD4 en la superficie de la célula.

Por tanto la proteína *Vpu* actúa a dos niveles: en el retículo endoplásmico modifica el transporte de algunas proteínas de superficie y a nivel de la membrana plasmática facilita la salida de viriones de la célula. De hecho, la región amino terminal de la proteína está formada por una acumulación de residuos hidrofóbicos y este dominio puede servir de anclaje a la proteína en la membrana⁶. El extremo carboxi de la proteína está constituido por dos hélices anfipáticas que interaccionan con la molécula del CD4 y constituyen el dominio citoplásmico de la proteína. La estructura terciaria de la proteína completa no se conoce, sólo se han hecho estudios, por separado, con cada uno de los dominios. Los datos disponibles hasta el momento hacen pensar en la posibilidad de dos conformaciones diferentes para la proteína según esté interaccionando con la membrana o en estado soluble⁷. Nosotros hemos comprobado mediante fraccionamiento subcelular que la mayoría de la proteína *Vpu* se encuentra interaccionando fuertemente con la membrana celular, comportándose como una proteína integral de membrana. Además, la proteína *Vpu* forma oligómeros, al igual que otras proteínas citopatógenas producidas por virus líticos que también son de pequeño tamaño y se integran en membrana produciendo alteraciones en las membranas de bacterias y células de mamífero⁸.

La citopatología producida por el VIH en las células T CD4+ se caracteriza por la formación de sincitios o la muerte individual de la célula. La formación de sincitios en las células infectadas precisa de la fusión entre membranas celulares mediada por la proteína de la envuelta del virus en la superficie de la célula y la molécula de CD4 en la superficie de las células adyacentes. Además, la fusión celular, promovida por la interacción del CD4 con la glucoproteína de la envuelta del virus, requiere la presencia de iones calcio aunque es independiente de la concentración de iones magnesio. El Ca^{2+} es requerido para que se produzca la fusión de membranas en un estadio posterior a la unión de las dos proteínas. El proceso de muerte de células individuales no está claro. Dado que la cinética de este tipo de muerte correlaciona con la cinética de la infección, se ha sugerido que la muerte de células indivi-

duales puede ser el resultado de la acumulación de efectos subletales producidos por el virus.

Por otra parte, también se ha sugerido que las interacciones glucoproteína de la envuelta-CD4 dan como resultado una continua distorsión de las membranas celulares. La capacidad reparadora de la célula es insuficiente para compensar esta agresión, y ésta sería la causa de la muerte de la célula. Se han observado variaciones en el contenido intracelular tanto de iones como de otras moléculas, y se postula que éstas deben estar motivadas por alguna alteración en la membrana celular^{9,10}. Una de estas variaciones es el incremento en la concentración de K^+ intracelular. La alteración en los niveles de Na^+ y K^+ intracelulares correlaciona con la inducción de efecto citopático en la célula infectada¹¹. La proteína *Vpu* puede ser la responsable de estas alteraciones en la célula infectada, ya que se ha demostrado su participación directa en la formación de canales específicos de cationes en membranas artificiales constituidas por bicapas lipídicas y en sistemas de mayor complejidad como los oocitos de *Xenopus* y las células de mono CV-1. Nosotros hemos visto que este efecto de la proteína *Vpu* de permeabilizar iones en membranas es extensible al paso de moléculas de bajo peso molecular. Todas estas observaciones, junto con el efecto estimulante de la proteína *Vpu* sobre la salida de viriones de la célula, conducen a un modelo en el cual la proteína *Vpu* se integra en la membrana de bacterias y células de mamífero y modifica la barrera celular al tránsito de iones y moléculas de tamaño pequeño. Esta distorsión de la membrana termina facilitando la salida de viriones a través de la membrana.

La proteína *Vpu* es una proteína tardía que se expresa a partir de los mismos mensajeros que la proteína de la envuelta. Esto determina que en las células portadoras de virus con bajo nivel de replicación vírica su presencia sea nula o mínima y por tanto no se produzca el efecto patogénico de la proteína *Vpu* sobre estas células. En células con infección productiva las cantidades de proteína *Vpu* y proteína de la envuelta son semejantes. Es característico que tanto los sincitios como las células individuales con infección de VIH-1 activa experimenten degeneración por hinchazón; el volumen de la célula llega a alcanzar tal magnitud que la membrana celular no puede mantener su integridad y se produce la lisis de la célula. Este fenómeno tan comúnmente observado es producido por las alteraciones del contenido iónico intracelular inducidas por la proteína *Vpu*. Otros lentivirus que carecen de proteína *Vpu*, como el VIH-2, poseen otras proteínas que mimetizan la función de la proteína *Vpu*. Igualmente, la proteína *Vpu* también tiene el efecto estimulador de la salida de viriones con los retrovirus primitivos que carecen de proteínas auxiliares.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 98/0644).

BIBLIOGRAFÍA

1. Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. Science 1988; 240:80-82.
2. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. Science 1996; 271:1.582-1.586.

3. Zhang L, Ramratnam B, Tenner-Racz K, et al. N Engl J Med 1999; 340:1.605-1.613.
4. Kerkau T, Bacik I, Bennink JR, Yewdell JW, Hünig T, Schimpl A, Schubert U. J Exp Med 1997; 185:1.295-1.305.
5. Schwartz O, Maréchal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Nature Med 1996; 2:338-342.
6. González ME, Carrasco L. Biochemistry 1998; 37:13.710-13.719.
7. Willbold D, Hoffmann S, Rösch P. Eur J Biochem 1997; 245:581-588.
8. Carrasco L. Adv Virus Res 1995; 45:61-112.
9. Cloyd MW, Lynn WS. Virology 1991; 181:500-511.
10. Lynn WS, Tweedale A, Cloyd MW. Virology 1988; 163:43-51.
11. Voss TG, Fermin CD, Levy JA, Vigh S, Choi B, Garry RF. J Virol 1996; 70:5.447-5.454.

