

Cooke, Paula María

Apoptosis de neutrófilos en la infección asintomática por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**Tesis para la obtención del título de posgrado de
Doctor en Medicina**

Director: Orsilles, Miguel Ángel

Documento disponible para su consulta y descarga en **Biblioteca Digital - Producción Académica**, repositorio institucional de la **Universidad Católica de Córdoba**, gestionado por el **Sistema de Bibliotecas de la UCC**.



Esta obra está bajo licencia 2.5 de Creative Commons Argentina.

Atribución-No comercial-Sin obras derivadas 2.5



**UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CÓRDOBA**

Universidad Jesuita

Facultad de Ciencias Químicas

**Apoptosis de neutrófilos en la infección
asintomática por el Virus de la
Inmunodeficiencia Humana**

**Tesis de la Facultad de Ciencias Químicas
de la Universidad Católica de Córdoba conforme
a los requisitos para obtener el título de Doctor en Bioquímica**

por
Paula María Cooke

Córdoba

2016

Director de Tesis

Dr. Miguel Ángel Orsilles
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba

Comité de Tesis Doctoral

Dra. María del Pilar Aoki
Dra. Sandra Verónica Gallego
Dra. Viviana Elizabeth Re

Tribunal Examinador de Tesis Doctoral

Dra. María del Pilar Aoki
Dra. Sandra Verónica Gallego
Dra. Claudia Balagué

*“No el mucho saber harta y satisface el alma, sino el
sentir y gustar de las cosas internamente”*

San Ignacio de Loyola

En estos años de formación de posgrado he aprendido y disfrutado mucho, por eso quiero dedicar y compartir mi Tesis Doctoral con las personas que amo profundamente:

Mis padres, Al y Tedy, por habernos educado con tanto amor, con la palabra y con el ejemplo, por habernos impulsado a soñar y a trabajar duro para alcanzar las metas. Por haber luchado tanto para darnos un futuro como personas libres, responsables y agradecidas.

Los siento siempre a mi lado, guiándome y cuidándome con ternura; estoy segura que, desde donde estén, me están regalando una sonrisa de felicidad. Gracias por tanto!

Mi marido César, mi compañero de toda la vida. Gracias Amor por estar siempre a mi lado, en las buenas y en las malas, apoyándome y alentándome.

Mis hijos Fede, Pia, Clari, Santi y Luz, cinco personas maravillosas que son mi fuente de inspiración y el motor de mi vida; son los que me hacen reír y me hacen llorar, los que me llenan de orgullo y me iluminan el alma. No podría imaginar la vida sin ustedes, son el proyecto más importante y lindo de mi vida! Gracias por entenderme y por la infinita paciencia con que me acompañaron en este proceso.

Mis hermanos Belén, José y Pitu, por poder contar con ustedes incondicionalmente, porque se alegran con mis alegrías y me abrazan cuando lo necesito, porque me hacen sentir que los cuatro formamos un gran equipo!

AGREDECIMIENTOS

El presente Trabajo de Tesis, se ha podido lograr gracias a la participación, al apoyo y al estímulo de muchos, a quienes agradezco con mucho cariño:

Mi Director de Tesis, Dr. Miguel Ángel Orsilles, por su excelente trabajo de dirección guía y acompañamiento en mi formación de posgrado. Como Director, me exigiste con rigor, pero siempre en un marco de respeto y buen humor. Gracias también por tantos años compartiendo actividades de docencia e investigación y, sobre todo, muchas gracias por tu sincera amistad. Es un placer y un honor trabajar con vos.

Los integrantes del Comité de Tesis: Dra. María del Pilar Aoki y Dra. Sandra Verónica Gallego, de la Universidad Nacional de Córdoba, y a la Dra. Viviana Elizabeth Re, de la Universidad Católica de Córdoba, que me escucharon, me orientaron y guiaron durante estos años, con total compromiso y generosidad.

Los miembros del Tribunal Examinador: Dra. María del Pilar Aoki, Dra. Sandra Verónica Gallego y Dra. Claudia Balagué, de la Universidad Nacional de Rosario, que enriquecieron este Trabajo con sus correcciones, sugerencias y aportes.

