

# Vinculación de Nef con los determinantes inmunológicos y virológicos del SIDA

Guillermo Gómez-Icazbalceta,\* Carlos Larralde\*

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

## *Linking Nef with the immunological and virological determinants of AIDS*

### ABSTRACT

*Nef is an accessory protein from HIV-1 involved in viral replication, depletion of CD4 + T cells and progression to AIDS. The participation of Nef in altering several of the cellular and subcellular components has been studied in detail. The finding that infected patients over 15 years with HIV-1 variants that expressed a defective nef gene had not progressed to AIDS, suggested that Nef played a decisive role in the outcome of AIDS, through the regulation of different virological and immunological components. In addition, the mere expression of Nef is able to induce AIDS in transgenic mice and alter the kinetics of replication of the virus in infected monkeys. This review examines the relationship between the expression of Nef and the ultimate consequences of HIV-1 infection, taking into account the most relevant clinical parameters: viral load, counting of CD4 + T cells and progression to AIDS. Under this approach, it is emphasized the role of Nef as immunomodulator and also as independent mediator of damage to the immune system.*

**Key words.** Nef. HIV-1. Immunomodulator. AIDS determinants.

### RESUMEN

Nef es una proteína accesoria del VIH-1 que promueve la replicación viral, la depleción de linfocitos T CD4+ y la progresión al SIDA. La participación de Nef en la modificación de los diferentes componentes celulares y subcelulares ha sido estudiada en detalle. El hallazgo de que pacientes infectados por más de 15 años con variantes del VIH -1 que expresaban una variante defectuosa del gen nef no habían progresado al SIDA en más de quince años de infección, sugirió que Nef jugaba un papel determinante en el desencadenamiento del SIDA a través de la regulación de los diferentes componentes virológicos e inmunológicos. Además, la sola expresión de Nef es capaz de inducir un cuadro similar al SIDA en ratones transgénicos y de alterar la cinética de replicación del virus en monos infectados. En esta revisión se analiza la relación entre la expresión de Nef y las consecuencias finales de la infección por el VIH-1, tomando en cuenta los parámetros clínicos más relevantes: carga viral, cuenta de linfocitos T CD4+ y progresión al SIDA. Bajo ese enfoque, se enfatiza el papel inmunomodulador de Nef y además se sugiere que Nef posee un potencial independiente de daño al sistema inmune.

**Palabras clave.** Nef. VIH-1. Immunomodulador. Determinantes del SIDA.

## VIH-1, NEF Y SIDA

Los mecanismos que desencadenan el SIDA no han sido completamente dilucidados. La diversidad técnica y metodológica empleada para estudiar las interacciones del VIH-1 con su hospedero, así como la complejidad intrínseca de la infección y de los mecanismos fisiopatológicos han resultado en un entramado de difícil acceso que ha ido complicándose.<sup>1</sup> Para 1985 se postuló que la patogénesis del SIDA podía residir en la propiedad del virus de la inmunodeficiencia

humana tipo 1 (VIH-1) para infectar y destruir directamente a los linfocitos T CD4+.<sup>2</sup> El reestablecimiento significativo del número de linfocitos T CD4+ y de las funciones inmunológicas con el tratamiento antirretroviral sustenta fuertemente la validez de ese postulado.<sup>3</sup> Sin embargo, para 1993 las evidencias experimentales cuestionaron a la replicación viral como el único factor causante del colapso inmunológico en el SIDA.<sup>4</sup> En 1992 se mostró por primera vez la ausencia de progresión al SIDA tras 15 años de infección en un grupo de pacientes infecta-

dos con el VIH-1 a través de la transfusión de sangre contaminada proveniente de un mismo donador. El análisis molecular reveló que estaban infectados con una variante del VIH-1 que codificaba para la proteína viral Nef en forma defectuosa.<sup>5</sup> Esos pacientes se caracterizaban por presentar replicación viral baja y cuenta de linfocitos T CD4+ relativamente estable. Sólo después de 25 años de infección aparentemente no progresiva, en algunos de esos pacientes se ha observado un aumento considerable de la replicación viral concomitante con pérdida significativa de linfocitos T CD4+ y progresión al SIDA.<sup>6</sup> Por lo tanto, la ausencia de la proteína viral Nef en forma funcional regula la replicación viral, repercutiendo así en la cuenta de linfocitos T CD4+ y en la progresión al SIDA. La participación de Nef en la promoción de mayor replicación viral a través de la modificación de los diferentes componentes celulares y subcelulares ha sido estudiada en detalle.<sup>7</sup> El presente trabajo se enfoca en la relación entre la expresión de Nef y las consecuencias finales de la infección por el VIH-1, tomando en cuenta los parámetros clínicos de mayor relevancia: cuenta de linfocitos T CD4+, carga viral y progresión al SIDA. Los hallazgos presentados bajo dicho enfoque permiten señalar que Nef puede ser un mediador independiente de daño al sistema inmunológico y de progresión al SIDA.

