

## COMPORTAMIENTO DE LA FORMA SOLUBLE DE L-SELECTINA EN NIÑOS INFECTADOS CON HIV

EDUARDO GADDI, JEANETTE BALBARYSKI, CLAUDIO CANTISANO, GRACIELA BARBONI,  
MARCELA CANDI, HECTOR QUIROZ, VERA GIRAUDI

*Departamento de Medicina, División Inmunología Clínica, Hospital General de Niños Dr. Pedro de Elizalde, Buenos Aires*

**Resumen** La L-selectina es una molécula de adhesión responsable de la adhesión inicial de los leucocitos al endotelio. Esta molécula es liberada desde la superficie celular por clivaje proteolítico después de la activación leucocitaria. Se midieron los niveles séricos de la forma soluble de la L-selectina (sL-selectina) en 51 niños HIV(+) y en 15 controles sanos HIV(-). Estos valores se compararon con parámetros de activación inmune y de progresión de enfermedad. La concentración de sL-selectina se encontró significativamente aumentada en el grupo de pacientes HIV(+). Dichos niveles eran más altos en los pacientes con mayor inmunosupresión. Se encontró una correlación positiva entre los niveles de sL-selectina y el número relativo de LTCD8, y entre sL-selectina y los niveles de la forma soluble de la molécula de adhesión intercelular-1 (sICAM-1) y la inmunoglobulina A (IgA). No se obtuvo correlación significativa entre sL-selectina y los valores de la carga viral (CV) plasmática. El aumento en los niveles de sL-selectina sería otro componente entre las múltiples alteraciones inmunológicas producidas por el HIV.

**Palabras claves:** sL-selectina, sICAM-1, IgA, LTCD8, carga viral, infección pediátrica HIV

**Abstract** *Circulating soluble selectins in HIV infected children.* L-selectin is an adhesion molecule that is responsible for the initial attachment of leukocytes to endothelium. After leukocyte activation L-selectin is endoproteolytically released from the cell surface. In order to analyze the relationship between soluble L-selectin (sL-selectin) and parameters of immune activation and disease progression, 51 HIV infected children and 15 healthy controls were studied. Serum L-selectin concentrations were significantly higher in HIV infected children than in the control group. Levels of sL-selectin were higher in HIV infected patients with severe immunologic suppression than in those with moderate or no evidence of suppression. A positive correlation between sL-selectin levels and LTCD8 counts, sL-selectin and soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) and immunoglobulin A (IgA) levels was detected. On the contrary sL-selectin concentration did not correlate with plasmatic viral load. The correlation with parameters of immune activation may implicate involvement of sL-selectin in the immunopathogenesis of HIV infection.

**Key words:** sL-selectin, sICAM-1, IgA, LTCD8, viral load, HIV pediatric infection

La capacidad de los leucocitos para migrar desde la periferia hacia los tejidos es un paso crítico de la respuesta inmune, estando involucradas en este proceso varias moléculas de adhesión<sup>1, 2</sup>.

La L-selectina, miembro de la familia de moléculas de adhesión que incluye también a la E-selectina y P-selectina, es responsable de la adhesión inicial de los leucocitos al endotelio vascular<sup>3-6</sup>. Esta molécula se expresa en la superficie de linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, células precursoras hematopoyéticas y timocitos inmaduros<sup>7</sup>. L-selectina es una proteína alta-

mente glicosilada de 95-105 kD en neutrófilos y 74 kD en los linfocitos<sup>8, 9</sup>. Interviene en la migración linfocitaria a los ganglios linfáticos periféricos a través de la interacción con GlyCAM-1<sup>10, 11</sup>, y en la adhesión de linfocitos, neutrófilos y monocitos al endotelio activado por citoquinas en los sitios de inflamación<sup>12, 13, 14</sup>. Han sido identificados varios ligandos de L-selectina sobre las células endoteliales, GlyCAM-1, CD34 y MAdCAM-1, todos conteniendo dominios de mucina glicosilada<sup>15, 16, 17</sup>.

La forma soluble de L-selectina (sL-selectina) está presente en el plasma debido al clivaje mediado por una metaloproteinasa de la L-selectina expresada en la superficie celular<sup>18, 19, 20</sup>. La sL-selectina derivada de los linfocitos tiene un peso molecular de 62 kD, mientras que el fragmento derivado de los neutrófilos es de 75-100 kD. La forma soluble retiene la bioactividad y en altas concentraciones puede inhibir la unión de los linfocitos

Recibido: 27-II-2001

Aceptado: 27-IV-2001

**Dirección postal:** Dra. Vera Giraudi, Desaguadero 2439, 1417 Buenos Aires, Argentina  
Fax: (54-11) 4566-3795

e-mail: vgiraudi@intramed.net.ar

al endotelio, sugiriendo su posible rol en la modulación de esta unión in vivo<sup>21</sup>.

