

RELEVANCIA DEL CCR5, CO-RECEPTOR DEL HIV-1 Y SU LIGANDO CCL3L1 EN EL TROPISMO VIRAL EN PEDIATRÍA

Dras. Luisa Sen, Andrea Mangano, Cintia Crudeli, Paula Aulicino, Natalia Altamirano

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue determinar la participación del co-receptor CCR5 y su ligando CCL3L1 en relación a una de las características del fenotipo del HIV-1, el tropismo viral. Los resultados que obtuvimos así como otras investigaciones que estamos desarrollando tienen implicancias clínicas y terapéuticas en los niños HIV-1 infectados. Para lograr el objetivo hemos evaluado en forma conjunta y combinada los datos que habíamos obtenido a lo largo de casi 15 años en relación a las variantes genéticas del CCR5, en particular la mutación $\Delta 32$ y su ligando CCL3L1 (MIP-1 α P) en función del número de copias del gen en los niños HIV-1 infectados por transmisión vertical que son asistidos en el Hospital de Pediatría J.P. Garrahan, investigando la probable asociación de ellas con el tropismo viral. Hallamos que los niños en primoinfección tienen una proporción considerable de variantes HIV-1 SI (inductoras de sincicios celulares, es decir citopáticas) que emplean como co-receptor al CXCR4 en lugar del CCR5. Otro hecho relevante fue que la presencia de las variantes SI predominaron en los niños heterocigotas para la variante genética CCR5 $\Delta 32$. En este último grupo encontramos además que estaba significativamente asociado con un número de copias del CCL3L1 alto (≥ 2). Probablemente ambos factores participan favoreciendo la reducción en el número de moléculas del co-receptor CCR5 expresadas en la superficie celular facilitado la infección por las variantes X4. Aunque las variantes SI en la etapa crónica alcanzan a un 40% no parecieran asociadas con el genotipo CCR5 $\Delta 32$ ni con el número de copias del CCL3L1. En resumen, hemos demostrado que las variantes SI X4 T-trópicas del HIV-1 pueden estar presentes en los estadios muy tempranos de la infección viral sugiriendo que puede ser transmisible verticalmente. Además, el genotipo CCR5 $\Delta 32$ en el contexto de copias altas del CCL3L1 en el niño HIV-1 infectado, contribuyen a un mayor riesgo a ser infectado por variantes SI en primoinfección. Este hecho no pareciera suceder en la etapa crónica de la infección viral.

Palabras clave: CCR5, CCL3L1, HIV-1 en pediatría, variantes SI/NSI.

Medicina Infantil 2012; XIX: 81 - 87.

INTRODUCCION

El ingreso del HIV-1 a la célula requiere inicialmente de la interacción entre la gp120, que representa parte de la proteína del gen de envoltura del

Laboratorio de Biología Celular y Retrovirus.
Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan.
Correspondencia: Luisa Sen - Mail: lsen@garrahan.gov.ar
Combate de los Pozos 1881 - (1245) CABA

ABSTRACT

The aim of the study was to assess the role of co-receptor CCR5 and its ligand CCL3L1 in viral tropism, one of the characteristics of the HIV-1 phenotype. The results of this study as well as those found in our other ongoing research have clinical and therapeutic consequences for HIV-1 Infected children. For the aim of the study we collected and evaluated the data obtained over a period of almost 15 years on genetic variants of CCR5, specially the $\Delta 32$ mutation and its ligand CCL3L1 (MIP-1 P), in relation to the number of copies of the gene in HIV-1-mother-to-child infected children seen at the pediatric hospital J.P. Garrahan, to investigate a probable association with viral tropism. We found that children with a primary infection have a considerable number of HIV-1 SI (syncytium-inducing, i.e. cytopathic) variants that use CXCR4 instead of CCR5 as a co-receptor. Another relevant finding was that SI variants were predominant in children that were homozygous for the genetic CCR5 $\Delta 32$ variant. In this latter group we additionally found that this was significantly associated with a high number of CCL3L1 copies (≥ 2). Both factors may play a favorable role in the decrease of the number of molecules of the CCR5 co-receptor expressed on the cell surface that facilitate infection through X4 variants. Although in the chronic stage SI variants reach 40%, they do not seem to be associated with either the CCR5 $\Delta 32$ genotype or the number of CCL3L1 copies. In summary, we have shown that SI X4 T-tropic variants of HIV-1 may be present in very early stages of viral infection suggesting that they may be transmitted from mother to child. In addition, the CCR5 $\Delta 32$ genotype in the setting of a high number of CCL3L1 copies in an HIV-1 infected child contribute to a higher risk of being infected by SI variants in primary infection, however, this mechanism does not seem to occur in the chronic stage of viral infection.

Key words: CCR5, CCL3L1, HIV-1 in children, SI/NSI variants.