La Directora de la Carrera de Doctorado en Bioquímica, Dra. Sara Palacios, por velar de manera incansable y personalmente por la calidad académica de la Carrera; también por escuchar y acompañar a los tesisistas, apoyándonos y alentándonos para alcanzar la meta.

La Universidad Católica de Córdoba, que me otorgó el apoyo económico para realizar esta Tesis, en el marco del sistema de Becas de Posgrado, y a la Facultad de Ciencias Químicas, en cuyos laboratorios desarrollé gran parte del trabajo experimental.

Mi amiga y compañera de cátedra de Inmunología, Cinthya Caula, por tantos años compartiendo, con entrega y pasión, las actividades de docencia e investigación. Un agradecimiento especial, por tu apoyo para realizar este Doctorado; solo vos y yo

abemos todo lo que nos ha costado, lo que hemos sufrido y cuanto hemos disfrutado.

Los que con infinita paciencia y dedicación, me enseñaron y asistieron en la realización de los estudios por Citometría de Flujo: Dras. Paula Abadie y Pilar Crespo, del CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas de la UNC; Dra. Susana Rubiolo, de la Fundación para el Progreso de la Medicina y al Dr. Alejandro Romero, de Laboratorios IACA, Bahía Blanca.

El Dr. Dante Beltramo, Dra. Belén Joray y Dra. Marina Vanini, por ayudarme en la implementación e interpretación de la técnica de Western blot, compartiendo su tiempo, conocimientos y experiencia. También a Pablo Yang que me asistió en el uso de programas que me simplificaron la escritura de esta Tesis.

Mi amiga y hermana, Cristina Huespe, gracias por estar siempre a mi lado incondicionalmente, acompañándome con el corazón y la Oración.

Al Lic. Esteban del Santo, el mejor Informático, que siempre me soluciona en un instante, con gran profesionalismo y excelente humor, lo que para mí sería imposible de resolver.

A quienes de una forma u otra, con un gesto, un consejo, una palabra de aliento o una Oración, me acompañaron y sostuvieron estos años:

Mis cuñados Roberto, Carolina y Pedro, mis sobrinos y ahijados, mi suegra Milena

Mi guía y sostén espiritual, el Padre Miguel Ángel Moreno, sj.

Mis queridas amigas Carolina, Chun y Sonia

A Miriam Bracamonte, que cuida de mis hijos y mi casa para que yo pueda estudiar y salir a trabajar tranquila.

Mis compañeros de trabajo de la UCC Haydee Varengo, Alicia Bollati, Ramón Carnero.

Mis alumnos de la UCC y de la UNVM, de quienes aprendo todos los días.

A la Dra. Gloria Vadori, el Abog. Luis Negretti y todos mis compañeros de la Universidad Nacional de Villa María, por creer en mí y por permitirme trabajar en un ámbito de excelencia académica, cordialidad, respeto y calidad humana.

Gracias infinitas a Dios, mi Padre Bueno, que me cuida y sostiene con su inmenso Amor.

Por último, nuevamente, mi eterno agradecimiento a César y a mis hijos, ya que sin ellos nada de esto tendría sentido.

21.2. Expresión de superficie y su asociación con la apoptosis de neutrófilos	70
22. Expresión de los receptores de superficie TLR2 y CD95	72
23. Mediadores solubles inflamatorios	74
23.1. Niveles circulantes de PCR-as, IL-6 y de TNF	74
23.2. Mediadores solubles y su relación con la apoptosis de neutrófilos en pacientes VIH asintomáticos sin tratamiento	77
V. Discusión	78
24. Evaluación del nivel de apoptosis en neutrófilos	80
25. Expresión de moléculas en la superficie de neutrófilos	85
26. Expresión de los receptores de superficie TLR2 y CD95	92
27. Mediadores solubles inflamatorios	97
28. Bibliografía	102
VI. Conclusiones	111

