

## APOPTOSIS E INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV)

**BEATRIZ RUIBAL-ARES, LILIANA BELMONTE, PATRICIA BARÉ, MARÍA MARTA DE ELIZALDE de BRACCO**

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

**Resumen** La activación generalizada del sistema inmune luego de la infección por HIV conduce a la exacerbación de los mecanismos de apoptosis, no sólo en los linfocitos T CD4, sino también en linfocitos T CD8 y linfocitos B. Los macrófagos desempeñan un importante papel en la remoción de las células apoptóticas, impiden su acumulación en los cultivos *in vitro* y pueden contribuir a la eliminación selectiva de linfocitos CD4+ *in vivo*, a través de mecanismos indirectos. Se discute la utilidad de un procedimiento de cultivo de células mononucleares obtenidas a partir de sangre periférica de pacientes HIV+, para evaluar las interacciones celulares, la apoptosis y la multiplicación viral *in vitro*. El método no involucra el agregado exógeno de estímulos ni el co-cultivo con células alogeneicas, pero permite la replicación viral, especialmente en células de estirpe macrófaga. Se propone que la remoción de las células apoptóticas por los M/M durante el cultivo otorga el estímulo necesario para su diferenciación y para albergar la replicación viral *in vitro*.

**Abstract** *Apoptosis and HIV infection.* Generalized activation of the immune system after HIV infection leads to an exacerbation of all apoptotic mechanisms. CD4+, CD8+ T lymphocytes and B lymphocytes are sensitized to apoptotic stimuli. Macrophages are important in the removal of apoptotic cells, they prevent apoptotic cell accumulation during *in vitro* culture and they may lead to enhanced CD4+ T lymphocyte cell death through indirect mechanisms. A simple procedure for prolonged culture of peripheral blood mononuclear cells from HIV+ patients is discussed, in relation to its convenience to evaluate apoptosis, cell to cell interaction and HIV replication in the absence of exogenously added stimuli or co-culture of allogeneic cells. In this system, HIV replication takes place primarily in cells of macrophage lineage that may be activated into differentiation through removal of apoptotic debris during the culture.

**Key words:** apoptosis, HIV infection

Los estudios sobre la patogénesis de la enfermedad causada por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) han contribuido a establecer un vínculo entre la depleción linfocitaria T y la magnitud de la replicación del HIV *in vivo*. Sin embargo, los mecanismos por los cuales la replicación del HIV afecta la homeostasis de las células T no han sido totalmente aclarados. Se han identificado un conjunto de procesos capaces de ocasionar la muerte de las células T *in vitro* dentro del contexto de la infección por el HIV, pero en ningún caso se ha podido demostrar fehacientemente cuales son los que están realmente involucrados en la depleción selectiva de los linfocitos T CD4+ (T CD4) *in vivo*. El estado de inmunodeficiencia que define la etapa final de la infección por el HIV (síndrome de inmunodeficiencia adquirida, SIDA) es secundario al descenso numérico de los T CD4 y al trastorno funcional de los linfocitos CD4+ remanentes. Para explicar la depleción

de los T CD4 subsecuente a la infección por el HIV, se han propuesto mecanismos directos e indirectos. Los efectos citopáticos directos del virus y la formación de sincicios con pérdida de la viabilidad celular se sugieren como causa de la depleción selectiva de T CD4 en el SIDA. Pero es difícil probar que ocurren *in vivo* en la magnitud esperada para justificar la pérdida casi total del compartimiento linfocitario CD4.

La regulación fisiológica de la homeostasis de los T CD4 está influenciada por el balance entre la replicación y la muerte por apoptosis. Esta forma de muerte celular programada<sup>1,2</sup> está estrechamente regulada y depende, entre otras cosas, de la expresión de una familia de ligandos y sus correspondientes receptores relacionados al factor de necrosis tumoral (ligandos TNF, FasL, TRAIL, receptores TNFR, Fas/Apo-1/CD95, TRAIL R)<sup>3</sup> y del estado de activación de los T CD4<sup>4</sup>. Resultó lógico analizar el papel de la apoptosis en la depleción linfocitaria causada por la infección por el HIV, pensando que podría estar vinculada directa o indirectamente con la disminución del número de T CD4 circulantes y con el deterioro progresivo de su función.