Mientras que sL-selectina puede ser detectada en la circulación de individuos normales, se han reportado niveles aumentados de la misma en pacientes con sepsis, enfermedades inflamatorias, autoinmunes y en leucemias<sup>22-25</sup>. Pacientes adultos HIV (+) muestran también un incremento en los valores plasmáticos, habiéndose comprobado además que la actividad viral induce la expresión de L-selectina y el "homing" de linfocitos T<sup>26</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar los niveles de sL-selectina en pacientes pediátricos HIV (+), y su correlación con parámetros de activación inmune y progresión de enfermedad.

## Pacientes y métodos

**Población:** En este estudio se incluyeron pacientes HIV (+) asistidos en la División Inmunología Clínica del Hospital Pedro de Elizalde entre enero y julio del 2000. Las muestras fueron obtenidas de 51 niños infectados por el HIV (26 varones y 25 mujeres) con edades comprendidas entre 9 meses y 11 años. La seropositividad de los pacientes fue confirmada por análisis de ELISA y Western Blot, comprobándose transmisión vertical en 49 de ellos, mientras que los dos restantes adquirieron la infección por vía transfusional. El 94% de los pacientes recibían tratamientos antiretrovirales combinados con inhibidores de proteasas, mientras que el 6% restante era virgen de tratamiento dado lo reciente de su positividad serológica. Las muestras controles fueron obtenidas de 15 niños sanos HIV (-) con edades entre 1 y 7 años, provenientes del Servicio de Protección y Prevención de la Salud. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres de todos los niños incluidos en el estudio.

**Determinación de sL-selectina, sICAM-1 e IgA.** Los niveles séricos de sL-selectina y sICAM-1 fueron medidos por una técnica de ELISA sandwich cuantitativo (R & D System, USA). Las muestras se diluyeron 1 en 100 para sL-selectina y 1 en 20 para sICAM-1 al momento del ensayo. Los niveles de IgA se estudiaron por nefelometría (Array System, Beckmann).

**Determinación de las subpoblaciones linfocitarias.** Los valores relativos de linfocitos T (LT) CD3+, CD4+ y CD8+ fueron evaluados mediante doble marcación con anticuerpos monoclonales y analizados por citometría de flujo (FACScan, Becton Dickinson).

**Determinación de la carga viral plasmática.** La cuantificación de la carga viral plasmática de ARN- HIV-1 se realizó por el método Nuclisens NASBA (Organon Teknika), con un umbral de detección de 80 copias de ARN por ml.

**Análisis estadístico.** Las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante el test de Kruskal-Wallis. El coeficiente de correlación de Spearman se utilizó para establecer el grado de correlación entre dos variables cuantitativas medidas con error estadístico.

## Resultados

Los niveles de sL-selectina (media  $\pm$  DE, ng/ml) se encontraron significativamente aumentados en los niños HIV (+) en comparación con los controles sanos (Co). (HIV: 2556  $\pm$  684, n = 51; Co: 1447  $\pm$  212, n = 15, p < 0.05). (Figura 1).

Al dividir la población HIV (+) según el grado de inmunosupresión se encontró que los niveles de sL-selectina estaban más elevados (p < 0,05) en los pacientes con inmunosupresión severa (LTCD4 < 15%, sL-selectina: 2906  $\pm$  588 ng/ml, n = 25), con respecto al grupo de pacientes con inmunosupresión leve o moderada (LTCD4 > 15%, sL-selectina: 2176  $\pm$  570 ng/ml, n = 26). (Figura 2).

También se evaluaron las correlaciones entre los niveles séricos de sL-selectina y parámetros de activación inmune (LTCD8, sICAM-1, IgA) y de replicación viral (carga viral). Se encontró una correlación positiva marcada entre sL-selectina y el número relativo de LTCD8 (r = 0.52, p < 0.05) y sL-selectina con sICAM-1 (r = 0.59, p < 0.05). La correlación positiva entre sL-selectina e IgA fue débil (r = 0.38 p < 0.05), mientras que los valores de sL-selectina no mostraron correlación significativa con la carga viral plasmática. (Figura 3).