Medicina Infantil 2012; XIX: 81 - 87.

virus, con el receptor CD4 de la célula¹. Luego requiere de una interacción con un co-receptor, ya sea el CCR5 o CXCR4 que representan fisiológicamente receptores de quimioquinas²⁻⁴. De acuerdo a la habilidad de emplear los co-receptores CCR5 y/o CXCR4, se clasifica fenotípicamente al HIV-1 como variantes R5 y X4 trópicas. Desde el inicio de la epidemia a la actualidad la caracterización del tropismo

viral ha evolucionado. Inicialmente, se consideraba el efecto citopático del HIV-1 en las células T y la capacidad de inducir o no la formación de sincicios celulares en la línea celular T MT-2 (variantes SI y NSI respectivamente)⁵. Posteriormente, se añadió la habilidad del virus de replicar en dos líneas celulares: monocito-macrófagos o células T CD4+ diferenciándolas como variantes M-trópicas o T-trópicas, respectivamente^{5,6}. Recién a partir de 1996 se identificaron los co-receptores CCR5 y CXCR4 lo que permitió aclarar las bases moleculares del tropismo viral clasificando a las variantes NSI en M-trópicas R5 y SI en T-trópicas X4. Dentro de las SI actualmente también se incluyen las variantes duales-trópicas R5X4^{7,8}. Las variantes NSI son las predominantemente transmisibles y son consideradas menos virulentas que las SI⁹. En cambio, se ha observado principalmente en la población adulta infectada que las variantes SI tienden a surgir con posterioridad alcanzando un 50% de las variantes HIV-1 en los estadios tardíos de la infección, estando asociadas con una inmunosupresión severa y el desarrollo de SIDA enfermedad¹⁰. En los últimos años, se ha observado en seroconvertidores adultos que por lo menos un 17% portaban variantes con tropismo X4 o duales R5X4 desde el inicio de la infección viral¹¹. En estudios preliminares en la infección pediátrica hallamos que había una proporción del 18% de variantes HIV-1 formadoras de sincicios celulares o sea el equivalente a T-trópicas durante el primer año de infectados por transmisión vertical¹².

A pesar que la causa que provoca el cambio o "switch" de los co-receptores de R5 a X4 permanece elusiva, existen evidencias que avalan que la magnitud de la expresión de los co-receptores CCR5 y CXCR4 en la superficie de la célula blanco podría influir en la emergencia de las variantes X4¹³. Polimorfismos en el gen que codifica al CCR5 son capaces de influir en la expresión de la molécula en la superficie celular. La presencia de una delección de 32 pares de bases (32pb) en la región codificante del CCR5 resulta en falta de expresión en la superficie celular. El polimorfismo CCR5 Δ 32 es de muy baja frecuencia (1-5%) a nivel mundial, encontrándose casi exclusivamente en poblaciones de origen caucásico¹⁴. El estado homocigota de la mutación (CCR5 Δ 32/ Δ 32) se asocia con resistencia a adquirir la infección viral¹⁵⁻¹⁷ con cepas R5, mientras que la heterocigosis (CCR5+/ Δ 32) se ha encontrada asociada con un retraso en el desarrollo de la enfermedad¹⁸. En estudios previos realizados en nuestra población con respecto al polimorfismo del gen CCR5 hallamos que si bien está presente la mutación Δ 32 en homocigosis es en una proporción muy baja alrededor del 0,5%¹⁹. Más aún no hallamos modificaciones en la susceptibilidad a ser infectado verticalmente por el HIV-1 entre los que portaban o no la mutación CCR5 Δ 32.

Otro factor predisponente del hospedador capaz de generar un cambio en el tropismo viral podría ser la concentración de los ligandos fisiológicos del CCR5 (MIP1 α , MIP1 β , y RANTES). La quimioquina MIP1 α P, denominada recientemente CCL3L1, es la más potente como supresor del HIV y en estudios previos se demostró que el número de copias del gen CCL3L1 puede condicionar la susceptibilidad al HIV/SIDA^{20,21}. Al estudiar el número promedio de copias del gen CCL3L1 hallamos que existen variaciones importantes interindividuales e interpopulacionales²⁰. Determinamos que las poblaciones Africanas tienen el número de copias de CCL3L1 significativamente más alto que las poblaciones no-Africanas. En base a nuestras observaciones iniciales concluimos que la dosis relativa de cada población, es decir la dosis promedio de una determinada población relacionada con la otra población, y no el número absoluto de copias es lo que conferiría susceptibilidad o protección al HIV/SIDA. En un estudio previo determinamos en nuestra cohorte infantil, considerada de origen étnico hispano-caucásico, que el número de copias promedio del CCL3L1 es de 2²¹. Los niños con 2 o más copias tenían un riesgo significativamente menor de contraer la infección viral²¹.

Considerando que variaciones genéticas en el co-receptor CCR5 y su ligando CCL3L1 pueden condicionar el predominio de cepas SI/NSI, nuestro objetivo fue evaluar en forma conjunta los factores genéticos del hospedador con el tropismo viral en niños infectados.

PACIENTES Y METODOS

Grupos de estudio

Se estudiaron un total de 449 niños HIV-1 infectados por transmisión vertical, 437 niños expuestos al HIV-1 no-infectados y 108 donantes de sangre seronegativos para el HIV-1.