### NEF: UNA PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL

Nef es una proteína accesoria del VIH-1 constituida por aproximadamente 207 aminoácidos, que no forma parte del virión maduro. Se expresa como un transcrito temprano durante el ciclo de replicación viral. El gen que codifica para Nef se encuentra en el extremo 3' del genoma viral, parcialmente sobrelapa-

do con el extremo 3' del gen que codifica para la proteína Env. Posterior a su expresión, Nef puede sufrir dos modificaciones postraduccionales: miristilación y fosforilación. La miristilación es la modificación frecuente, le confiere a la proteína Nef la propiedad de interactuar con lípidos y proteínas de membrana involucrados en la activación del linfocito T.<sup>8</sup> Adicionalmente, la miristilación altera la concentración y disponibilidad de Nef en diferentes regiones intracelulares. Dicha redistribución es de gran relevancia funcional porque la ubicación y la concentración subcelulares de Nef causan efectos variables sobre la fisiología celular.<sup>9</sup> Por el contrario, la relevancia funcional de la fosforilación de Nef no es bien conocida; algunos estudios indican hacia una posible relación entre la fosforilación de Nef y la amplificación de la infectividad viral y la endocitosis del receptor CD4.<sup>10</sup>

Nef posee tres regiones físicas distinguibles: región amino terminal o N-terminal, región del *core* y región carboxilo terminal o C-terminal. Cada región ejerce varias funciones, tanto diferentes como sobrelapadas entre sí, sobre el linfocito T y la replicación del virus.<sup>11</sup> Las funciones de Nef postuladas como de mayor relevancia en la infección por el VIH-1 son la regulación negativa de la expresión de CD4 y del MHC-I, el aumento de la replicación viral y el aumento de la infectividad (Cuadro 1).<sup>11</sup>

Adicionalmente se ha observado que la transfección de Nef en líneas celulares de linfocitos T CD4+ reduce la secreción de interleucina 2 e interferón gamma en una forma dependiente de la expresión de Nef.<sup>12</sup> En otro estudio se mostró que la transfección de Nef influye en la quimiotaxis de linfocitos T CD4+ en respuesta a SDF-1 $\alpha$ , el ligando natural de CXCR4, que es un receptor expresado sobre la membrana de los linfocitos T CD4+.<sup>13</sup> Por lo tanto, la expresión

**Cuadro 1.** Contribución de las diferentes regiones de Nef sobre algunas funciones celulares y virales.

Región	Acción intracelular predominante	Consecuencias celulares más relevantes	Efecto sobre la infectividad (i) y la replicación (r) viral
N-terminal ( a.a. 2 al 57)	Anclaje a la membrana celular a través de su unión con ácido mirístico	Amplificación de la activación del linfocito T al interactuar con moléculas de membrana (TCR, CD28)	(i): parcial (r): requerida
Core (a.a. 56 al 206)	Unión a regiones SH3 de diversas proteínas de señalización a través de su secuencia rica en prolina	* Endocitosis de CD4 y MHC I. * Reclutamiento de cinasas. * Alteración del tráfico intracelular de proteínas.	(i): no requerido (r): desconocido
C-terminal (a.a. 203 al 206)	Expresión en la superficie de la membrana celular	Inducción de sincios entre células infectadas y no infectadas.	(i): desconocido (r): desconocido

de Nef influye marcadamente en la replicación viral, en la expresión de receptores de membrana y en el perfil de secreción de algunas moléculas asociadas a una respuesta inmune antiviral.

#### NEF EN EL CICLO REPLICATIVO DEL VIH

El ciclo infeccioso del VIH-1 inicia con la entrada del virus a la célula mediante la interacción del complejo de proteínas virales de membrana gp120/gp41 con el receptor celular CD4 y alguno de los correceptores de quimiocinas, principalmente, CCR5 o CXCR4, expresados sobre la membrana de la célula blanco. Esta interacción conduce a la fusión de las membranas celulares y virales y a la entrada del virus a la célula. Posteriormente, el ARN del virus es traslocado al núcleo y retrotranscrito a ADN y finalmente es integrado en el ADN de la célula.<sup>14</sup> Enseguida ocurre la transcripción y síntesis de partículas virales. Sin embargo, se ha reportado que en algunos casos más del 99% del ADN del VIH-1 no está integrado en el genoma celular durante la fase asintomática de la infección.<sup>15</sup> En la infección por el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), la prevalencia de ADN viral no integrado es similar a la del VIH-1 durante los estados previos de inmunodeficiencia, sugiriendo que es un acontecimiento compartido entre algunos retrovirus.<sup>16</sup> Se ha sugerido que esa forma no integrada de ADN viral es el origen del ciclo infeccioso del VIH-1.<sup>17</sup> En la infección *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica la proteína Nef se expresa abundantemente durante esa fase de pre-integración.<sup>18</sup> La expresión intracelular de Nef afecta varias vías de transducción de señales que convergen en una reducción del umbral de activación del linfocito T, la cual es necesaria para promover una elevada producción de partículas virales.<sup>19</sup> Además, la activación del linfocito T facilitada por Nef acelera la integración del genoma viral en el genoma celular.<sup>16</sup> Por lo tanto, la expresión temprana de Nef induce cambios en el ambiente celular que conducen a una elevada replicación del VIH-1.