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AIF:	<i>Apoptosis Inducing Factor</i> /Factor inductor de apoptosis
Apaf-1:	<i>Apoptotic protease activating factor 1</i> / Factor activador de la proteasa apoptótica 1
APC:	<i>Allophycocyanin</i> / Aloficocianina
ATP:	Adenosina trifosfato
ARN	Ádico ribonucleico
Bb:	<i>Binding buffer</i> / Solución reguladora de unión
Bcl-2:	<i>B-celllymphoma 2</i> / Linfoma de célula B 2
BH:	<i>Bcl-2 homology (domain)</i> / (Dominio) de homología Bcl-2
Bid:	<i>BH-3 Interacting DomainDeath</i> / Dominio de muerte para la interacción BH3
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> /Albúmina sérica bovina
CDC:	Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos
CIBICI:	Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba
CIEIS:	Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Niño y del Adulto de la Ciudad de Córdoba
CXCL:	Ligando de quimiocina CXC
CXCR:	Receptor de quimiocina CXC
DIABLO:	<i>Direct IAP-binding protein with low pI</i> Proteína de unión directa a IAP de bajo pI
DISC:	<i>Death-Inducing Signaling Complex</i> /Complejo de Señales Inductoras de Muerte
DO:	Densidad óptica
DPA:	Difenilamina
EDTA-K ₃ :	Ácido etilén diaminotetraacético tripotásico
ELISA:	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> / Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FADD:	<i>FAS-associated protein with a Death Domain</i> / Dominio de muerte asociado a Fas
Fas:	CD95/APO-1. Fas es miembro de la familia de receptores TNF

FITC:	<i>Fluorescein isotiocianate</i> / Isotiocianato de fluoresceína
FSC:	<i>Forward scatter</i> / Dispersión frontal de luz
G-MDSC:	<i>Granulocytesmyeloid-derived suppressor cells</i> / Células granulocíticas supresoras derivadas de las mieloides
G-CSF:	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i> /Factor estimulante de colonias granulocíticas
GM-CSF:	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> / Factor estimulante de colonias granulocítica-macrofágica
HAART:	<i>Highly active antiretroviral therapy</i> / Terapia antirretroviral de alta eficacia
HAI:	Hemaglutinación indirecta
HTLV:	<i>Human T-cell lymphotropic virus</i> / Virus linfotrópico de células T humanas
IAP:	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i> / Proteínas inhibidoras de la apoptosis
IL:	Interleucina
IP:	Ioduro de propidio
LDN:	<i>Low-density neutrophil</i> / Neutrófilos de baja densidad
LPS:	Lipopolisacárido
LT	Linfocito T
Mcl-1:	<i>Myeloid leukemia cell differentiationprotein</i> / Diferenciación de células de la leucemia mieloide
MFI:	Mean of the fluorescence intensity/ Intensidad de fluorescencia media
MPO:	Mieloperoxidasa
MOMP:	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> / Permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria
NADPH oxidasa:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa
NETs:	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i> / Trampas extracelulares de neutrófilos
PAF:	<i>Platelet Activating Factor</i> /Factor de activación de plaquetas
PCR-as:	Proteína C Reactiva de alta sensibilidad
PE:	<i>Phycoerythrin</i> / Ficoeritrina

PerCP:	<i>Peridinin-chlorophyll protein complex</i> / Conjugado de la proteína clorofil peridina
PI3K:	<i>Phosphatidylinositol 3-kinases</i> / Fosfoinositol 3-quinasa
PMA	Acetato de forbol mirístato
PRR:	<i>Pattern Recognition Receptor</i> / Receptores de reconocimiento de patrones
Proteasa serina HtrA2:	<i>High temperature required protein A2</i> / Proteína A2 que requiere alta temperatura
PBS:	Tampón salino fosfato
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> / Receptores de reconocimiento de patrones
PS:	Fosfatidilserina
R.p.m:	Revoluciones por minuto
RePis:	Registro Provincial de Investigación en Salud, Provincia de Córdoba
RIC:	Rango intercuartílico
RIP:	<i>Receptor-Interacting Proteinkinases</i> / Proteína quinasa de interacción con el receptor
ROS:	<i>Radical Oxygen Species</i> / Especies reactivas del oxígeno
RM:	<i>Rhesus macaques</i>
RT-PCR:	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> / Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
7-AAD:	7-amino-actinomicina
SDS-PAGE:	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> / Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
Smac:	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i> / Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
SSC:	<i>Side scatter</i> / Dispersion lateral de luz
TAR:	Terapia antirretroviral
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
TRADD:	<i>Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein</i> / Proteína adaptadora con dominio de muerte asociada a TNF-R1