La distribución fenotípica del HIV-1 se realizó en un estudio de cohorte transversal incluyendo un total de 267 niños perinatalmente infectados con HIV-1, nacidos entre 1986 y 2009, que concurren al Hospital Garrahan. De ellos un total de 107 infantes fueron estudiados en infección primaria (\leq 12 meses de edad) y 160 niños en estadios crónicos de la infección ($>$ 12 meses de edad).

Aislamiento y determinación del fenotipo del HIV-1 en células MT-2

A partir de sangre periférica anticoagulada con EDTA al 10% diluido al medio con solución fisiológica se aíslan células mononucleares totales (CMT) mediante gradiente de Ficoll-Triyosom con densidad=1,077 gr/ml centrifugando a 1500 rpm, durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las CMT se lavan 2 veces con solución fisiológica para realizar los cultivos de células. Los aislados virales se obtienen

por co-cultivos de células siguiendo el protocolo del AIDS Clinical Trials Group²². Brevemente, las CMT de los pacientes infectados y un pool de CMT de donantes HIV-1 seronegativos estimuladas por 72hs con 5 µg/mL de Fitohemaglutinina (PHA, Difco Laboratories) se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Invitrogen) suplementado con 20% de suero bovino fetal (SBF), 5U/ml IL-2 (Sigma Aldrich) y 10 µg/ml gentamicina (Gibco BRL, Invitrogen). A lo largo del mes se realizan semanalmente 2 cambios de la mitad del medio de cultivo y realimentación con un pool de CMT normales estimulados con PHA. La producción viral se determinó por medición del Antígeno p24 (Ag-p24) en los sobrenadantes (SN) de cultivo mediante la técnica de ELISA utilizando un kit comercial (Vironostika HIV-1 Antigen, BioMérieux) considerándolos positivos con Ag-p24 mayor a 40 pg/ml. Todos los SN positivos se almacenaron a -80°C para su posterior caracterización.

El fenotipo SI/NSI del HIV-1 se determinó infectando a células de la línea celular T MT-2 con observación microscópica a intervalos entre 3 a 4 días durante 14-21 días de cultivo²³. Se conservaron los pellets celulares secos al final del cultivo para investigar la infección celular por detección del provirus de HIV-1 mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En paralelo se realizaron ensayos de infectividad de los aislados virales ensayados infectando CMT pre-estimulados con PHA de dadores normales.

Determinación de las copias del gen CCL3L1

Se realizó mediante un ensayo multiplex cuantitativo de PCR en tiempo real usando la metodología TaqMan descrita por González y colaboradores²⁰. Para su medición se empleó el sistema de detección ABI/PRISM7500 (PE, Applied Biosystems) detectando la fluorescencia emitida como FAM (6-carboxyfluoresceína) de la sonda específica para CCL3L1 y como VIC de la sonda dirigida a beta-globina (normalizador del ensayo). Se determinó el número de ciclo en el cual se comienza a detectar la fluorescencia por encima de los niveles basales fijados, el cual es denominado ciclo umbral (Ct). El Ct es proporcional a la cantidad inicial de templado. De modo que a partir de diluciones seriadas de un estándar con número de copias conocido y extrapolando las muestras incógnitas se puede determinar el número de copias por genoma diploide de CCL3L1.

El ADN genómico de la línea celular A431 (posee dos copias de CCL3L1 por genoma diploide estimadas por Southern Blot²⁴ fue utilizado como estándar para la construcción de curvas de calibración utilizando diluciones seriadas 1:2 en el rango de 25-1,56 ng de ADN. Tanto las diluciones del estándar como la estimación del Ct de las muestras incógnitas se realizan por triplicado. La mezcla de reacción consistió

en 1X TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem), 200 nM de cada sonda y 800 nM de cada cebador. El número de copias se calculó como la razón entre la cantidad de CCL3L1 y la cantidad de beta-globina multiplicada por dos.

Para que las curvas estándar de cuantificación se consideraran adecuadas, los coeficientes de correlación (R2) debían ser >96%, en caso contrario el experimento completo era repetido. Cuando el resultado de las muestras era cero copias para CCL3L1 la misma era repetida en la próxima tanda de muestras para confirmar dicho resultado. Se consideran sujetos con CCL3L1 bajo a quienes poseen entre 0 y 1 copia del gen, mientras quienes tienen 2 o más copias se los clasifica como CCL3L1 alto, debido a la media poblacional reportada previamente para nuestra población²⁰.

Análisis estadísticos

La asociación entre el tropismo viral y la posesión de la mutación CCR5Δ32 se evaluó mediante el test exacto de Fisher. Se aplicaron los métodos de regresión logística. En todos los casos se empleó el test de 2 colas con un nivel de significancia del 0.05.

