

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES DEL SIDA

Caracterización biológica de aislamientos de VIH-1 en pacientes con una evolución clínica rápida

Dra. Leonor Lobaina Barthelemy,¹ Lic Marta Dubed Echevarría,² Lic. Olga Lidia Vilarrubia Montes de Oca,³ Dra. Leonor Navea Leyva,¹ Dr. Héctor M. Díaz Torres,⁴ Lic. Maricela Izquierdo Márquez⁵ y Lic. Enrique Noa Romero⁵

RESUMEN

Se estudiaron las características biológicas de 11 cepas de VIH-1 aisladas de pacientes con rápida evolución clínica al sida. Los aislados virales se clasificaron según su cinética de replicación y tropismo celular, con estos criterios se observó que 8 de las cepas aisladas (72,7 %) resultaron de crecimiento rápido alto o lento bajo 3 y con tropismo preferencial a la estirpe linfocítica, como corresponde a los pacientes con sida, mientras 3 (27,3 %) tuvieron características de lenta baja 1. La citopatogenicidad de las cepas se estudió en la línea celular MT4 y se observó que la mayoría (72,7 %) resultó inductora de sincicios (IS), por lo que se comprobó relación *in vivo* e *in vitro* de las propiedades biológicas, no ocurrió así en 3 de los cultivos (27,3 %) que se comportaron como no inductores de sincicios.

Descriptores DeCS: VIH-1/aislamiento & purificación; VIH-1/genética; SINDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA/virología; FENOTIPO.

La caracterización fenotípica de las cepas del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) ha adquirido gran importancia en los últimos años, ya que se ha encontrado asociación entre determinadas características biológicas de los aislamientos y los distintos patrones de progresión clínica reconocidos.¹⁻³

La variabilidad biológica del VIH-1 se evalúa por su cinética de replicación en cultivos primarios de linfocitos de sangre periférica y en líneas celulares continuas, por su tropismo celular, así como por su capacidad de inducir o no sincicios.³⁻⁶

Por lo general, las cepas de VIH-1 aisladas de individuos asintomáticos se corresponden con variantes no inductoras de sincicios (NIS) y cinética de replicación lenta baja (LB), mientras que las inductoras de sincicios

(IS) y crecimiento rápido alto (RA) están más relacionadas con la progresión al sida.⁴⁻⁶

La mayoría de las personas infectadas con el VIH-1 desarrolla el síndrome de inmunodeficiencia adquirida y muere; sin embargo, la duración del período asintomático varía de forma considerable, algunos individuos progresan al sida después del año de seroconversión y otros se mantienen asintomáticos por 10 años o más. Estas diferencias en la respuesta frente a un mismo agente causal se atribuyen a factores virales y/o del hospedero.⁴⁻⁵

Cerca del 10 % de los individuos infectados con el VIH-1 progresan al sida entre los 2 y 3 años después de la infección, y son considerados como progresores rápidos; entre 5 y 10 % de los sujetos permanecen

¹ Especialista de I Grado en Microbiología. Investigador Agregado.

² Master en Virología. Licenciada en Biología. Investigadora Agregada.

³ Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada.

⁴ Master en Infectología. Especialista de I Grado en Medicina Interna. Investigador Agregado.

⁵ Licenciado en Biología. Investigador Agregado.

asintomáticos después de 7 a 10 años y son llamados no progresores; y en el resto de los infectados el tiempo medio aproximado para desarrollar manifestaciones clínicas es de 10 años y se consideran progresores típicos.⁷

Según estudios epidemiológicos que incluyen a todos los pacientes cubanos infectados por VIH-1, el período de incubación, calculado a partir de la fecha probable de contagio, tiene una media de 11 años. Sin embargo, observamos un subgrupo de individuos cuya progresión clínica ocurrió en 2 años o menos, y ello motivó a la realización del estudio de las características biológicas de sus aislados virales, con el objetivo de determinar si el fenotipo de las cepas tenía relación con la rapidez de la aparición de los síntomas.

MÉTODOS

Se estudiaron 11 personas seropositivas con un período de evolución al sida menor que 2 años, tiempo que se determinó desde la posible fecha de infección hasta que se presentaron los primeros síntomas de la enfermedad.