TRAIL:	<i>TNF-Related apoptosis inducing ligand</i> / Ligando inductor de apoptosis asociado a TNF
TLRs:	<i>Toll like receptors</i> / Receptores tipo Toll
TNF:	<i>Tumor Necrosis Factor</i> / Factor de necrosis tumoral
UNC:	Universidad Nacional de Córdoba
UV:	Ultravioleta
VDRL:	<i>Venereal Disease Research Laboratory</i>
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC:	Virus de la hepatitis C
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
SIV:	<i>Simian immunodeficiency viruses</i> /Virus de la inmunodeficiencia en simios
RMs:	<i>Asian Rhesus macaques</i> /Macaco Rhesus de Asia
XIAP:	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i> /Proteína inhibidora de la apoptosis ligada al X

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Funciones de los neutrófilos	6
Figura 2.	Apoptosis del neutrófilo	11
Figura 3.	Vías moleculares para la ejecución de apoptosis por la vía extrínseca	15
Figura 4.	La vía extrínseca de la apoptosis	15
Figura 5.	Vía intrínseca de la apoptosis	17
Figura 6.	Muerte de neutrófilos mediada por ROS	18
Figura 7.	Vías extrínseca, intrínseca y de fagocitosis que inducen la apoptosis de neutrófilos	19
Figura 8.	Ejemplo de diagrama de puntos del marcaje simultáneo con Anexina V-PE (eje X) y 7ADD (eje Y)	43
Figura 9.	Selección de la población de neutrófilos mediante citometría de flujo de una muestra de sangre total de un individuo control sano	45
Figura 10.	Determinación de Caspasa -3 Activa	50
Figura 11.	Porcentaje de apoptosis de neutrófilos de pacientes VIH seropositivos y controles sanos	59
Figura 12.	Intensidad Media de Fluorescencia de Anexina V-PE en neutrófilos de pacientes sin y con TAR y controles no infectados	59
Figura 13.	Apoptosis de neutrófilos de un paciente VIH seropositivo sin TAR	61
Figura 14.	Fragmentación del ADN	63
Figura 15.	Análisis de Caspasa -9 por Western blot	64
Figura 16.	Actividad de Caspasa -3	64
Figura 17.	Nivel de Caspasa -3 activa en pacientes infectados por VIH y controles sanos	65
Figura 18.	Expresión de CD62L, CD16 y CD11b en neutrófilos de sangre periférica	66

Figura 19.	Expresión de CD11b en pacientes VIH seropositivos sin TAR con LT-CD4 ⁺ entre 200-499/ μ L	67
Figura 20.	Porcentaje de expresión de CD62L en neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR según el nivel de LT-CD4 ⁺	68
Figura 21.	Intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD62L en neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR según el nivel de LT-CD4 ⁺	68
Figura 22.	Subpoblaciones de neutrófilos CD11 ^{alto} CD16 ^{alto} y CD11b ^{bajo} CD16 ⁻ en un paciente VIH seropositivo sin TAR	70
Figura 23 (A y B).	Apoptosis y expresión de CD16 en neutrófilos de sangre entera de pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR	71
Figura 24.	Apoptosis y expresión de CD11b en neutrófilos de sangre entera de pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR	72
Figura 25.	Niveles de expresión de TLR2 en neutrófilos de sangre periférica de pacientes VIH seropositivos sin TAR	73
Figura 26.	Niveles de expresión de CD95 en neutrófilos de sangre periférica de pacientes con infección por VIH sin TAR	74

LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Anticuerpos monoclonales utilizados en estudios de apoptosis y expresión de moléculas y receptores de superficie de los neutrófilos	39
Tabla II.	Características de controles sanos y pacientes con infección por VIH asintomáticos sin y con TAR	57
Tabla III.	Condiciones para inducir apoptosis de neutrófilos de sangre entera anticoagulada	58
Tabla IV.	Nivel de apoptosis de neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR y controles, en las distintas etapas del proceso de muerte	60
Tabla V.	Intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD62L, CD16 y CD11b en neutrófilos de pacientes VIH seropositivos y controles sanos	67
Tabla VI.	Coexpresión de CD11b/CD16 y CD11b/CD62L en neutrófilos	69
Tabla VII.	Poblaciones de neutrófilos CD11b ⁺ /CD16 ⁻ y CD11b ⁺ /CD62L ⁻	69
Tabla VIII.	Niveles séricos de PCR-as, IL-6 y TNF en pacientes con infección por VIH y sujetos sanos	75
Tabla IX.	Niveles séricos de PCR-as, IL-6 y TNF en pacientes VIH seropositivos asintomáticos sin TAR según compromiso inmunológico	75
Tabla X.	Marcadores inmunológicos y virológicos según niveles séricos de PCR-as, en pacientes con infección por VIH sin TAR	76
Tabla XI.	Niveles séricos de PCR-as, IL-6 y TNF en pacientes VIH seropositivos asintomáticos sin TAR, según carga viral	76