#### RELACIÓN DE LAS FUNCIONES DE NEF CON EL ESTADO CLÍNICO DEL PACIENTE

Se ha analizado la relación entre el estado clínico y la capacidad de las variantes de Nef recuperadas de varios pacientes infectados para desplegar cuatro de las propiedades de Nef de mayor relevancia *in vitro*: regulación negativa de los receptores CD4 y MHC I, la amplificación de la replicación viral y la amplifica-

ción de la infectividad. El análisis se hizo transfectando linfocitos Jurkat T CD4+ con un plásmido que contenía la secuencia del gen nef obtenida por RT-PCR a partir de células mononucleares de sangre periférica de varios individuos infectados.<sup>20</sup> Se encontró que las variantes de Nef amplificadas durante la fase asintomática de la infección eran más activas en regular negativamente la expresión del MHC I. Estudios *in vitro* han demostrado que las células de sangre periférica infectadas con el VIH-1 que expresan a Nef son menos susceptibles a la lisis por linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTL) que las células infectadas con variantes del VIH-1 que no expresan a Nef.<sup>21</sup> El nivel de la resistencia a la lisis por los CTL se correlacionó con la capacidad de Nef para regular negativamente la expresión del receptor MHC I. Por el contrario, variantes de Nef encontradas en la fase del SIDA tenían mayor capacidad para estimular la replicación viral y la infectividad del virus. Estos hallazgos, además, sugieren un efecto de presión selectiva de las funciones de Nef por el sistema inmune. En individuos inmunocompetentes, la capacidad para inhibir la expresión del MHC- I se ve favorecida debido probablemente a la presencia de una fuerte respuesta inmune mediada por los CTL. Esas mismas variantes no son favorecidas en la etapa del SIDA, donde la actividad inmune es prácticamente indetectable. Por el contrario, las variantes con una gran actividad infectiva y replicativa son favorecidas en las etapas avanzadas de la infección. Por el otro lado, se ha señalado que la regulación negativa de la expresión del receptor CD4 mediada por Nef previene la superinfección celular por varias partículas virales, evitando la lisis prematura de la célula infectada.<sup>22</sup> Además, la inhibición de la expresión del receptor CD4 acelera la gemación de viriones al prevenir la interacción de gp120 con el receptor CD4 dentro de la célula.<sup>23</sup> Se ha hipotetizado que tanto el alargamiento de la vida de la célula infectada al prevenir la superinfección, así como la facilitación de la gemación de nuevos viriones convergen en el aumento de la replicación viral.<sup>24</sup>

Por lo tanto, la expresión intracelular de Nef influye en la activación del linfocito T CD4+, en la tasa de replicación viral y en la reducción de la eliminación por los CTL de células infectadas por el VIH-1.

#### PAPEL DE NEF COMO UNA TOXINA VIRAL: MÁS ALLÁ DEL CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIRUS

El postulado central de la patogénesis del SIDA señala que la progresión a la enfermedad se relaciona con el aumento de la replicación viral y, en algu-

nos casos, se ha postulado directamente como el factor desencadenante del SIDA.<sup>25, 26</sup> Sin embargo, resulta notable que células infectadas con el VIH-1 liberan al medio extracelular dos proteínas virales accesorias: Tat y Nef. Se ha detectado la presencia de Nef extracelular en concentraciones plasmáticas de 1 a 10 nanogramos por mililitro en la sangre periférica de algunos pacientes infectados.<sup>27</sup> Experimentos *in vitro* han mostrado que Nef extracelular induce apoptosis de linfocitos T CD4+,<sup>28</sup> altera la maduración de células dendríticas<sup>29</sup> y regula negativamente la expresión del receptor CD8, sugiriendo que Nef podría afectar la diferenciación de linfocitos T CD8+ hacia CTL con la capacidad para eliminar células infectadas.<sup>30</sup> Asimismo, Nef inhibe la secreción de anticuerpos por linfocitos B contra *Candida albicans*.<sup>31</sup> Experimentos en modelos de ratas han demostrado que Nef extracelular afecta la quimiotaxis de leucocitos.<sup>32</sup> Estos resultados sugirieron que Nef tiene la capacidad tanto *in vitro* como *in vivo* de modular varios componentes de la respuesta inmune.