RESULTADOS

Distribución de la mutación CCR5Δ32 en niños HIV-1 infectados y expuestos no-infectados y en donantes de sangre adultos HIV-1 no-infectados

Estudiamos un total de 437 niños HIV-1 infectados por transmisión vertical y fueron comparados con 449 niños no-infectados expuestos al HIV-1. La distribución del alelo CCR5Δ32 en niños HIV-1 infectados fue del 8.3% y en los niños expuestos no-infectados fue del 7.6%, sin diferencias significativas al comparar ambos grupos (Tabla 1). Estos datos sugieren que la presencia del alelo CCR5Δ32 no afectaría la transmisión vertical del virus. Como era de esperar dentro de la población de niños infectados por el HIV-1 no hallamos ningún niño infectado que fuera homocigota para la mutación CCR5Δ32, en cambio en la población de niños expuestos no-infectados la frecuencia fue del 0,22%.

Dentro de la población adulta HIV-1 negativo del Banco de Sangre del Hospital Garrahan la frecuencia alélica para el CCR5Δ32 fue del 4.6%. En todos los grupos estudiados las distribuciones del geno-

TABLA 1: FRECUENCIA DEL ALELO CCR5Δ32 EN NIÑOS EXPUESTOS PERINATALMENTE AL HIV-1 INFECTADOS Y NO-INFECTADOS, Y EN UNA POBLACION DE ADULTOS NO-INFECTADOS DONANTES DE SANGRE.

Sujetos estudiados	Total	CCR5+/+	CCR5+/ Δ 32	CCR5 Δ 32/ Δ 32
Niños HIV-1 (+)	437	401	36	0
Niños HIV-1 (-)	449	415	33	1
Adultos HIV-1 (-)	108	99	8	1

tipo del CCR5 estuvieron en equilibrio de acuerdo a la ecuación de Hardy-Weinberg ($p > 0.1$).

Distribución de la dosis génica del CCL3L1 en niños expuestos al HIV-1 infectados y no-infectados y en donantes de sangre adultos HIV-1 no-infectados

En un estudio previo en nuestra cohorte pediátrica Argentina que estuvo expuesta al HIV-1 analizamos 407 niños infectados y 395 no-infectados. Hallamos que los niños que portaban una sola copia del gen, que representaban un 70%, presentaron un mayor riesgo de adquirir la infección viral al compararlos con los niños que portaban 2 copias. Por el contrario, en niños con más de 2 copias del gen CCL3L1, el riesgo de transmisión disminuía a medida que aumentaba el número de copias, demostrando un rol protector^{20,25}. (Figura 1, Tabla 2).

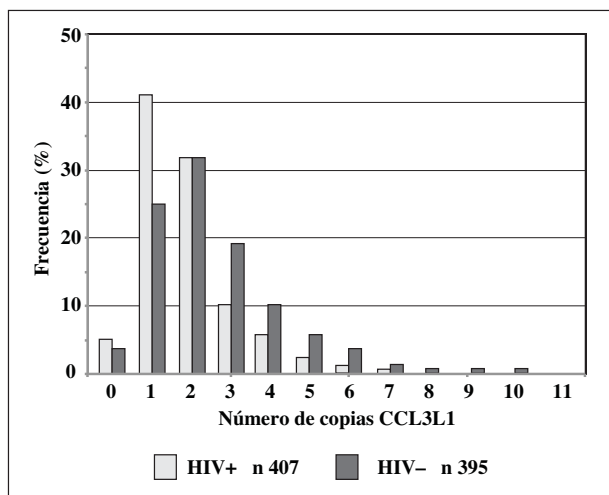


Figura 1: Dosis génica del CCL3L1 e infección por HIV-1. a) En rojo se muestran los pacientes HIV-1 infectados y en verde los niños expuestos al HIV-1 por transmisión vertical.

TABLA 2: RIESGO DE ADQUIRIR HIV RELATIVO A LA MEDIANA DE LA POBLACION (SWITCH POINT).

Copias CCL3L1	OR	95%	CI	p
0	1.28	0.60	2.74	0.527
1	1.67	1.18	2.36	0.004
→ 2	1.00			
3	0.64	0.42	0.99	0.047
4	0.60	0.35	1.03	0.062
5	0.41	0.17	0.97	0.043
6	0.27	0.07	0.98	0.046
7	0.33	0.33	3.17	0.334

La flecha indica el valor de la mediana en la población Argentina. OR= Odds Ratio, CI= intervalo de confianza 95%.

Características del fenotipo SI y NSI del HIV-1 en niños infectados por transmisión vertical en relación a diferentes tiempos de la infección viral

Los aislados del HIV-1 de 267 niños infectados por transmisión vertical se obtuvieron a diferentes tiempos de la infección determinando el fenotipo del virus SI o NSI utilizando la línea celular MT2. Se estableció que la edad del niño infectado en el momento del estudio del tropismo viral sería el equivalente al tiempo de la infección viral considerando la transmisión del virus de la madre al bebé al momento del parto. Los datos se ilustran en la Figura 2. La proporción de las variantes HIV-SI variaron según el tiempo de la infección viral. Durante los 3 primeros meses de edad el porcentaje de variantes SI fue del 22%, seguido por un descenso hasta los 12 meses. Posteriormente, la frecuencia de las variantes comienza a ascender alcanzando a un 46% después de los 10 años de la infección viral.