Apoptosis de neutrófilos en la infección asintomática por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana

Resumen

En los últimos años se ha determinado que los neutrófilos son células altamente versátiles y sofisticadas, cuyas funciones van mucho más allá de la eliminación de los microorganismos. En la infección por VIH el papel de los neutrófilos no está totalmente caracterizado pero actualmente está claro que la relación entre los neutrófilos y el VIH-1 es mucho más compleja de lo que se pensaba. Los objetivos de esta Tesis fueron evaluar en pacientes con infección asintomática y sin TAR el efecto de la infección por VIH sobre la muerte celular de los neutrófilos, la expresión de moléculas y receptores de superficie y el nivel sérico de marcadores de activación inmune. En pacientes VIH seropositivos sin TAR hubo un aumento de la apoptosis temprana de los neutrófilos en relación a los grupos controles. Esta apoptosis aumentada no depende de la activación de la vía extrínseca o intrínseca. En estos pacientes se detectó una disminución de la expresión de CD62L y de CD16 en neutrófilos que se correlacionó con el estado inmunológico y el nivel de apoptosis de los neutrófilos. Además, se caracterizaron dos subpoblaciones de neutrófilos en base a la expresión de CD11b: una CD11b^{alto} y otra CD11b^{intermedia}. Según la coexpresión de moléculas de superficie, se pudieron caracterizar dos subpoblaciones de neutrófilos: una CD11^{alto}CD16^{alto} y una CD11b^{intermedio}CD16⁻. Por otro lado, hubo un aumento de la expresión de TLR2 que, unido a la expresión de moléculas de adhesión y al aumento de la apoptosis temprana, es indicativo de un fenotipo activado de los neutrófilos. Los niveles aumentados de IL-6 y de PCR-as, pero no los de TNF, se correlacionaron con la carga viral y el estado inmunológico. El nivel de apoptosis de los neutrófilos se correlacionó inversamente con los niveles séricos de IL-6. En conclusión, esta Tesis ha aportado información sobre distintos aspectos relacionados con la apoptosis de los neutrófilos en estadios tempranos de la infección por VIH y por lo tanto contribuye a una mayor comprensión sobre el efecto de este virus sobre componentes de la respuesta inmune innata y sobre el rol de los neutrófilos en la patogénesis de la infección.

Palabras clave: VIH, Neutrófilos, Apoptosis, Infección asintomática

Neutrophil apoptosis in asymptomatic Human Immunodeficiency Virus infection

Summary

In recent years it has been determined that neutrophils are highly versatile and sophisticated cells whose functions go far beyond the elimination of microorganisms. In HIV infection, the role of neutrophils is not fully characterized but it is now clear that the relationship between neutrophils and HIV is much more complex than previously thought. The aims of this Thesis were to evaluate the effect of HIV infection on neutrophil cell death, the expression of surface molecules and receptors, and the serum levels of immune activation markers in patients with asymptomatic infection and without ART. In HIV patients seropositive without ART there was an increase in the early apoptosis of neutrophils in relation to the control groups. This increased apoptosis does not depend on the activation of the extrinsic or intrinsic pathway. In these patients there was detected a decrease in CD62L and CD16 expression that correlated with the immunological status and the level of neutrophil apoptosis. In addition, two subpopulations of neutrophils were characterized based on the expression of CD11b: CD11b^{high} and CD11b^{dim}. According to the coexpression of surface molecules, two subpopulations of neutrophils could be characterized: a CD11^{high}CD16^{high} and a CD11b^{dim}CD16⁻. On the other hand, there was an increase in the expression of TLR2 which, together with the expression of adhesion molecules and the increase of early apoptosis, is indicative of an activated phenotype of neutrophils. Increased levels of IL-6 and CRP-hs, but not those of TNF, correlated with viral load and immune status. The level of neutrophils apoptosis correlated inversely with IL-6 serum levels. In conclusion, this Thesis has provided information on different aspects related to the apoptosis of neutrophils in early stages of HIV infection and therefore contributes to a better understanding of the effect of this virus on components of the innate immune response and about the role of neutrophils in the infection pathogenesis.