Aislamiento viral. El virus se aisló de las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los pacientes, que se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco), con 10 % de sueros fetal bovino (Gibco), penicilina-estreptomomicina (100 U y 100 µg/mL, respectivamente (Difco) y 10 µg/mL de fitohe-maglutinina (DAVIHFHA, DAVIHLAB, Cuba) man-tenidas a 37 °C y atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

A las 72 h las células se cocultivaron con CMSP de donantes sanos previamente estimuladas con FHA y se les adicionó medio con 10 U/mL de interleucina 2 (IL-2) (ICN-Biochemical, Inc.) y polibrene.

Los cultivos se mantuvieron 28 d. Una vez por semana se cosechó sobrenadante para determinar la producción de virus mediante ELISA de captura de antígeno p24 (DAVIH Agp24, DAVIHLAB, Cuba), que presenta un límite de detección de 16 pg, y se les adicionó medio y células frescas no infectadas.

Se consideró un cultivo positivo si en 2 semanas consecutivas los sobrenadantes cosechados resultaron reactivos para el Agp24,

Caracterización biológica. Los sobrenadantes positivos por ELISA se inocularon en CMSP de donantes sanos y en las líneas celulares linfocíticas CEM, Jurkat tat y MT4, así como en las células U937 de estirpe monocítica. Los cultivos se mantuvieron 28 d en condiciones similares a los aislamientos primarios y se evaluaron con el mismo criterio para determinar su positividad.

Clasificación de las cepas. Según su:

- Tropismo celular: linfocitotrópicas y monocitotrópicas.⁸
- Cinética de replicación: RA y LB, este último se subdividió en 3 subgrupos (LB1, LB2 y LB3).^{3,8}
- Citopatogenicidad: capacidad de inducir o no sincicios en la línea celular MT4 (IS ó NIS).⁸

RESULTADOS

El VIH-1 se aisló de los 11 pacientes incluidos en el estudio. El análisis de la cinética de replicación y el tropismo en las líneas celulares y los cultivos primarios permitieron la caracterización de las cepas. En la tabla se observa que los 11 aislados se replicaron bien en las CMSP, pero no en todos los sustratos celulares empleados. Tomando en cuenta lo anterior, se clasificaron 4 aislamientos como RA (36,3 %), 3 como LB1 (27,3 %) y 4 como LB3 (36,3 %), estas últimas se consideran una forma transitoria o intermedia de las cepas.

Los 4 virus que se replicaron en la línea monocítica U937 resultaron de crecimiento RA.

TABLA. Clasificación de las cepas aisladas tomando en cuenta la cinética de replicación, el tropismo celular y la capacidad de inducir sincicios en la línea celular MT4

Cepas	Replicación					Clasificación
	CMSP	CEM	J.TAT	MT4	U937	
92CU001	+	+	+	+ _s	-	LB3
92CU002	+	+	+	+ _s	-	LB3
92CU003	+	-	+	+ _s	-	LB3
92CU004	+	+	+	+ _s	-	LB3
92CU006	+	+	+	+ _s	+	RA
92CU008	+	-	-	-	-	LB1
92CU013	+	-	-	-	-	LB1
92CU016	+	-	-	-	-	LB1
92CU020	+	+	+	+ _s	+	RA
92CU021	+	+	+	+ _s	+	RA
92CU022	+	+	+	+ _s	+	RA
Total	11/11	6/11	8/11	8/11	4/11	

(+): Replicación del virus determinada por ELISA Agp24.

(-): No se detectó replicación de virus por ELISA Agp24.

(s): Expresión de sincicios en el cultivo.

Ocho de los 11 cultivos (72,7 %) resultaron IS mientras 3 (27,3 %) se clasificaron NIS. Al evaluar la relación de la cinética de replicación y la capacidad de inducir sincicios, de las 8 cepas IS, 4 resultaron de crecimiento RA y 4 LB3. Las 3 NIS sólo se replicaron en CMSP, por lo que se clasificaron como LB1.

DISCUSIÓN

Los resultados indican que el VIH-1 se pudo aislar del 100 % de los cultivos que proceden de pacientes con sida; el fácil recobrado del virus se debe al aumento de los niveles de los virus en sangre que tienen los pacientes con manifestaciones clínicas de sida. Varios autores, por vías diferentes y mediante métodos cuantitativos de aislamiento y reacción en cadena de la polimerasa, llegaron a la conclusión de que la fracción de células infectadas en la sangre periférica parece ser de 100 a 1 000 veces mayor en los casos de sida que en portadores asintomáticos.⁹⁻¹²