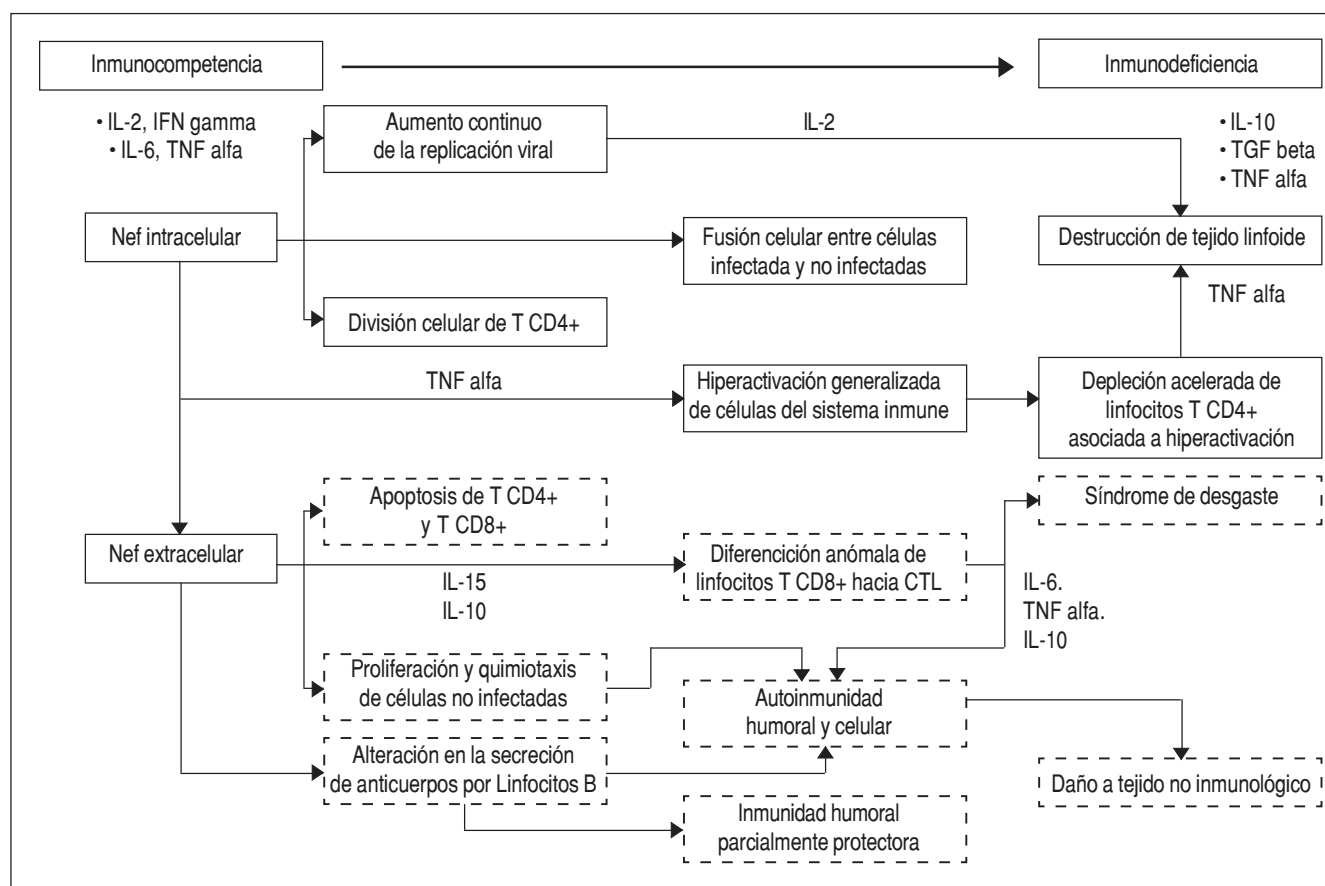
La posibilidad de que la sola expresión de Nef induzca un cuadro patológico *in vivo* ha sido demostrada en ratones. Empleando ratones transfectados total o parcialmente con el genoma del VIH-1, se demostró que la sola expresión del gen nef induce un cuadro similar al SIDA en igual magnitud que el inducido en ratones transfectados con el genoma viral completo, mientras que los ratones transfectados con todo el genoma viral excepto con el gen nef, no desarrollan la enfermedad.<sup>33</sup> Estudios en simios han mostrado que, en consonancia con el postulado central, la infección de macacos infectados con variantes patogénicas del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV) conduce a una elevada replicación viral, depleción de linfocitos T CD4+ y más rápida progresión al SIDA. Por el contrario, macacos infectados con variantes no patogénicas del SIV debido a mutaciones o deleciones en el gen nef que codifican para una proteína Nef no funcional presentan cargas virales bajas, cuenta de linfocitos T CD4+ estables e infección no progresiva.<sup>34</sup> Sin embargo, se ha observado que en algunos casos, después de algún tiempo de infección no progresiva la variante viral adquiere varias mutaciones que restauran el marco de lectura del gen nef, permitiendo la expresión de Nef en forma funcional. El resultado final es la recuperación de la virulencia y el desarrollo del SIDA.<sup>35</sup> Algunas de esas mutaciones le devuelven a Nef la capacidad para interactuar con moléculas de señalización implicadas en la activación del linfocito T.<sup>36</sup> En humanos la selección de virus que recuperan a Nef en

forma funcional ha sido evidenciada en un paciente inicialmente clasificado como no progresor, en el cual la pérdida de 36 pares de bases en la región del gen nef fue restaurada parcialmente mediante el surgimiento de una duplicación de una secuencia adyacente.<sup>37</sup> Estos estudios subrayan que la presión de selección mediada por la respuesta inmune puede favorecer la selección de variantes virales que recuperan la expresión de Nef de forma funcional.

Dado que la detección del gen nef en forma funcional se corresponde con replicación viral elevada, es difícil distinguir un efecto independiente de Nef sobre el daño inmunológico y la progresión al SIDA en humanos. Tampoco es posible dilucidar si el aumento de la replicación viral depende de cierto daño previo inducido por Nef sobre la funcionalidad del sistema inmunológico, aunque se ha demostrado que en algunos casos el aumento de la replicación viral es concomitante con la detección de infecciones oportunistas, que son un indicador inconfundible de deterioro inmunológico,<sup>38</sup> sugiriendo que el aumento de la replicación viral podría ser consecuencia de ese deterioro. Dado que las evidencias experimentales y la infección natural en humanos señalan que Nef es esencial para que se desarrollen varios de los eventos inmunopatológicos observados en la infección por el VIH-1 (Figura 1), es concebible hipotetizar que Nef tiene un efecto de daño al sistema inmunológico independiente o complementario al daño causado por la replicación viral.