Key words: HIV, Neutrophil, Apoptosis, asymptomatic infection

I. INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmune innata debido a que proveen una defensa inmediata e inespecífica contra los agentes patógenos. Su papel principal consiste en restringir a los microbios al sitio de infección, previniendo así su diseminación sistémica. Sin embargo, durante las últimas dos décadas, cientos de estudios han demostrado claramente que los neutrófilos son células altamente versátiles y sofisticadas, cuyas funciones van mucho más allá de la eliminación de los microorganismos. Entre los hallazgos inesperados, comenzaron a emerger conceptos tales como la *heterogeneidad* y la *plasticidad* de los neutrófilos (1). Además, se estableció la capacidad de éstas células para modelar las respuestas inflamatoria e inmune a través de la producción de citocinas de *ново* que pueden promover actividad antiinflamatoria o proinflamatoria dependiendo de su combinación y concentración. También, los neutrófilos poseen capacidad para liberar mediadores proinflamatorios preformados, tales como proteínas y alarminas (2,3). Finalmente, el interés en los neutrófilos se renovó en los últimos años debido a la observación de que estas células pueden contribuir a la patogénesis de numerosos trastornos inflamatorios crónicos por su capacidad para infiltrarse en los órganos linfoides, incluyendo el bazo y los ganglios linfáticos, así como su capacidad para establecer una asociación compleja con componentes del sistema inmune innato y adaptativo (4).

Los neutrófilos se desarrollan en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas en un proceso denominado "granulopoyesis" (5). El factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF, del inglés ***Granulocyte-Colony Stimulating Factor***) es el factor predominante que regula el ciclo de vida de los neutrófilos mediante el aumento de la proliferación celular, la supervivencia, la diferenciación, el tráfico y movilización. Además, el G-CSF induce la proliferación y la expresión de proteínas antiapoptóticas y regula la expresión de quimiocinas. En la médula ósea, las células del linaje de los neutrófilos se distribuyen en tres compartimentos: 1) el pool de células madres: compuesto de células madre hematopoyéticas y progenitores pluripotentes; 2) el pool mitótico: compuesto de mieloblastos, promielocitos y mielocitos; y 3) el pool post-mitótico: compuesto de metamielocitos, células en banda y neutrófilos maduros y que constituye el 95% de los neutrófilos del organismo (6). El paradigma tradicional de los neutrófilos circulantes como células inmunes de corta duración ha sido cuestionada por estudios *in vivo*, que han demostrado un tiempo de vida media de 5,5 días para los neutrófilos humanos, diez veces más que lo estimado previamente (7).

Los neutrófilos poseen distintos tipos de gránulos que son formados durante la diferenciación granulopoyética terminal a partir del estadio de promielocito y todos contienen lisosoma. Estos gránulos han sido clasificados en cuatro subgrupos basados en su densidad y composición: 1) gránulos azurófilos (primarios) que contienen potentes enzimas hidrolíticas, como elastasa y mieloperoxidasa (MPO), 2) gránulos específicos (secundarios) con altos niveles de lactoferrina, 3) gránulos de gelatinasa (terciario) que son ricos en metaloproteinasas de la matriz y 4) vesículas secretoras o fosomas que contienen fosfatasa alcalina, entre otros numerosos componentes (8).

La movilización desde la médula ósea y el tráfico de los neutrófilos hacia la circulación está orquestado por mediadores quimiotácticos y por receptores expresados en las células estromales de la médula ósea y en los neutrófilos, respectivamente. Los neutrófilos liberados desde la médula ósea se distribuyen en dos pools: uno en *circulación* y otro *marginal* referido a los neutrófilos adherentes a las células endoteliales del bazo, hígado y pulmón. En los últimos años, se ha determinado la habilidad de los neutrófilos para retornar a la circulación después de migrar al espacio extravascular cambiando el concepto clásico de la migración unidireccional (9).