Los trabajos de Gougeon y col<sup>5</sup> llamaron la atención acerca del aumento de la apoptosis post activación *in vitro*, observada en los cultivos de leucocitos mononucleares periféricos de pacientes HIV+. Estos autores propusieron que la muerte por apoptosis era una de las causas principales de la depleción de los linfocitos T CD4 en el SIDA. La interacción de los T CD4 con moléculas derivadas del virus (gp120, Tat) parecía "sensibilizar" a estos linfocitos tornándolos más lábiles a los estímulos de activación colocados en los ensayos *in vitro*<sup>6,7</sup>. Más adelante esta hipótesis fue cuestionada, pues se demostró que las células que morían por apoptosis en los cultivos, no eran solamente las CD4+. Por el contrario, el aumento de la apoptosis era más llamativo en los linfocitos CD8+ y aún en los linfocitos B CD20+<sup>8,9</sup>.

La activación linfocitaria y la replicación persistente del HIV son una constante desde el inicio de la infección, aún en las etapas asintomáticas. La activación continuada del sistema inmune se ha vinculado a la disfunción del sistema luego de la infección por el HIV y puede ser la raíz de la exacerbación del mecanismo de apoptosis. En este sentido, los estudios realizados sobre marcadores celulares de activación y apoptosis en diferentes estadios de la infección por el HIV, sugirieron una asociación entre la activación crónica del sistema inmune (causada por la respuesta propia contra el HIV o por la respuesta inmune a las infecciones secundarias a la inmunodeficiencia), la apoptosis y la progresión de la enfermedad<sup>5, 10, 11</sup>. En la Figura 1 se presentan resultados de nuestro laboratorio que avalan esta hipótesis<sup>10, 11</sup>.

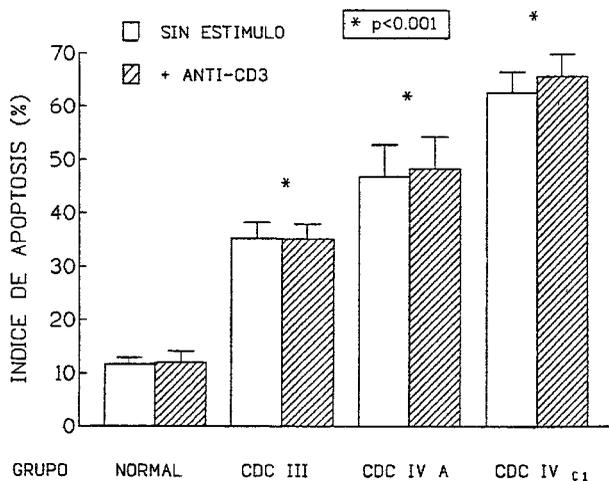


Fig. 1.- Apoptosis de células mononucleares periféricas en cultivo. Se cultivaron durante 48 hs leucocitos mononucleares periféricos de pacientes HIV+ pertenecientes a los subgrupos III, IVA y IVC1 del CDC (10) y de controles normales seronegativos, sin estímulo exógeno, o con el agregado de anticuerpo monoclonal contra CD3. El índice de apoptosis se calculó según lo descrito en un tabajo anterior<sup>10</sup>, y se expresó en valores porcentuales.

Así, los índices de apoptosis espontánea e inducida por estímulo al complejo CD3/TCR, aumentan en los pacientes a medida que la enfermedad progresa hacia el SIDA. Por otra parte, la apoptosis es mayor a medida que la linfopenia CD4 se acentúa con la progresión de la enfermedad (Figura 2).