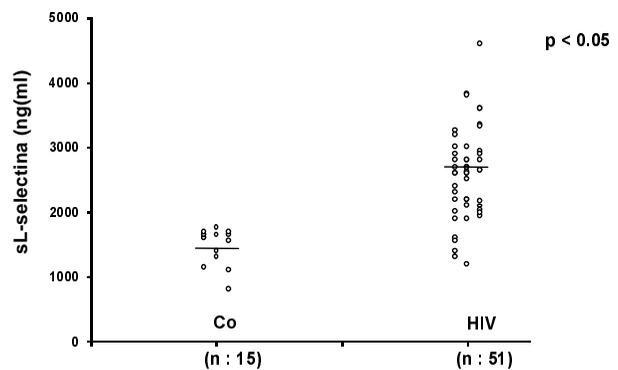


Figura 1.— Niveles séricos de la forma soluble de L-selectina (sL-selectina) en 15 controles sanos HIV (-) y en 51 niños HIV (+). (Las barras horizontales indican el valor medio de cada grupo).

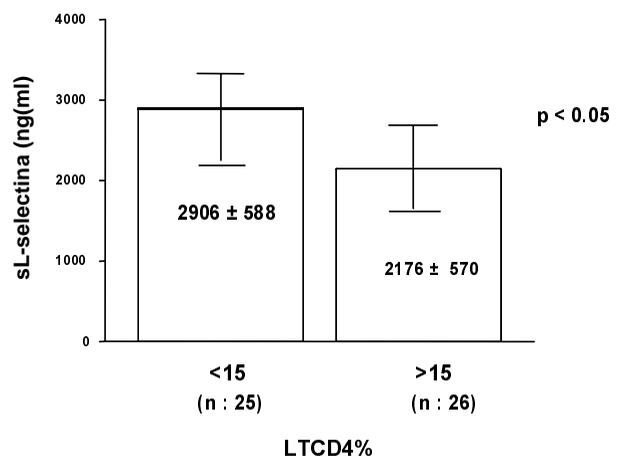


Fig. 2.— Niveles séricos de sL-selectina (media  $\pm$  DE) en niños HIV (+) agrupados según el grado de inmunosupresión.

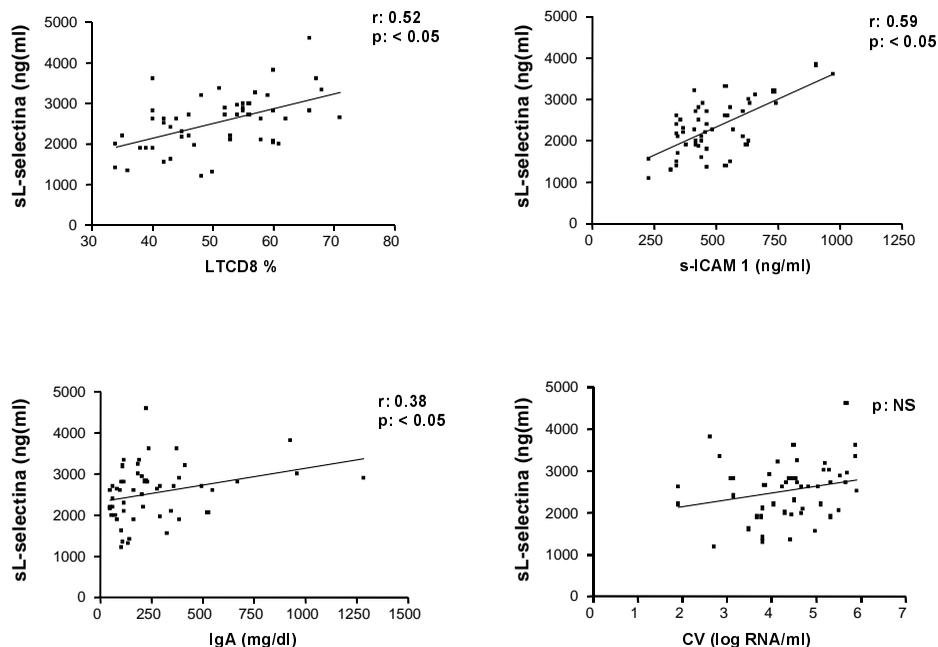


Fig. 3.— Análisis de correlación entre los niveles de sL-selectina y LTCD8, sICAM-1, IgA y carga viral.