1. Neutrófilos en la interacción huésped-patógeno

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa del organismo frente a lesiones e infecciones bacterianas, micóticas y algunas virales (10). Además, participan como elementos amplificadores que en asociación con el complemento se encargan de eliminar a los agentes extraños y otros componentes de su microambiente. Se conocen tres estrategias utilizadas por los neutrófilos para eliminar los microorganismos invasores: a) la fagocitosis, y subsiguiente eliminación del patógeno internalizado exponiéndolo a un estallido oxidativo y a compuestos antimicrobianos que son descargados de los gránulos citoplasmáticos en las vacuolas fagocíticas (11), b) la degranulación, que implica la liberación de sustancias antimicrobianas en el sitio de infección, y c) la liberación de estructuras en red de ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas microbicidas al espacio extracelular, conocidas como «trampas extracelulares de neutrófilos» (NET, del inglés *Neutrophil Extracellular Traps*) (12). Estas trampas representan una estrategia de defensa para evitar la

diseminación microbiana, concentrando la acción de los microbicidas y quizá promoviendo su sinergismo.

El mecanismo de fagocitosis se inicia con la activación de “receptores de reconocimiento de patrones” (PRR, del inglés *Pattern Recognition Receptor*) que se expresan en la superficie de los neutrófilos y que incluyen a receptores endocíticos y a receptores de señalización, particularmente a los receptores tipo Toll (TLR, del inglés *Toll-like receptors*) que juegan un rol crítico en detectar patógenos invasores (13).

El reclutamiento de los neutrófilos a los sitios de inflamación es un proceso guiado por mediadores quimiotácticos que pueden ser agrupados en cuatro familias: 1) quimiocinas, 2) lípidos, tales como el leucotrieno B₄ o el factor de activación de plaquetas (PAF, del inglés *Platelet Activating Factor*), 3) factores del complemento (C5a y C3a) y 4) péptidos N-formilados. El quimiotáctico más potente de los neutrófilos es la interleucina-8 (IL-8/CXCL8), que promueve el reclutamiento de estas células mediante su unión a los receptores de quimiocinas CXCR1 y CXCR2. A través de estos receptores, los neutrófilos también pueden responder a otras quimiocinas tales como: RGO (CXCL1/2/3), ENA-78 (CXCL5), GCP-2(CXCL6) y NAP-2 (CXCL7) (14). Luego del reconocimiento de los diversos estímulos a través de los receptores, los neutrófilos se movilizan al foco infeccioso por quimiotaxis. Esta migración ocurre bajo la modulación de la expresión de moléculas de adhesión sobre la superficie de los mismos y de las células endoteliales (6). La expresión alterada de estas moléculas de adhesión puede influir la migración y provocar una inapropiada liberación de compuestos tóxicos por parte de los neutrófilos.

Una vez en el área de inflamación, el neutrófilo reconoce a la partícula extraña y la rodea con pseudópodos formándose un *fagosoma*. Este proceso está mediado por una interacción compleja de los lípidos de membrana, señalización intracelular y reordenamientos del citoesqueleto. Durante la ingestión se activa la enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH-oxidasa), la cual produce la reducción en serie del oxígeno molecular a agua y da lugar a la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Radical Oxygen Species*) (15). La NADPH-oxidasa es una proteína de transmembrana constituida por múltiples componentes que transfieren electrones, a través de la membrana celular, al oxígeno como principal aceptor, formando de esta manera ROS. Este fenómeno se denomina “*estallido respiratorio*”. La reducción de un solo electrón del oxígeno origina el anión superóxido (O₂⁻) que rápidamente se convierte en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y

ácido hipocloroso (HOCl) por acción de la MPO. Estas ROS, junto a los derivados reactivos del nitrógeno y a las enzimas proteolíticas de los gránulos, constituyen el mecanismo fundamental de defensa de los neutrófilos (11). Seguidamente, los gránulos citoplasmáticos se fusionan con la vacuola digestiva y liberan su contenido (enzimas líticas y péptidos antimicrobianos) al interior de la vacuola formándose el *fagolisosoma*. Estas proteínas se liberan en los fagosomas o en el medio extracelular, actuando así contra cualquiera de los patógenos intra o extracelulares, respectivamente. Después de la digestión, el material fagocitado es exocitado.