El VIH-1 inhibe la proliferación de células humanas de médula ósea en cultivo. La misma inhibición se logra empleando una variante del VIH-1 impedido genéticamente para replicarse. Sin embargo, la inhibición de la proliferación celular por el VIH-1 replicante se bloquea con anticuerpos anti-Nef. De hecho, la sola adición de Nef extracelular reproduce ese efecto inhibitorio, pero no la adición del virus deletado en el gen nef.<sup>39</sup> La inducción de un cuadro patológico debido a un agente viral defectuoso para replicarse parece ser una propiedad compartida entre algunos virus como enterovirus,<sup>40</sup> virus linfotrópico humano tipo 1<sup>41</sup> y virus de la leucemia felina.<sup>42</sup> En ratones se ha demostrado la inducción de un cuadro de inmunodeficiencia severa al infectarlos con el virus de la leucemia murina con capacidad defectuosa para replicarse.<sup>43</sup> Por lo tanto, la replicación viral elevada para el desarrollo de inmunopatología viral no es necesaria en algunos modelos experimentales.

Si la sola expresión de Nef fuese suficiente para conducir a la célula a un estado patológico que tenga implicaciones a nivel fisiológico en humanos aún no



**Figura 1.** Interacciones de Nef con el VIH-1 y el sistema inmune para inducir daño y conducir al SIDA. Símbolos en recuadros: - - - La evidencia experimental in vitro sugiere que Nef podría determinar estos efectos in vivo.

se ha determinado directamente. En 1992 se publicó un estudio de cohorte que mostraba a un grupo de pacientes australianos infectados por más de 15 años con una variante del VIH-1 que poseía una mutación en el gen nef que codificaba para una proteína Nef no funcional.<sup>5</sup> En este grupo la carga viral era indetectable o muy baja. El número de linfocitos T CD4+ era estable en algunos individuos mientras que en otros había declinando muy lentamente. Poco tiempo después aparecieron en otros países estudios de cohorte donde el virus detectado en los pacientes señalados como no progresores tenía mutaciones severas en nef.<sup>44</sup> También se han aislado variantes de Nef no funcionales de niños infectados por vía perinatal y que exhiben infección no progresiva.<sup>45</sup> En otra cohorte de pacientes japoneses infectados no progresores por más de 15 años se demostró que también portaban virus con mutaciones importantes en nef y en otros genes accesorios, es decir, que no forman parte del virión maduro, como rev, vif, y vpr. Además, las secuencias virales recuperadas de estos pacientes no eran secuencias fósiles

de virus no replicante, sino de virus en replicación continua, debido a la presencia de variantes virales en esos pacientes no progresores.<sup>46</sup>

La expresión de Nef en forma funcional altera la producción de citocinas, que son moléculas proteínicas que, a través de la regulación de la comunicación intercelular, disparan diversos efectos sobre la respuesta inmunológica, como inflamación, proliferación y diferenciación de linfocitos T<sup>47</sup> y también influyen en la replicación viral. La infección avanzada por el VIH-1 está asociada al aumento constante de la replicación viral así como al aumento de la producción de citocinas tanto supresoras como estimuladoras de la respuesta inmune.<sup>47</sup> Ese aumento está asociado, además, a inmunodeficiencia concomitante con hiperactivación del sistema inmune. Por lo tanto, la expresión de Nef funcional podría promover la hiperactivación del sistema inmune a través de la modulación de las citocinas y de sus diferentes componentes (Figura 1).

El seguimiento temporal de la evolución de la infección no progresiva es crucial para el diagnóstico



correcto de pacientes no progresores y para analizar la influencia de las mutaciones en nef en la infección de largo plazo. Así, en estudios posteriores se ha mostrado que algunos pacientes de la cohorte australiana han manifestado síntomas de progresión al SIDA, inclusive dos de ellos comenzaron tratamiento antirretroviral.<sup>49</sup> Esos pacientes, al momento de su caracterización inicial, mostraban un estatus de activación del sistema inmune similar al de individuos no infectados. Posteriormente, aquellos pacientes de la cohorte que habían progresado parcialmente al SIDA exhibieron mayor estatus de activación del sistema inmune. La activación del sistema inmune durante la infección por el VIH-1 se ha correlacionado con el deterioro de la inmunidad y la progresión al SIDA.<sup>50</sup> Así, se ha postulado que el aumento de la replicación viral y del estatus de activación del sistema inmune concomitante con la depleción de linfocitos T CD4+ y la progresión al SIDA son evidencias claras de que la ausencia de Nef funcional no previene el desarrollo del SIDA, sino que en realidad establece una infección con progresión al SIDA extremadamente lenta. Sin embargo, es muy importante considerar que las edades de los pacientes de la cohorte australiana al momento de manifestar signos de progresión al SIDA oscilaban entre 49 y 97 años, con una edad promedio de 71 años. Entre la década siete a ocho de vida en el humano ocurre una pérdida natural de linfocitos T CD4+.<sup>51</sup> El efecto de la edad en la progresión al SIDA se ha observado en la infección natural por el SIV de un mono sooty mangabey, la cual establece generalmente en esa especie de mono una infección con replicación viral muy elevada sin depleción de linfocitos T CD4+ y ausencia completa de progresión al SIDA. Sin embargo, en un sooty mangabey infectado por el SIV, la infección no progresiva se tornó progresiva y con desarrollo completo del SIDA sólo después de 18 años de infección, que es un tiempo que rebasa la expectativa normal de vida de esos monos, enfatizando la relación entre la edad avanzada y la capacidad del sistema inmune para contener la progresión al SIDA.<sup>52</sup> Por otra parte, hasta el momento no se ha documentado la progresión típica o acelerada al SIDA en pacientes infectados con variantes del VIH-1 que producen Nef no funcional.

#### LENTA PROGRESIÓN AL SIDA EN PRESENCIA DE NEF

Se ha reportado la lenta progresión al SIDA en presencia de Nef funcional, asociada principalmente a mutaciones en el co-receptor CCR5 o a la induc-

ción de una respuesta inmune específica mediada esencialmente por CTL.