## Discusión

Los datos presentados muestran que los niveles de sL-selectina se encuentran elevados en los niños HIV(+) y se correlacionan con la severidad de la inmunosupresión. Estos datos concuerdan con estudios previos que muestran el incremento de los niveles de sL-selectina en pacientes adultos HIV (+)<sup>22</sup> aun cuando hay diferencias en el modo de transmisión y en el comportamiento del sistema inmune del niño<sup>27</sup>.

La activación del sistema inmunológico se observa tempranamente en la infección por HIV, produciéndose no sólo una respuesta inmune específica mediada por anticuerpos, sino también una estimulación general del sistema inmune. Durante este proceso las células T aumentan la expresión de varias proteínas de superficie que median la adhesión a otras células y a otras moléculas de la matriz extracelular. El estado de activación inmune puede ser evaluado por los incrementos tanto en el número de LTCD8+ como de factores séricos solubles como la  $\beta$ 2 microglobulina, neopterina, IgA el receptor soluble de IL2, etc.<sup>28</sup>. La correlación obtenida entre el número relativo de LTCD8+ y los niveles de sL-selectina indicaría la potencial utilidad de esta molécula como marcadora de activación. Por otro lado, la buena correlación con sICAM-1, molécula marcadora de activación inmune y de progresión de enfermedad<sup>29,30</sup> reflejaría que la actividad viral induce la liberación coordinada de ambas moléculas de adhesión solubles a través de citoquinas mediadoras de inflamación<sup>5,14,31</sup>. La baja

correlación observada con IgA sugeriría que la expresión de sL-selectina e IgA podría ser afectada por estímulos diferentes.

La falta de una correlación significativa entre los niveles de sL-selectina y la carga viral plasmática permite suponer que ambas variables no están directamente relacionadas. Además, el tratamiento antirretroviral implementado en los pacientes podría afectar de modo distinto el comportamiento de ambos parámetros.

Los niveles liberados a la circulación de algunas moléculas de adhesión solubles como sVCAM-1, sICAM-1 y sE-selectina, muestran una correlación directa con la expresión de estas moléculas en la superficie celular<sup>32</sup>. La forma soluble de L-selectina podría actuar como inhibidor competitivo de la L-selectina expresada en membrana, regulando la adhesión celular o iniciando una respuesta en las células que expresan su ligando.

Los niveles más altos de sL-selectina se encontraron en los pacientes con mayor compromiso inmune, sugiriendo que tales valores podrían ser debidos a una condición inflamatoria exacerbada consecutiva al mayor pegamiento de linfocitos al endotelio activado, y reflejaría el grado de diseminación extravascular de la infección.

El HIV estimula la sobreexpresión de L-selectina y el consiguiente incremento del "homing" de células T<sup>26</sup>, mecanismo que induciría secundariamente fenómenos de apoptosis mediados por los receptores de "homing"<sup>33</sup>. Esta situación explicaría el aumento en los niveles de sL-selectina observado en los pacientes deplecionados de LTCD4.

Son necesarios estudios longitudinales que evalúen los niveles de sL-selectina en el curso de la infección por HIV y su relación con determinaciones seriadas de carga viral, como así su comportamiento ante la aparición de enfermedades concurrentes y la implementación de nuevos esquemas terapéuticos. Aunque el significado biológico del incremento en los niveles de sL-selectina no está del todo aclarado, dicho aumento es otro aspecto de las múltiples alteraciones inmunológicas que acompañan a la infección por HIV.