Otros autores que investigaron el fenotipo biológico, observaron la asociación entre las cepas altamente virulentas y la progresión de la infección, sugirieron que las características biológicas de los virus aislados pueden tener valor pronóstico además de ayudar en la identificación de los individuos con necesidad de cambio de las drogas antivirales. En este estudio, el 72,7 % de las cepas tuvieron un comportamiento que avala esta hipótesis debido a que 4 de los aislamientos se comportaron como RA y 4 presentaron las características propias de la forma transitoria entre los LB y RA, denominada LB3. No obstante, 3 aislamientos se clasificaron como LB1; en relación con este tipo de aislamiento en pacientes con progresión clínica rápida, debemos señalar que en los trabajos de *Karlsson* y otros y de *Koot* y otros, citados por *Fenyo*, se informa que individuos infectados con el virus LB pueden retener este tipo de cepa aun durante el desarrollo de la inmunodeficiencia y el sida.¹²⁻¹⁴

Los 4 aislamientos que se replicaron en la línea celular monocítica U937 fueron los de crecimiento RA, este resultado no coincide con las observaciones de *Fenyo* y *Terssmete* y otros, quienes encontraron que las cepas con capacidad replicativa alta son linfocitotrópicas, mientras las de crecimiento LB se replican con preferencia en las líneas celulares de estirpe monocítica. No obstante, otros autores demostraron que los aislamientos de VIH-1 pueden infectar monocitos y linfocitos con independencia del fenotipo biológico y la evolución de la infección, y ello apoya la hipótesis de que para infectar las células monocíticas se necesita una alta multiplicidad del virus y los niveles de expresión en dichas células son al menos 10 veces más bajos.^{8,14-16}

Si bien 72,7 % de las cepas aisladas de los pacientes se comportaron como IS, 27,3 % de ellas resultaron NIS. En un estudio previo observamos que los virus recobrados de individuos con progresión más lenta al sida, tuvieron un comportamiento similar debido a que 36,4 % de ellos no resultaron citopáticos.¹⁷ Otros autores

destacan que las variantes IS se asocian con una rápida evolución de la infección, pero no excluyen que alrededor de 50 % de los virus aislados de pacientes con sida pueden ser NIS; se plantea que en estos casos existe una diferencia entre las propiedades biológicas *in vivo* e *in vitro*.^{14,16,18-21}

Por análisis de las características biológicas de los aislamientos, muchos investigadores llegaron a la conclusión de que la cinética de replicación y la citopatogenicidad coinciden, por ello las cepas RA y LB3 son IS, y las LB1 y LB2 son NIS; lo que concuerda con nuestros resultados. No obstante, debemos decir que en estudios recientes de aislamientos procedentes de niños con sida se observó un nuevo fenotipo vírico de cepas que se replicaron con altos títulos de Agp24 en la línea celular MT2 y no produjeron efecto citopático en ella, y por ende se clasificaron como NIS; además, seguimientos longitudinales de pacientes han aportado datos de utilidad con la observación de cepas RA y NIS que aparecen de forma previa a las RA e IS, y explican el cambio de la cinética de replicación de los aislamientos NIS, lo que constituye uno de los marcadores importantes en la progresión de la enfermedad.^{2,3,21}

Con estos resultados llegamos a la conclusión de que hubo relación *in vivo* e *in vitro* de las propiedades biológicas de las cepas en la mayoría (72,8 %), pero no en todos los pacientes con rápida progresión de la infección, y por ello, aunque las consideramos como uno de los marcadores importantes de la progresión clínica al sida, se necesitan estudios genéticos y de las condiciones y sustratos de los cultivos para profundizar en la respuesta diferencial del fenotipo vírico observada en algunas cepas y su comportamiento *in vivo*. Es por esto que nos unimos a los criterios de que la variabilidad biológica es en general una propiedad del VIH que se relaciona con el proceso patogénico.³

SUMMARY

The biological characteristics of 11 HIV-1 strains isolated from patients with a fast clinical evolution to AIDS were studied. The viral isolates were classified according to their replication kinetics and cell tropism. Taking into account these criteria, it was observed that 8 of the isolated strains (72,7 %) were of rapid high growth (RH) or slow low 3 (SL3) with preferential tropism to the lymphocytic stock, as it corresponds to AIDS patients. 3 (27,3 %) had characteristics of slow low 1 (SL1). The cytopatogenicity of the strains was studied in the MT4 cellular line, and it was observed that most of them (72,7 %) were syncytium-inducing strains (SI), which allowed to prove the *in vivo* and *in vitro* relation of the biological properties. It was not so in 3 of the cultures (27,3 %) that behaved as non-syncytium inducers.