Los pacientes que presentan mutaciones deletéreas heterocigóticas para el receptor CCR5, que es uno de los co-receptores del VIH-1, exhiben frecuentemente cargas virales bajas, cuentas de linfocitos T CD4+ estables y lenta progresión al SIDA.<sup>53</sup> Además, los linfocitos T CD4+ de pacientes homocigóticos para esa mutación son muy resistentes a infectarse con variantes primarias del VIH-1 del tipo X4 linfotrópicos, que son virus con gran capacidad citopática, cuya detección está asociada a más rápida progresión al SIDA.<sup>54</sup>

Por otra parte, algunos pacientes lentos progresores despliegan una potente respuesta inmune mediada por los CTL con capacidad para eliminar células infectadas. Esa respuesta, a diferencia de la detectada en los pacientes progresores, se caracteriza por la generación de los CTL completamente diferenciados.<sup>55</sup> Los pacientes asintomáticos que muestran una robusta respuesta inmune citotóxica mediada por los CTL mantienen cargas virales indetectables.<sup>56</sup> De hecho, los pacientes de la cohorte australiana desplegaban inicialmente una fuerte respuesta inmune mediada por los CTL asociada a lenta progresión, enfatizando la importancia de esa respuesta en la contención de la progresión al SIDA.<sup>57</sup>

Sin embargo, otros estudios han mostrado que en la infección de progresión lenta con virus que expresan a Nef de forma funcional, el incremento en la respuesta inmune citotóxica mediada por los CTL es indicador de progresión al SIDA.<sup>58</sup> Consistente con estas observaciones, en modelos animales la detección de una vigorosa respuesta por los CTL se correlaciona tanto con ausencia de enfermedad viral y protección contra la infección,<sup>59</sup> como con inmunodeficiencia severa inducida por los CTL.<sup>60</sup> Por lo tanto, la inducción de una respuesta inmune mediada por los CTL tanto protectora como promotora del SIDA podría depender de múltiples factores virológicos e inmunológicos.

La infección de macacos con una variante del SIV que tiene mutaciones en el gen nef induce protección contra la re-infección por el SIV de tipo patogénico. Esa protección es mediada por CTL.<sup>34</sup> Estos hallazgos sugieren que la expresión de Nef funcional podría afectar directamente a la generación de una respuesta inmune protectora mediada por los CTL. Dado que los CTL no se infectan con VIH-1, es posible que factores adicionales podrían mediar un efecto de daño sobre ellos, como la anergia debida a exceso de antígeno viral y la apoptosis inducida por células infectadas. Se desconoce si Nef extracelular

tiene algún efecto *in vivo* sobre la generación de los CTL. Resultados de nuestro laboratorio apuntan hacia un papel inmunomodulador *in vitro* de Nef extracelular sobre la proliferación y la inducción de actividad citotóxica en linfocitos T CD8+. <sup>61</sup>A bajas concentraciones, Nef exacerba la inducción de actividad citotóxica, pero no a altas concentraciones. A ambas concentraciones por otra parte, Nef extracelular modifica la proliferación celular.

Los hallazgos de progresión lenta al SIDA apuntan a un papel relevante de la expresión de Nef funcional en el desarrollo de la enfermedad, tanto en humanos como en modelos animales. Es especialmente en los modelos animales donde se ha demostrado claramente su efecto constante en el mantenimiento de cargas virales elevadas, en la depleción de linfocitos T CD4+ y en el desarrollo de diversas inmunopatologías asociadas al deterioro de la actividad inmune. Sin embargo, hay que destacar que la detección de Nef funcional no conduce al desarrollo del SIDA en todos los casos, ni está asociada a un curso de progresión al SIDA invariable entre todos los individuos infectados, indicando que la modulación de algunos componentes inmunológicos, como las citocinas, podrían contrarrestar o amplificar el deterioro de la funcionalidad del sistema inmune inducida por Nef. Al respecto, se ha postulado que el receptor de quimiocinas CXCR4 es el receptor de entrada de Nef a la célula, sugiriendo que este receptor podría establecer la susceptibilidad de cada tipo celular al efecto de Nef. <sup>62</sup> Este receptor se expresa abundantemente en varios tipos de tejidos, como pulmón, seno, ovario, páncreas y tejido linfoide, <sup>63</sup> sugiriendo que Nef extracelular podría extender sus efectos hacia tejidos no inmunológicos. La relación que guarda la concentración plasmática de Nef extracelular con los diferentes parámetros inmunológicos y virológicos y con el estado clínico del paciente, no se ha investigado hasta la fecha.

#### NEF ES UN FACTOR DETERMINANTE DE PROGRESIÓN AL SIDA

Los mecanismos de acción de Nef son muy complejos y dependen de la variabilidad genética, la composición bioquímica y la historia inmune de cada individuo, tanto para regular la replicación viral y promover el deterioro de la respuesta inmune, como para inducir protección contra la progresión al SIDA.