Amplia circulación de una forma recombinante intersubtipo B/F de VIH-1 en Buenos Aires (Argentina)

MR1.p2 M. Thomson Okatsu.

Área de Patogenia Viral.

Centro Nacional de Biología Fundamental.

Instituto de "Salud Carlos III".

Majadahonda.

El análisis filogenético de las secuencias de las cepas circulantes de VIH-1 ha permitido clasificar las mismas en 3 grupos distintos, denominados M, N y O. De ellos, el M es el responsable de la pandemia global de la infección por VIH-1, mientras que los grupos N y O son minoritarios en África ecuatorial occidental. En el grupo M se distinguen a su vez 10 subtipos diferentes, denominados con las letras desde la A a la J, con una distancia genética de, al menos, el 15% en el gen *gag* y del 20% en *env*. Debido al fenómeno de la recombinación, las cepas recombinantes entre dos o más subtipos no son infrecuentes, y en algunas áreas son las predominantes, como la A/E (CM 240) en Tailandia, la A/G (IbNG) en África occidental y la A/G (Kal153) en Kaliningrado (Rusia)^{1,2}.

En este estudio presentamos los resultados del análisis filogenético de VIH-1 circulantes en Buenos Aires (Argentina). Frecuentemente, la caracterización filogenética de las cepas circulantes en una determinada área se ha hecho a base de secuenciar segmentos de los genes *env* y *gag*. De acuerdo con estas secuencias, estudios previos sugirieron que en Argentina predominaban los subtipos B y F, encontrándose recombinantes B/F en una minoría de individuos^{3,6}. En nuestro laboratorio, los resultados del análisis filogenético de transcriptasa inversa (TI) de individuos de Buenos Aires ha mostrado, por el contrario, que:

- 1) Los recombinantes B/F se encuentran ampliamente extendidos en Buenos Aires, siendo mayoritarios en mujeres y en usuarios de drogas inyectables (UDI).
- 2) Los puntos de recombinación son los mismos en todos los recombinantes, lo cual es altamente sugestivo de un origen común.

3) No se detectan virus de subtipo F "puro" (no recombinante).

Todo ello sugiere que los virus previamente clasificados como de subtipo F en Argentina son, en realidad, recombinantes B/F.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio

Las muestras proceden de 52 individuos adultos infectados por VIH, 32 hombres y 20 mujeres, atendidos en hospitales del área metropolitana de Buenos Aires. Los factores de riesgo son: contacto heterosexual en 28 individuos (13 hombres y 15 mujeres), contacto homosexual en 5 hombres, adicción a drogas inyectables en 6 individuos (3 hombres y 3 mujeres), y desconocido en 13 individuos (11 hombres y 2 mujeres).

Preparación de las muestras

Se obtuvieron células mononucleadas de sangre periférica mediante centrifugación de sangre completa sobre Ficoll. Las células fueron lisadas con un detergente no iónico, y el lisado fue sometido a tratamiento con proteinasa K. El lisado celular sin purificar se utilizó para amplificación de secuencias de proteasa (PR), TI o V3 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) anidada o semianidada.

PCR y secuenciación

Los *primers* utilizados para PCR fueron los siguientes:

1) Segmento 5' de TI:

1ª. PCR: RT-9 (5'-GTA CAG TAT TAG TAG GAC CTA CAC CTG TC-3') y RT-12 (5'-ATC AGG ATG GAG TTC ATA ACC CAT CCA-3').

2ª. PCR: RT-1 (5'-CCA AAA GTT AAA CAA TG G CCA TTG ACA GA-3') y RT-4 (5'-AGT TCA TAA CCC ATC CAA AG-3').

2) Segmento 3' de RT:

1ª. PCR: RTD-OS (5'-ATC TAT CAA TAC ATG GAT GAT TTG TAT GTA G-3') y RTD-A (5'-TAG CCA TTG CTC TCC AAT TRY TGT GAT-3').

2ª. PCR: RTD-NS (5'-ATA GGG CAG CAT AGA RCA AAA ATA GA-3') y RTD-A.

3) Proteasa:

1ª. PCR: PR-O-S (5'-GCT AAT TTT TTA GGG AAG ATC TGG CCT T-3') y PR-O-A (5'-TTT ATG GCA AAT ACT GGA GTA TTG TAT GGA-3').

2ª. PCR: PR-T-S (5'-AGC CCC ACC AGA AGA GAG AGC TT-3') y PR-O-A.

4) V3:

1ª. PCR: JA167 (5'-TAT CYT TTG AGC CAA TTC CYA TAC A-3') y JA170 (5'-GTG ATG TAT TRC ART AGA AAA ATT C-3').

2ª. PCR: JA168 (5'-ACA ATG YAC ACA TGG AAT TAR GCC A-3') y JA169 (5'-AGA AAA ATT CYC CTC YAC AAT TAA A-3').

La presencia del producto deseado se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. Los productos amplificados se purificaron mediante digestión de los deoxinucleótidos fosfatados (dNTPs) y los *primers* presentes en la solución con fosfatasa alcalina de gamba y exonucleasa I, respectivamente; y posteriormente se secuenciaron directamente utilizando