Subject headings: HIV-I/isolation & purification; HIV-1/genetics; ACQUIRED IMMUNODEFICIENCY SYNDROME/virology; PHENOTYPE.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jong JJ de, Ronde A de, Keulen W, Tersmette M, Goudsmit J. Minimal requirements for the human immunodeficiency virus type 1 V3 domain to support the syncytium-inducing phenotype: analysis by single amino acid substitution. *J Virol* 1993;66:6777-82.
2. Pérez AL. Fenotipo vírico. *SESIDA* 1995;6:210-1.
3. Fenyo EM. The role of HIV biological phenotype in transmission and pathogenesis. *SESIDA* 1995;6:164-5.
4. Tersmette M, Schuitemaker H. Virulent HIV strains? *AIDS* 1993;7:1123-5.
5. Nielsen C, Pedersen C, Lundgren DJ, Genstad J. Biological properties of HIV isolates in primary HIV infection consequence for the subsequent course of infection. *AIDS* 1993;7:1035-40.
6. Roos MT, Lange JMA, Goede RE de, Coutinho RA, Schellekens PTA, Miedema F. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1992;165:427-32.
7. Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 1996;271:324-7.
8. Fenyo EM, Morfeldt-Manson L, Chiodi F, Lind B, Gegerfelt A von, Albert J, et al. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* 1988;62:4414-9.
9. Jackson JB, Kwok S, Sninsky J, Balfour HH. Human immunodeficiency virus type 1 detected in seropositive symptomatic and asymptomatic individuals. *J Clin Microbiol* 1990;28:16-9.
10. Ehrnst A, Sonnerborg A, Bergdahl S, Strannegard O. Efficient isolation of HIV from plasma during different stage 1 of HIV infection. *J Med Virol* 1988;26:23-32.
11. Jackson J, Coombs R, Sannerud K, Rhame F, Balfour H. Rapid and sensitive viral culture method for human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 1988;26:1416.
12. Fenyo EM, Albert J, Asjo B. Replicative capacity, cytopathic effect and cell tropism of HIV. *AIDS* 1989;3:S5-S12.
13. Karlsson A, Parsmyr K, Sandstrom E. Differences in risk for AIDS mortality associated with biological properties of variants. *Lancet* 1989;1:983-5.
14. Tersmette M, Goede R de, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, et al. Differential syncytium-inducing capacity of HIV isolates. Frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with AIDS and ARC. *J Virol* 1988;62:2026-32.
15. Gartner S, Popovic M. Macrophage Tropism of HIV-1. *AIDS Res Hum Retrov* 1990;6:1017-21.
16. Valentin A, Albert J, Fenyo EM, Asjo B. Dual tropism for macrophages and lymphocytes is a common feature of primary human immunodeficiency virus type 1 and 2 isolates. *J Virol* 1994;68:6684-9.
17. Lobaina L, Noa E, Dubed M, Navea L, Vilarrubia OL, Díaz H. Isolation and virological characterization of HIV-1 in Cuba. Relationship with the clinical status of the patients. *Biomed Pharmacother* 1996 (en prensa).
18. Tersmette M, Lange J, Goede RE de, Wolf F de, Schatterkerk E, Schellekens P, et al. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and mortality. *Lancet* 1989;1:983-5.
19. Koot M, Keet IPM, Vos AHV, Goede RE de, Ross M, Coutinho RA, et al. Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993;118:861-88.
20. Wolf F de, Hogervorst ELS, Goudsmit JAAP, Fenyo EM, Rubsamen-Waigmann H, Holmes H, et al. Syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus type 1 subtypes other than B: phenotypic and genotypic characteristics. *AIDS Res Hum Retrov* 1994;10:1387-400.
21. Forte SE, Byron KS, Sullivan JL, Somasundaran M. Non-Syncytium-Inducing HIV type 1 isolated from infected individuals replicates in MT-2 cells. *AIDS Res Hum Retrov* 1994;10:1613-7.

Recibido: 13 de diciembre de 1996. Aprobado: 3 de junio de 1997.
 Dra. *Leonor Lobaina Barthelemy*. Laboratorio de Investigaciones del Sida. Carretera de Tapaste y Ocho Vías, San José de Las Lajas, provincia de La Habana, Cuba. Apartado 23031.