#### REFERENCIAS

- Larralde C, Huerta L. Network between main protagonists and events leading to AIDS. *Arch Med Res* 1996; 27: 107-13.
- Goedert JJ, Gallo RC. Epidemiological evidence that HTLV-III is the AIDS agent. *Eur J Epidemiol* 1985; 1: 155-9.
- Battagay M, Nüesch R, Hirschel B, Kaufmann GR. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 280-7.
- Cohen J. AIDS. The unanswered questions. *Science* 1993; 260: 1253-93.
- Learmont J, Tindall B, Evans L, Cunningham A, et al. Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* 1992; 340: 863-7.
- Gorry PR, Churchill M, Learmont J, Cherry C, et al. Replication-dependent pathogenicity of attenuated nef-deleted HIV-1 in vivo. *Acquir Immune Defic Syndr* 2007; 46: 390-4.
- Greenway AL, Holloway G, McPhee DA, Ellis P, et al. HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *J Biosci* 2003; 28: 323-35.
- Fenard D, Yonemoto W, de Noronha C, Cavois M, et al. Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement. *J Immunol* 2005; 175: 6050-7.
- Liu X, Schragger JA, Lange GD, Marsh JW. HIV Nef-mediated cellular phenotypes are differentially expressed as a function of intracellular Nef concentrations. *J Biol Chem* 2001; 276: 32763-70.
- Li PL, Wang T, Buckley KA, Chenine AL, et al. Phosphorylation of HIV Nef by cAMP-dependent protein kinase. *Virology* 2005; 331: 367-74.
- Fackler OT, Moris A, Tibroni N, Giese SI, et al. Functional characterization of HIV-1 Nef mutants in the context of viral infection. *Virology* 2006; 351: 322-39.
- Collette Y, Chang HL, Cerdan C, Chambost H, et al. Specific Th1 cytokine down-regulation associated with primary clinically derived human immunodeficiency virus type 1 Nef gene-induced expression. *J Immunol* 1996; 156: 360-70.
- Choe EY, Schoenberger ES, Groopman JE, Park IW. HIV Nef inhibits T cell migration. *J Biol Chem* 2002; 277: 46079-84.
- Trkola A. HIV-host interactions: vital to the virus and key to its inhibition. *Curr Opin Microbiol* 2004; 7: 555-9.
- Wu Y, Marsh JW. Early transcription from nonintegrated DNA in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 2003; 77: 10376-82.
- Mullins JI, Hoover EA, Quackenbush SL, Donahue PR. Disease progression and viral genome variants in experimental feline leukemia virus-induced immunodeficiency syndrome. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4: 547-57.
- Wu Y, Marsh JW. Gene transcription in HIV infection. *Microbes Infect* 2003; 5: 1023-7.
- Gillim-Ross L, Cara A, Klotman ME. Nef expressed from human immunodeficiency virus type 1 extrachromosomal DNA downregulates CD4 on primary CD4+ T lymphocytes: implications for integrase inhibitors. *J Gen Virol* 2005; 86: 765-71.
- Oswald-Richter K, Grill SM, Leelawong M, Unutmaz D. HIV infection of primary human T cells is determined by tunable thresholds of T cell activation. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1705-14.
- Carl S, Greenough TC, Krumbiegel M, Greenberg M, et al. Modulation of different human immunodeficiency virus type 1 Nef functions during progression to AIDS. *J Virol* 2001; 75: 3657-65.
- Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, et al. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 397-401.
- Benson RE, Sanfridson A, Ottinger JS, Doyle C, et al. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral super infection. *J Exp Med* 1993; 177: 1561-6.
- Tanaka M, Ueno T, Nakahara T, Sasaki K, et al. Downregulation of CD4 is required for maintenance of viral infectivity of HIV-1. *Virology* 2003; 311: 316-25.