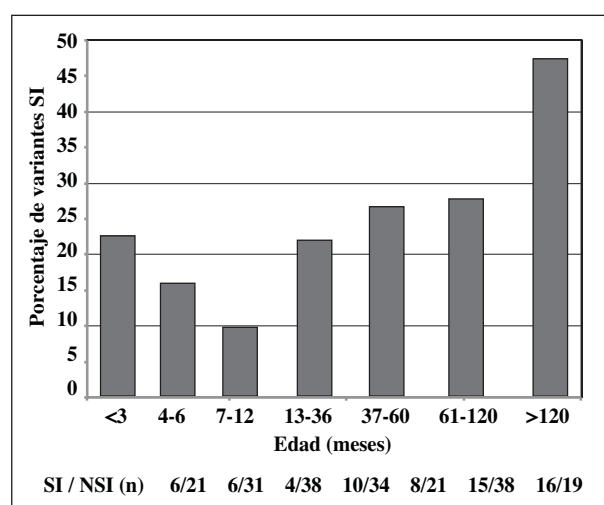


Figura 2: Distribución del fenotipo del HIV-1 en niños infectados por transmisión vertical a diferentes tiempos de infección. Las columnas indican las variantes SI, y (n)= número de pacientes SI/NSI. Se consideró solo una determinación fenotípica por paciente. En aquellos que presentaron ambos fenotipos, se tuvo en cuenta el primer aislado SI.

Influencia del genotipo del CCR5 en la presencia de las variantes del HIV-1 según su tropismo viral SI y NSI

Con el propósito de averiguar si el genotipo del CCR5, principal co-receptor del HIV-1 NSI, podría afectar la presencia de las variantes SI y NSI analizamos la existencia o no de una asociación entre la presencia de la mutación $\Delta 32$ del CCR5 y las variantes SI y NSI. Sobre un total de 259 niños HIV-1 infectados estudiados hallamos que 63 (24.3%) portaban la variante SI del HIV-1 (Tabla 3).

De estos niños que portaban la variante SI, 11 eran heterocigotas para el genotipo del CCR5 $\Delta 32$ lo que representaba el 37,9% del total de niños con ese genotipo, mientras que el 22,6% (n=52 del total de niños con genotipo CCR5 salvaje presentaban la variante SI. No hubo diferencias significativas entre los grupos comparados ($p=0,1049$).

Luego se evaluó si la asociación buscada entre

TABLA 3: RELACION ENTRE EL FENOTIPO VIRAL Y EL CCR5 DEL HUESPED, EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA INFECCION PEDIATRICA.

	Total Infectados				Infección Aguda					Infección Crónica				
	NSI		SI		NSI		SI		p	NSI		SI		p
CCR5 Genotipo	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
CCR5 +/+	178	(77)	52	(23)	85	(88)	12	(12)	0.028	93	(70)	40	(30)	0.625
CCR5 +/Δ32	18	(62)	11	(38)	3	(50)	3	(50)		15	(65)	8	(35)	
CCR5 Δ32/Δ32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	196		63		88		15			108		48		
	259				103						156			

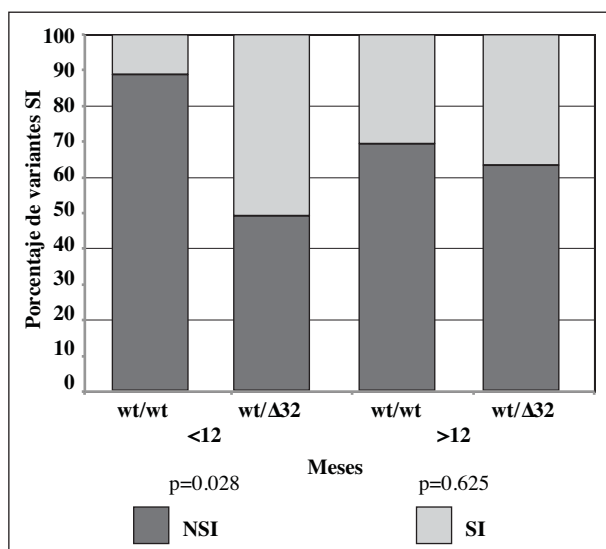


Figura 3: Relación entre el genotipo CCR5-Δ32 y el fenotipo viral en las distintas etapas de la infección pediátrica. p = Regresión logística estratificada por la edad.

el tropismo viral y el genotipo del CCR5 del hospedador se podría evidenciar en alguna etapa a lo largo de la infección viral. Para ello realizamos el análisis comparando a los 103 niños con determinaciones del tropismo viral realizadas dentro de los primeros 12 meses de la infección con aquellos que se estudiaron posterior a los 12 meses de edad que fueron un total 156 (Tabla 3, Figura 3).

En la infección primaria del HIV-1 las variantes SI fueron significativamente más frecuentes en los niños que eran heterocigotas CCR5+ / Δ32 que en los que portaban el genotipo del CCR5 salvaje, con una p=0,028. En cambio en la etapa crónica de la infección la proporción de variantes SI entre ambos genotipos del CCR5 analizados fue similar (p=0,625).