## Bibliografía

- Springer T. Adhesion receptors in the immune system. *Nature* 1990; 346: 425-36.
- Gearing A, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunology Today* 1993; 14: 506-12.
- Gallatin W, Weissman I, Butcher E. A cell- surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983; 304: 30-34.
- Ley K, Gaehtgens P, Fennie C, Singer M, Lasky L, Rosen S. Lectin - like cell adhesion molecule-1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 1991; 77: 2553-55.
- Spertini O, Luscinkas F, Munro J, et al. Leukocyte adhesion molecule-1. (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion and transmigration. *J Immunol* 1991; 147: 2565-73.
- Spertini O, Luscinkas F, Grimbrone M, Tedder T. Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under non-static conditions. *J Exp Med* 1992; 175: 1789-92.
- Tedder P, Penta A, Levine H, Freedman A. Expression of the human leukocyte adhesion molecule, LAM-1. Identity with the TQ1 and Leu-8 differentiation antigens. *J Immunol* 1990; 144: 532-40.
- Griffin J, Spertini O, Ernest T, et al. GM-CSF and other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes and their precursors. *J Immunol* 1990; 576-84.
- Tedder T, Matsuyama T, Rothstein D, Schlossman S, Morimoto C. Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor necessary for lymphocyte recirculation. *Eur J Immunol* 1990; 20: 1351-55.
- Imai Y, Singer M, Fennie C, Lasky L, Rosen S. Identification of a carbohydrate-based endothelial ligand for a lymphocyte homing receptor. *J Cell Biol* 1991; 113: 1213-21.
- Kishimoto T, Jutila M, Butcher E. Identification of a human peripheral lymph node homing receptor: a rapidly down-regulated adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2244-48.
- Jutila M, Rott L, Berg E, Butcher E. Function and regulation of the neutrophil MEL-14 antigen in vivo. Comparison with LFA-1 and MAC-1. *J Immunol* 1989; 143: 3318-24.
- Lewinsohn D, Bargatze R, Butcher E. Leukocyte-endothelial cell mechanism shared by neutrophils, lymphocytes and other leukocytes. *J Immunol* 1987; 138: 4313-21.
- Smith C, Kishimoto T, Abbas O, Huges B, Rothlein R, McIntire L, et al. Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1) development neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 1991; 87: 609-18.
- Shimizu Y, Shaw S. Mucins in the mainstream. *Nature* 1993; 366: 630-31.
- Baumhueter S, Dybdal N, Kyle C, Lasky L. Global vascular expression of murine CD34, a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood* 1994; 84: 2554-65.
- Briskin M, McEvoy L, Butcher E. MAdCAM-1 has homology to immunoglobulin and mucin-like adhesion receptors and to IgA1. *Nature* 1993; 363: 461-4.
- Jung T, Dailey M. Rapid modulation of homing receptors (gp 90 Mel-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at cell surface. *J Immunol* 1990; 144: 3130-6.
- Migaki G, Kahn J, Kishimoto T. Mutational analysis of the membrane proximal cleavage site of L- selectin: relaxed sequence specificity surrounding the cleavage site. *J Exp Med* 1995; 182: 549-57.
- Borland G, Murphy G, Ager A. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 inhibits shedding of L-selectin from leukocytes. *J Biol Chem* 1999; 274: 2810-15.
- Schleiffenbaum B, Spertini O, Tedder T. Soluble L-selectin is present in human plasma at high levels and retains functional activity. *J Cell Biol* 1992; 119: 229-38.
- Spertini O, Schleiffenbaum B, White-Owen C, Ruiz P, Tedder T. ELISA for quantitation of L-selectin shed from leukocytes in vivo. *J Immunol Methods* 1992; 156: 115-23.
- Takeshita S, Dobashi H, Nakatani K, et al. Circulating soluble selectins in Kawasaki disease. *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 446-50.
- Inaoki M, Sato S, Shimada Y, et al. Decreased expression levels of L-selectin subsets of leukocytes and increased serum L-selectin in severe psoriasis. *Clin Exp Immunol* 2000; 122: 488-92.
- Spertini O, Callegari P, Cordey A, et al. High levels of the shed form of L-selectin are present in patients with acute leukemia and inhibit blast cell adhesion to activated endothelium. *Blood* 1994; 84: 1249-56.
- Wang L, Robb C, Cloyd M. VIH induces homing of resting T lymphocytes to lymph nodes. *Virology* 1997; 228: 141-52.
- Plaeger-Marshall S, Isacescu BV, Rourke S, Bertoll J, Bryson Y, Stheim R. T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: Three color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 71: 19-26.
- Fahey J, Taylor J, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990; 322: 166-72.
- Gaddi E, Balbaryski J, Cantisano C, Barboni G, Candi M, Giraudi V. Niveles séricos de la forma soluble de la molécula de adhesión intercelular-1 (sICAM-1) en la infección por HIV en niños. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 351-4.
- Gaddi E, Laucella S, Balbaryski J, Cantisano C, et al. Prognostic value of intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in HIV infected children. *Scand J Immunol* 2000; 52: 628-33.
- Tedder T, Steeber D, Chen A, Engel P. The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J* 1995; 9: 866-73.
- Lang T, Krams S, Villanueva J, Cox K, So S, Martinez D. Differential patterns of circulating intercellular adhesion molecule-1 (cICAM-1) and vascular adhesion molecule-1 (cVCAM-1) during liver allograft rejection. *Transplantation* 1995; 59: 584-9.
- Wang L, Chen I, Gelman B, Koning, Cloyd M. A novel mechanism of CD4 lymphocyte depletion involves effects of HIV on resting lymphocytes: induction of lymph node homing and apoptosis upon secondary signaling through homing receptors. *J Immunol* 1999; 162: 268-76.