Considerando los mecanismos por los cuales la apoptosis por activación (AICD, *activation induced cell death*) puede estar exacerbada en el SIDA, se encontró que ésta era independiente del sistema Fas/FasL y que podía o no ser mediada por la activación de las caspasas<sup>12,13</sup>. Las caspasas son proteasas intracelulares que poseen un grupo funcional de cisteína en el sitio activo y clivan a su sustrato a nivel de un grupo aspartato. Esta familia de enzimas proteolíticas es clave en la cascada de la apoptosis, ya sea en la apoptosis inducida por receptores (*death receptors*) como en la apoptosis dependiente de un estímulo letal mediada por una alteración de las mitocondrias y por la liberación de citocromo C. Una de estas enzimas, la ICE (*interleukin 1- $\beta$  converting enzyme-like protease*) está involucrada en la AICD de los linfocitos T de los pacientes HIV+ que involucra al sistema TRAIL<sup>12,14</sup>. Pero en los linfocitos de pacientes HIV+, también la apoptosis inducida como respuesta a la activación del sistema Fas/FasL está aumentada<sup>12</sup>, con participación de las caspasas. No toda la apoptosis inducida por AICD en los linfocitos de pacientes HIV+ es dependiente de ICE, y recientemente se propuso que la ligazón del co-receptor para el HIV CXCR4 y del receptor CD4 con proteínas de la envoltura viral induciría una rápida apoptosis independiente de caspasas y Fas/FasL (CD95)<sup>15</sup>. Como algunas citoquinas producidas por los linfocitos T, especialmente T CD4 del tipo Th1 (IL-2), son protectoras de la apoptosis y su producción está disminuida a consecuencia de la infección por el HIV, se sugiere que parte de la apoptosis en los linfocitos HIV+ se debe a su carencia. Sin embargo, el

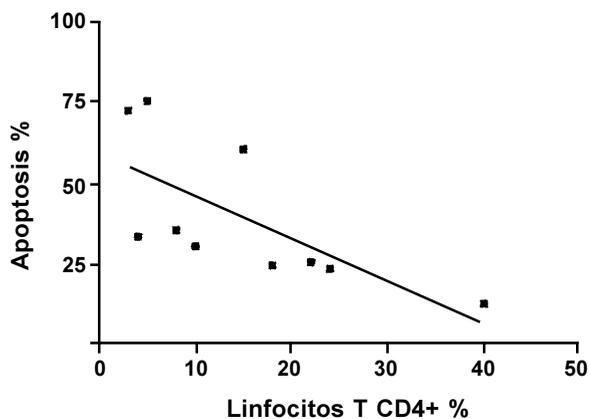


Fig. 2.- Correlación entre índice de apoptosis y número de linfocitos CD4+ circulantes.

agregado externo de IL-2 a los sistemas de ensayo, no es capaz de revertir la pérdida de viabilidad en forma completa<sup>16</sup>. La IL-2 es capaz de rescatar *in vitro* a parte de los linfocitos que progresan espontáneamente a la apoptosis. Esto se debe a su efecto inhibitorio de la modulación negativa de la proteína Bcl-2 (producto del gen *bcl-2* perteneciente a una familia de genes involucrados en la modulación de la apoptosis), fundamentalmente a nivel de inhibición o activación de la vía de activación de las caspasas disparada como resultado de la liberación del citocromo-C mitocondrial<sup>17</sup>. Se ha descrito un descenso de Bcl-2 en los linfocitos de pacientes HIV+, el cual guarda una relación inversa con el aumento de expresión de Fas en los linfocitos<sup>18</sup> y FasL<sup>19</sup> en los macrófagos de los pacientes infectados con HIV. Estos trastornos son más acentuados a medida que progresa la enfermedad causada por el HIV. Por otra parte en los pacientes HIV+ se ha demostrado un aumento en la apoptosis linfocitaria espontánea que parece estar ligado a la activación generalizada que sucede *in vivo* y que crece con la progresión de la enfermedad.

Finalmente, el papel de las células de estirpe monocito/macrofágica (M/M) es importante en el proceso de apoptosis<sup>20</sup>. Los M/M reconocen tempranamente a las células que han iniciado el proceso apoptótico, pues estas exponen en el exterior de la membrana plasmática grupos de fosfatidil serina, que disparan la fagocitosis y procesamiento de las células apoptóticas por los M/M. Los M/M se encargan de "limpiar" el medio ambiente de las células cuyo programa de muerte por apoptosis ha sido desencadenado. La acumulación de células apoptóticas en un cultivo de células mononucleares depende, por lo tanto, de su generación aumentada y también de la capacidad depurativa del sistema M/M. Por otra parte el aumento de expresión de FasL en la membrana de los M/M de pacientes HIV+, puede contribuir a la inducción de apoptosis mediada por FasL/Fas en linfocitos Fas+ de pacientes HIV+<sup>18, 21</sup>. Un resumen de las distintas causas del aumento de apoptosis en los pacientes con infección por HIV se presenta en la Tabla 1.