Influencia del número de copias del CCL3L1 en la prevalencia de las distintas variantes fenotípicas del HIV-1

Debido a la asociación previa entre el número de copias del CCL3L1 con los niveles de expresión

de CCR5, decidimos evaluar en primera instancia el impacto de CCL3L1 en la prevalencia de las distintas variantes fenotípicas del HIV-1 durante la primoinfección. Con este fin, se estimó el número de copias del CCL3L1 en 99 niños cuyo fenotipo viral había sido evaluado. En la Tabla 4 se muestra la distribución del número de copias de CCL3L1 en relación con el fenotipo viral de HIV-1. A pesar de que el fenotipo viral no se asoció significativamente (p=0.513) con los números de copias de CCL3L1 bajo y CCL3L1 alto, cabe destacar que se observa una mayor prevalencia (67%, n=10) de variantes SI en aquellos individuos con genotipo CCL3L1 alto (Tabla 4).

TABLA 4: PREVALENCIA DE VARIANTES FENOTIPICAS Y NUMERO DE COPIAS DE CCL3L1.

Genotipo	SI (X4 / R5X4)	NSI (R5)
CCL3L1 bajo	5 (33,3)	19 (22,4)
CCL3L1 alto	10 (66,7)	66 (77,6)

Asociación entre el número de copias del CCL3L1, el genotipo del CCR5 y el tropismo viral

Debido a la observación previa de que los niños portadores del polimorfismo CCR5Δ32 presentan una mayor prevalencia de variantes virales SI durante la primoinfección, decidimos evaluar si la prevalencia de los aislados con fenotipo SI era mayor en aquellos sujetos que portan el alelo CCR5Δ32 y copias altas de CCL3L1. Como se muestra en la Figura 4, la mayor prevalencia de aislados con fenotipo SI se presentó en aquellos sujetos con CCL3L1 alto que también presentaban el alelo CCR5Δ32 (50%). El resto de los niños, presentaron prevalencias de aislados SI menores al 20% (Figura 4). Consistentemente, un análisis de regresión logística multivariado sugiere que la asociación entre CCR5Δ32 con el fenotipo viral SI es más pronunciada en aquellos sujetos con alto número de copias de CCL3L1, pero no se observa en el contexto de copias bajas de CCL3L1 (p=0.01).

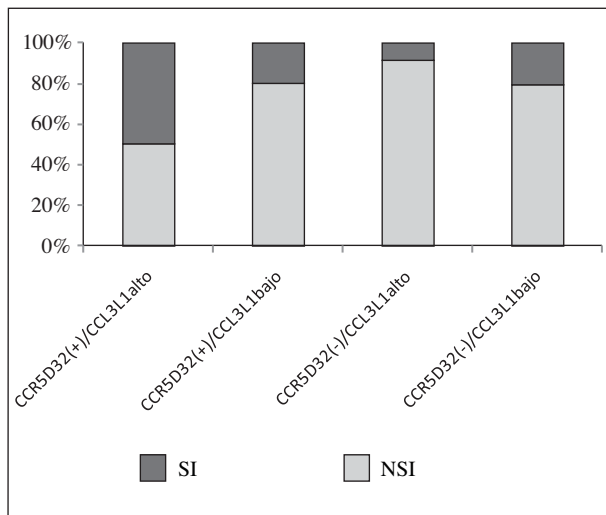


Figura 4: Distribución del fenotipo viral de acuerdo al genotipo de CCR5 y el número de copias de CCL3L1.

DISCUSION

Después de 15 años de investigación y combinando la evaluación de diferentes datos obtenidos del HIV-1 y genéticos de los niños infectados hemos logrado establecer que variantes genéticas del CCR5, principal co-receptor del HIV-1, y su ligando CCL3L1 (MIP-1 α P) son capaces de modificar el tropismo del HIV-1. A diferencia de lo aceptado previamente, hallamos que los niños en primoinfección tienen una proporción importante de variantes HIV-1 que emplean como co-receptor al CXCR4 en lugar del CCR5 o sea que son inductoras de sincicios. La asociación entre las cepas SI y la heterocigosis CCR5 Δ 32 podría deberse a la expresión de un número menor de moléculas del co-receptor del CCR5 en la superficie celular. La menor disponibilidad del CCR5 es lo que favorecería el establecimiento de la infección viral a través de otros co-receptores alternativos como podría ser el CXCR4. En etapas posteriores a la primoinfección y a pesar que las cepas SI pueden alcanzar una frecuencia de un 40% no hemos encontrado una asociación entre la mutación CCR5 Δ 32 y el número de copias de CCL3L1 con el tropismo viral; posiblemente el tratamiento antirretroviral pudo ser un factor confundente.