24. Levesque K, Finzi A, Binette J, Cohen EA. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr HIV Res* 2004; 2: 51-9.
25. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 1993; 67: 1772-7.
26. Quiñones-Mateu ME, Ball SC, Marozsan AJ, Torre VS, et al. A dual infection/competition assay shows a correlation between ex vivo human immunodeficiency virus type 1 fitness and disease progression. *J Virol* 2000; 74: 9222-33.
27. Fujii Y, Otake K, Tashiro M, Adachi A. Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4+ T cells. *FEBS Lett* 1996; 393: 93-6.
28. James CO, Huang MB, Khan M, Garcia-Barrio M, et al. Extracellular Nef protein targets CD4+ T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors. *J Virol* 2004; 78: 3099-109.
29. Quaranta MG, Mattioli B, Spadaro F, Straface E, et al. HIV-1 Nef triggers Vav-mediated signaling pathway leading to functional and morphological differentiation of dendritic cells. *FASEB J* 2003; 17: 2025-36.
30. Jason J, Inge KL. Modulation of CD8 and CD3 by HIV or HIV antigens. *Scand J Immunol* 2001; 53: 259-67.
31. Giordani L, Giacomini E, Quaranta MG, Viora M. HIV-1 Nef protein inhibits the in vitro induction of a specific antibody response to *Candida albicans* by an early up-regulation of IL-15 production. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 358-63.
32. Koedel U, Kohleisen B, Sporer B, Lahrtz F, et al. HIV type 1 Nef protein is a viral factor for leukocyte recruitment into the central nervous system. *J Immunol* 1999; 163: 1237-45.
33. Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 1998; 95: 163-75.
34. Schmitz JE, Johnson RP, McClure HM, Manson KH, et al. Effect of CD8+ lymphocyte depletion on virus containment after simian immunodeficiency virus SIVmac251 challenge of live attenuated SIVmac239delta3-vaccinated rhesus macaques. *J Virol* 2005; 79: 8131-41.
35. Chakrabarti LA, Metzner KJ, Ivanovic T, Cheng H, et al. A truncated form of Nef selected during pathogenic reversion of simian immunodeficiency virus Ivmac239Deltanef increases viral replication. *J Virol* 2003; 77: 1245-56.
36. Khan IH, Sawai ET, Antonio E, Weber CJ, et al. Role of the SH3-ligand domain of simian immunodeficiency virus Nef in interaction with Nef-associated kinase and simian AIDS in rhesus macaques. *J Virol* 1998; 72: 5820-30.
37. Carl S, Daniels R, Iafrate AJ, Easterbrook P, et al. Partial "repair" of defective NEF genes in a long-term nonprogressor with human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000; 181: 132-40.
38. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Ann Rev Microbiol* 1996; 50: 825-54.
39. Calenda V, Graber P, Delamarier JF, Chermann JC. Involvement of HIV nef protein in abnormal hematopoiesis in AIDS: in vitro study on bone marrow progenitor cells. *Eur J Haematol* 1994; 52: 103-7.
40. Douche-Aourik F, Berlier W, Féasson L, Bourlet T, et al. Detection of enterovirus in human skeletal muscle from patients with chronic inflammatory muscle disease or fibromyalgia and healthy subjects. *Med Virol* 2003; 71: 540-7.
41. Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K, Watanabe T, et al. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 1996; 88: 3065-73.
42. Tzavaras T, Stewart M, McDougall A, Fulton R, et al. Molecular cloning and characterization of a defective recombinant feline leukaemia virus associated with myeloid leukaemia. *J Gen Virol* 1990; 71: 343-54.
43. Aziz DC, Hanna Z, Jolicoeur P. Severe immunodeficiency disease induced by a defective murine leukaemia virus. *Nature* 1989; 338: 505-8.
44. Salvi R, Garbuglia AR, Di Caro A, Pulciani S, et al. Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor. *J Virol* 1998; 72: 3646-57.
45. Casartelli N, Di Matteo G, Argentini C, Cancrini C, et al. Structural defects and variations in the HIV-1 nef gene from rapid, slow and non-progressor children. *AIDS* 2003; 17: 1291-301.
46. Yamada T, Iwamoto A. Comparison of proviral accessory genes between long-term nonprogressors and progressors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Virol* 2000; 145: 1021-7.
47. Ma A, Koka R, Burkett P. Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 657-79.
48. Namazi MR. Paradoxical exacerbation of psoriasis in AIDS: proposed explanations including the potential roles of substance P and gram-negative bacteria. *Autoimmunity* 2004; 37: 67-71.
49. Birch MR, Learmont JC, Dyer WB, Deacon NJ, et al. An examination of signs of disease progression in survivors of the Sydney Blood Bank Cohort (SBBC). *J Clin Virol* 2001; 22: 263-70.
50. Smith SM. The pathogenesis of HIV infection: stupids may not be so dumb after all. *Retrovirology* 2006; 3: 60.
51. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 2005; 174: 7446-52.
52. Ling B, Apetrei C, Pandrea I, Veazey RS, et al. Classic AIDS in a sooty mangabey after an 18-year natural infection. *J Virol* 2004; 78: 8902-8.
53. Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, Ffrench RA, et al. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* 1997; 11: 1833-8.
54. Agrawal L, Jin Q, Altenburg J, Meyer L, et al. CCR5Delta32 protein expression and stability are critical for resistance to human immunodeficiency virus type 1 in vivo. *J Virol* 2007; 81: 8041-9.
55. Jansen CA, Piriou E, Bronke C, Vingerhoed J, et al. Characterization of virus-specific CD8(+) effector T cells in the course of HIV-1 infection: longitudinal analyses in slow and rapid progressors. *Clin Immunol* 2004; 113: 299-309.
56. Sáez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, Versmisse P, et al. Agence Nationale de Recherches sur le Sida EP36 HIV Controllers Study Group. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 6776-81.
57. Dyer WB, Ogg GS, Demoitie MA, Jin X, et al. Strong human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in Sydney Blood Bank Cohort patients infected with nef-defective HIV type 1. *J Virol* 1999; 73: 436-43.
58. Keoshkerian E, Ashton LJ, Smith DG, Ziegler JB, et al. Effector HIV-specific cytotoxic T-lymphocyte activity in long-term nonprogressors: associations with viral replication and progression. *J Med Virol* 2003; 71: 483-91.
59. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 1999; 189: 991-8.



60. Odermatt B, Eppler M, Leist TP, Hengartner H, et al. Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 8252-6.
61. Gómez-Icazbalceta G, Huerta L, Soto-Ramírez LE, Larralde C. Extracellular HIV-1 Nef protein modulates lytic activity and proliferation of human CD8+ T lymphocytes. *Cell Immunol* 2007; 250: 85-90.
62. James CO, Huang MB, Khan M, García-Barrio M, et al. Extracellular Nef protein targets CD4+ T cells for apoptosis by interacting with CXCR4 surface receptors. *J Virol* 2004; 78: 3099-109.
63. Zlotnik A. Chemokines and cancer. *Int J Cancer* 2006; 119: 2026-9.

*Reimpresos:*

**Dr. Guillermo Gómez-Icazbalceta**

Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México  
AP 70228

04510, México, D.F.

Tel.: (52) (555) 6-22-38-54

Fax: (52) (555) 6-22-33-69

Correo electrónico: ggicazbalceta@gmail.com

*Recibido el 17 de junio de 2008.*

*Aceptado el 16 de abril de 2009.*