Recientemente desarrollamos un sistema de cultivo de células mononucleares humanas que permite la interacción estrecha entre linfocitos, M/M y células dendríticas. Este se realiza en ausencia de estímulos

TABLA 1.- Aumento de apoptosis en el SIDA

- Activación generalizada (AICD)
- FasL/Fas
- Deprivación de citoquinas (IL-2)
- Menor expresión de Bcl-2
- Mayor activación espontánea
- Remoción defectuosa por los M/M

exógenos y permite recuperar el HIV a partir de los propios leucocitos mononucleares de cada paciente, sin necesidad de recurrir al cultivo mixto, estímulo mitogénico o agregado de citoquinas al medio<sup>22</sup>. El sistema parece especialmente adecuado para el estudio de la replicación del HIV en M/M y para el análisis de la influencia de la apoptosis y la diferenciación de los M/M en la replicación viral. Los M/M se organizan en forma de agregados multicelulares con linfocitos de distinta clase, se diferencian y multiplican dando origen a células gigantes multinucleadas (CGM) y adquieren marcadores de activación a lo largo del cultivo, manteniendo su viabilidad hasta más de 25 días de cultivo. Constantemente los M/M y CGM fagocitan y digieren las células muertas durante el cultivo, eliminando así los desechos celulares y cuerpos apoptóticos. Con este método es posible demostrar replicación viral luego de 15-25 días de cultivo, aún en células mononucleares cultivadas de pacientes tratados por períodos mayores a dos años con terapia antirretroviral combinada exitosa (negativización de la carga viral con técnicas de PCR ultrasensible, < 50 copias RNA HIV / ml). En general, los resultados de aislamiento son mejores en pacientes en estadios intermedios de la enfermedad cuyos niveles de apoptosis espontánea no son demasiado elevados<sup>23</sup>. Los tiempos óptimos para el aislamiento viral son relativamente tardíos (>14 días), lo que apoya el hecho de que las células M/M son las fundamentales proveedoras de HIV en este sistema<sup>24</sup>.

Al analizar los resultados de distintos investigadores, queda claro que la mayor parte de la evidencia experimental apunta a la exacerbación de los mecanismos apoptóticos como consecuencia de la infección por HIV. Es importante destacar que las causas del aumento de la apoptosis linfocitaria en el HIV son múltiples, y probablemente estén vinculadas de manera fundamental con la activación generalizada del sistema inmune, la cual

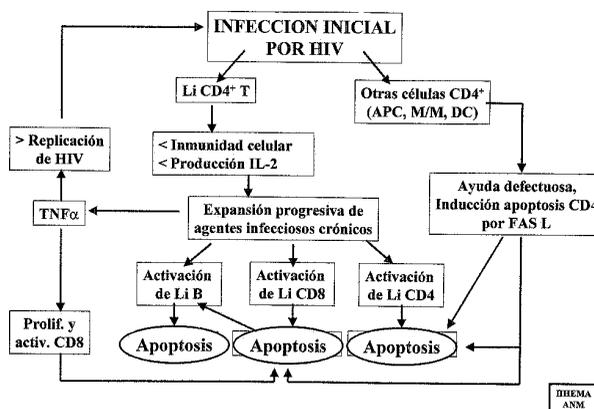


Fig. 3.- Exacerbación de los mecanismos apoptóticos luego de la infección por HIV. Adaptada de Gougeon y Montagnier<sup>8</sup>.

desemboca en su agotamiento. El esquema presentado en la Figura 3 resume esta propuesta. Finalmente, la introducción del tratamiento antirretroviral altamente efectivo (HAART), además de modificar la carga viral plasmática, la sobrevida de los pacientes y su calidad de vida, corrige los valores aumentados de marcadores relacionados a la apoptosis linfocitaria y a la activación generalizada del sistema inmune<sup>25</sup>, de manera que es posible suponer que la apoptosis es una buena medida indirecta del estado de activación generalizada (y por ende del daño potencial al sistema inmune), y su evaluación puede resultar útil para monitorear la eficacia del tratamiento HAART.