La mayoría de los estudios en niños HIV-1 infectados indican que en la etapa aguda de la infección predominan principalmente las variantes NSI/R5²⁶⁻²⁸. Nosotros notoriamente observamos una alta proporción (22%) de variantes SI dentro de los primeros meses de edad en niños infectados por transmisión vertical. La presencia de las SI en forma tan temprana como es el primer mes de vida nos sugiere que puede deberse inmediatamente después de la transmisión viral a un ultra rápido cambio de NSI a SI o a una transmisión directa de la madre al bebé de variantes SI/CXCR4. Huang y col²⁹ y

Salvatori y col²⁷ ya han documentado la transmisión vertical de variantes que emplean como co-receptor al CXCR4. Lamentablemente en nuestro estudio al no disponer de muestras de sangre de la madre próximo al parto no nos fue posible discernir si las variantes SI fueron transmitidas o sufrieron un cambio prematuro. Sin embargo, ambas posibilidades no son excluyentes. La transmisión de variantes X4 por otras vías de transmisión aparte de la vertical también fue documentada en adultos^{30,31} registrando la presencia de hasta un 20% de variantes X4 en la etapa inicial de la infección. La transmisión vertical de las variantes X4 en las etapas muy tempranas puede deberse a una selección de las variantes X4 por las células del trofoblasto favoreciendo su pasaje "in utero"^{27,32}. Además, en el recién nacido existen otras condiciones como la expresión predominante del co-receptor CXCR4 en los timocitos y su presencia en las células mononucleares de sangre periférica asociada con una muy baja expresión del CCR5^{33,34}.

La asociación entre las variantes SI con la heterocigosis del CCR5 Δ 32 la pudimos observar solo en primoinfección. Sin embargo, a pesar de que en la etapa crónica de la infección viral pudimos observar una alta frecuencia de variantes SI, no estaban aparentemente asociadas con el co-receptor y su ligando CCL3L1. Es importante remarcar que los niños en primoinfección estudiados no recibieron tratamiento durante la etapa aguda de la infección mientras que la mayoría de los niños estudiados en la etapa crónica estaban recibiendo el tratamiento antirretroviral HAART. Estos datos y los similares reportados en adultos^{35,36} confirman que el tratamiento antirretroviral prolongado no previene la aparición de las variantes SI. Sin embargo, D'Aquila y col³⁷ observaron en la etapa crónica de adultos infectados con HIV-1 un predominio de variantes SI en los que eran heterocigotas para el CCR5 Δ 32 sugiriendo que podrían ejercer una presión selectiva para el fenotipo SI. En nuestra cohorte infantil en la etapa crónica de la infección no observamos dicha asociación, la reducción en la expresión del CCR5 por la presencia de heterocigosis del CCR5 Δ 32 no pareciera ser suficiente para la emergencia de las variantes SI en el grupo infantil. Otros factores que contribuirían en la etapa crónica a tener una menor disponibilidad del CCR5 podrían estar vinculados con el tratamiento HAART³⁸ y/o a un incremento de la subpoblación T CD4+ naive con altos niveles en la expresión del CXCR4³⁹. Otros estudios son necesarios para discernir los interrogantes planteados. El advenimiento de nuevas drogas antirretrovirales como son los bloqueadores del CCR5 hacen indispensable los estudios del tropismo viral para que la implementación sea más precisa y efectiva en el empleo de los mismos. En conclusión, los estudios de investigación que estamos desarrollando tienen

implicancias clínicas y terapéuticas en los niños HIV-1 infectados.

Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a las Sras. Carmen Gálvez y Natalia Beltramone por las tareas técnicas realizadas. Los trabajos realizados fueron apoyados por los subsidios PICT2004-25830 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, y PIP 6057 de CONICET. Parte de los resultados incluidos en el trabajo formaron parte de las tesis doctorales de la UBA 2012 de Cintia Crudeli y Natalia Altamirano.

REFERENCIAS

1. Lifson J, Feinberg M, Reyes G et al. Induction of CD4-dependent cell fusion by HTLV-III/LAV envelope glycoprotein. *Nature* 1986; 323: 725-8.
2. Deng H, Liu R, Ellmeier W et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:661-6.
3. Dragic T, Litwin V, Allaway G et al. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR5. *Nature* 1996; 381:667-73.
4. Feng Y, Broder C, Kennedy P, Berger E. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-7.
5. Schuitemaker H, Kootstra N, de Goede RE et al. Monocytotropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants detectable in all stages of HIV-1 infection lack T-cell line tropism and syncytium-inducing ability in primary T-cell culture. *J Virol* 1991; 65:356-63.
6. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra N et al. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; 66: 1354-60.
7. Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guest with master keys: How HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 1997; 235: 179-90.
8. Berger EA, Doms R, Fenyo E. A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; 391: 621-8.
9. Poveda E, Briz V, Quiñones-Mateu M, Soriano V. HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors. *AIDS* 2006; 20: 1359-67.
10. Gorry P, Ancuta P. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Current HIV/AIDS* 2010; 8: 45-53.
11. De Mendoza C, Rodríguez C, García F, et al. Prevalence of X4 tropic viruses in patients recently infected with HIV-1 and lack of association with transmission of drug resistance. *Antimicrob. Chemother* 2007; 59:698-704.
12. Kopka J, Batalla M, Mangano A, et al. Relevance of viral phenotype in the early AIDS outcome of pediatric HIV-1 primary infection. *Pediatric Res* 2002; 52: 475-80.
13. Moncunill G, Armand-Ugon M, Pauls E, et al. HIV-1 escape to CCR5 coreceptor antagonism through selection of CXCR4-using variants in vitro. *AIDS* 2008; 22: 23-31.
14. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, et al. Global distribution of the CCR5 gene 32-base pair deletion. *Nat Genet* 1997; 16:100-3.
15. Liu R, Paxton WA, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 co-receptor accounts for resistance in some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-77.
16. Huang Y, Paxton W, Wolinsky S et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nature Med* 1996; 2:1240-3.
17. Samson M, Libert F, Doranz B et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 385:722-5.
18. Ioannidis JPA, Contopoulos-Ioannidis DG, Rosenberg PS, et al. Effects of CCR5-delta32 and CCR2-64I alleles on disease progression of perinatally HIV-1 infected children: an international meta-analysis. *AIDS* 2003; 17 (11): 1631-8.
19. Mangano A, Kopka J, Batalla M, et al. Protective effect of CCR2-64I and not of CCR5-delta32 and SDF1-3'A in pediatric HIV-1 infection. *JAIDS* 2000; 23: 52-7.

20. Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 2005; 307: 1434-40.
21. Mangano A, Gonzalez E, Dhanda R, et al. Concordance between the CC chemokine receptor 5 genetic determinants that alter risks of transmission and disease progression in children exposed perinatally to human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 2001; 183:1574-85.
22. Hollinger FB, Bremer JW, Myers LE et al. Standardization of sensitive human immunodeficiency virus coculture procedures and establishment of a multicenter quality assurance program for the AIDS Clinical Trials Group. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1787-94.
23. Japour AJ, Fiscus SA, Arduino J-M, et al. Standardized microtiter assay for determination of syncytium-inducing phenotypes of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2291-4.
24. Townson JR, Barcellos LF, Nibbs RJ. Gene copy number regulates the production of the human chemokine CCL3L1. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3016-26.
25. Mangano A, Rocco C. Factores genéticos en la infección por el HIV-1. *Actualizaciones en SIDA* 2007; 15: 43-56.
26. van't Wout AB, Kootstra NA, Mulder-Kampinga GA et al. Macrophage-tropic variants initiate human immunodeficiency virus type 1 infection after sexual, parenteral, and vertical transmission. *J Clin Invest* 1994; 94: 2060-7.
27. Salvatori F, Scarlatti G. HIV type 1 chemokine receptor usage in mother-to-child transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17:925-35.
28. Church JD, Huang W, Mwatha A et al. HIV-1 tropism and survival in vertically infected Ugandan infants. *J Infect Dis* 2008; 197: 1382-88.
29. Huang W, Eshleman SH, Toma J, et al. Vertical transmission of X4-tropic and dual-tropic HIV-1 in five Ugandan mother-infant pairs. *AIDS* 2009; 23: 1903-8.
30. Brummer ZL, Goodrich J, Mayer HB et al. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naïve individuals. *J Infect Dis* 2005; 192:466-74.
31. Frange P, Galimand J, Goujard C, et al. High frequency of X4/DM-tropic viruses in PBMC samples from patients with primary HIV-1 subtype-B infection in 1996-2007; the French ANRS CO06PRIMO Cohort Study. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 135-41.
32. Lagaye S, Derrien M, Menu E, et al. Cell-to-cell contact results in a selective translocation of maternal human immunodeficiency virus type 1 quasispecies across a trophoblastic barrier by both transcytosis and infection. *J Virol* 2001; 75:4780-91.
33. Fear WR, Kesson AM, Naif H et al. Differential tropism and chemokine receptor expression of human immunodeficiency virus type 1 in neonatal monocytes, monocyte-derived macrophages, and placental macrophages. *J Virol* 1998; 72:1334-44.
34. Kitchen SG, Zack JA. CXCR4 expression during lymphopoiesis: implications for human immunodeficiency virus type 1 infection of the thymus. *J Virol* 1997; 71: 6928-34.
35. Johnston E, Zijenah L, Mutetwa S et al. High frequency of syncytium-inducing and CXCR4-tropic viruses among human immunodeficiency virus type 1 subtype C-infected patients receiving antiretroviral treatment. *J Virol* 2003; 77:7682-8.
36. Holtkamp N, Otteken A, Findhammer S et al. Unexpected coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from viremic patients under highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2000; 181: 513-21.<<
37. D'Aquila RT, Sutton L, Savara A, Hughes MD, Johnson VA. CCR5/Dcc5 heterozygosity: a selective pressure for the syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 phenotype. NIAID AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Virology Team. *J Infect Dis* 1998; 177 (6):1549-53.
38. Gervais A, Nicolas J, Portales P et al. Response to treatment and disease progression linked to CD4+ T cell surface CC chemokine receptor 5 density in human immunodeficiency virus type1 vertical infection. *J Infect Dis* 2002; 185:1055-61.
39. Shalekoff S, Gray GE, Tiemessen CT. Age-related changes in expression of CXCR4 and CCR5 on peripheral blood leukocytes from uninfected infants born to human immunodeficiency virus type 1-infected mothers. *Clin Diag Lab Immunol* 2004; 11:229-34.