## Bibliografía

- Krammer PH, Behrman I, Daniel P, Dhein J, Debatin K-M. Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 279-89.
- Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; 175: 331-40.
- Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; 181: 71-7.
- Gougeon ML, Garcia S, Heeney J, et al. Programmed cell-death in AIDS-related HIV and SIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 553-63.
- Gougeon M-L, Lecoœur H, Dulioust A, 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: 3509-20.
- Ameisen JC, Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the program cell death hypothesis. *Immunol Today* 1991; 12:102-5.
- McCloskey TW, Ott M, Khan SA, et al. Dual role of Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol* 1997; 158: 1014-9.
- Gougeon ML, Montagnier L. New concepts in the mechanisms of CD4+ lymphocyte depletion in AIDS, and the influence of opportunistic infections. *Res Microbiol* 1992; 143: 362-8.
- Meyaard L, Otto SA, Keet IPM, Roos MTL, Miedema F. Programmed cell death of T cells in HIV infection: no correlation with progression to disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 982-8.
- Ruibal-Ares B, Riera NE, Felippo M, Vernava D, Perez-Bianco R, Bracco MME. Apoptosis in HIV-infected hemophilic patients. *Immunol Infect Dis* 1995; 5: 159-66.
- Ruibal-Ares B, Riera NE, Bracco MME. Apoptosis. Su papel en la ontogenia del sistema inmune y en la infección por HIV. *Medicina (Buenos Aires)* 1994; 54: 661-70.
- Katsikis PD, Garcia-Ojeda M, Torres-Roca JF, et al. Interleukin 1 $\beta$  converting enzyme-like protease involvement in Fas-induced and activation-induced peripheral blood T cell apoptosis in HIV infection. TNF-related apoptosis-inducing ligand can mediate activation-induced T cell death in HIV infection. *J Exp Med* 1997; 186: 1365-72.
- Glynn JM, McElligott DL, Mosier DE. Apoptosis induced by HIV infection in H9 T cells is blocked by ICE-family protease inhibition but not by a Fas (CD95) antagonist. *J Immunol* 1996; 157: 2754-8.
- Degli-Esposti M. To die or not to die- the quest of TRAIL receptors. *J Leuk Biol* 1999; 65: 535-42.
- Ritsou E, Berndt C, Krammer PH. CD4 and CXCR4 mediate a novel type of apoptosis in activated CD4+ T cells. *In: Novel approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology. Abstr 336. Keystone Symposium, Keystone Colorado, April, 2000.*
- Adachi Y, Oyaizu N, Than S, McCloskey TW, Pahwa S. IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection. Correlation with its ability to block culture-induced down modulation of Bcl-2. *J Immunol* 1996; 157: 4184-93.
- Bantel H, Schulze-Osthoff K. Disturbances of apoptosis in the course of disease. *Biomed Progr* 1999; 12: 75-80.
- Badley AD, Dockrell DH, Algeciras A, et al. In vivo analysis of Fs/FasL interactions in HIV-infected patients. *J Clin Invest* 1998; 102: 79-87.
- Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, Lynch DH, Alderson M, Paya CV. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected lymphocytes. *J Virol* 1996; 70: 199-206.
- Kornbluth RS. Significance of T cell apoptosis for macrophages in HIV infection. *J Leuk Biol* 1994; 56: 247-56.
- Badley AD, Dockrell D, Simpson M, et al. Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1997; 185: 55-64.
- Ruibal-Ares B, Riera NE, Bracco MME. Macrophages, multinucleated giant cells, and apoptosis in HIV+ patients and normal blood donors. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 82: 102-16.
- Baré P, Belmonte L, Picchio G, Perez Bianco R, Tezanos Pinto M, Bracco MME, Ruibal Ares B. HIV replication in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures of HIV+ patients receiving highly active antiretroviral treatment (HAART) in the absence of mitogenic stimuli. *In: Novel approaches to HIV-1 infection based on new insights into HIV biology. Abstr 407. Keystone Symposium, Keystone Colorado, 2000.*
- Ruibal-Ares B, Belmonte L, Mendez G, Felippo M, Bare P, Bracco MME. Detección de infección por HIV en cultivo primario de células mononucleares periféricas (CMP) de pacientes hemofílicos HIV+. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58: 772-3.
- Amendola A, Poccia F, Martini F, et al. IHRAN Study Group. Decreased CD95 expression on naive T cells from HIV-infected persons undergoing highly active antiretroviral therapy (HAART) and the influence of IL-2 low dose administration. *Clin Exp Immunol* 2000; 120: 324-32.