Las NET, estructuralmente, son una malla de fibras de ADN que encierra histonas y proteínas antimicrobianas liberadas por los neutrófilos al espacio extracelular (12). Los microbios son inmovilizados en estas trampas extracelulares, donde encuentran una concentración letal de agentes antimicrobianos. En estas trampas de ADN es posible encontrar varios factores antimicrobianos liberados durante la degranulación de los neutrófilos, como MPO, elastasa, proteinasa 3, catepsina G, lactoferrina, triptasa y gelatinasa, entre otros (16). Asimismo, las NETs incorporan la liberación masiva de histonas al espacio extracelular, las cuales constituyen agentes antimicrobianos extremadamente efectivos, capaces de promover la lisis bacteriana (17).

Como estrategia antimicrobiana, la formación de NET ofrece ciertas ventajas respecto a la liberación de microbicidas por degranulación. Por un lado, constituyen una barrera de contención física para los agentes patógenos, previniendo así su diseminación. Por otro lado, las NETs mantienen una alta concentración de agentes antimicrobianos minimizando su difusión, lo que permite reducir el daño causado por los microbicidas a los tejidos circundantes (18). La formación de NET es gatillada en respuesta a una variedad de estímulos proinflamatorios como lipopolisacárido (LPS) bacteriano, IL-8 y acetato de forbol mirístato (PMA), así como también por bacterias, hongos y protozoos.

Aún son poco claros los mecanismos moleculares involucrados en la formación de NET, pero varias líneas de evidencias demuestran que la generación de ROS por la NADPH-oxidasa desempeña un rol central. Si bien cantidades fisiológicas de NET resultan importantes como agentes antiinfecciosos en la respuesta inmune innata, altos niveles de NET en circulación pueden resultar en una condición patofisiológica opuesta a la buscada, generando, por ejemplo, microtrombos en capilares, deterioro de la microcirculación y daño tisular (19) (Figura 1).

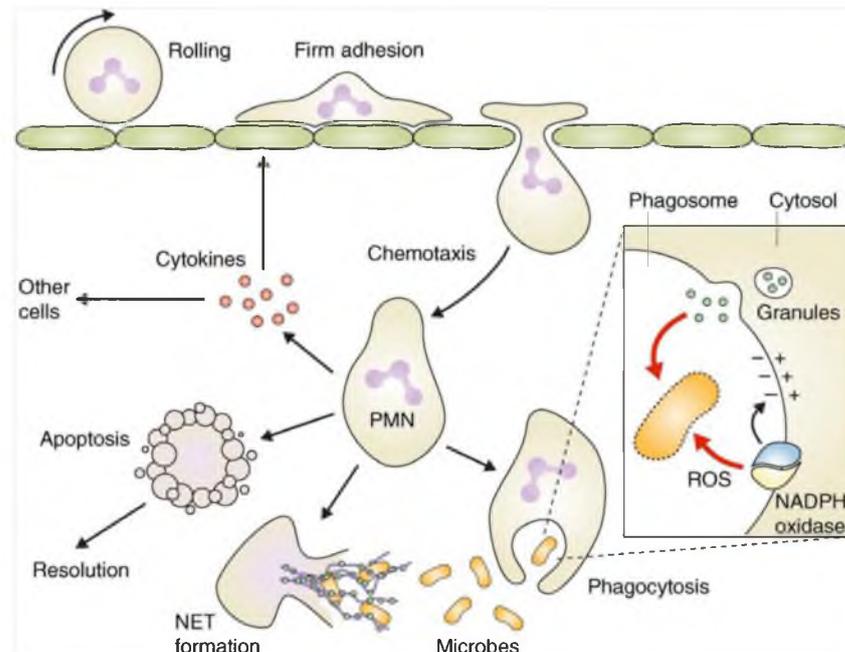


Figura 1. Funciones de los neutrófilos. Después de migrar al sitio de la inflamación, los neutrófilos fagocitan y digieren a los microbios invasores, liberan las NET, las que probablemente atrapan a los microorganismos y producen citocinas que contribuyen a la reacción inflamatoria. Una vez que se elimina la infección, los neutrófilos mueren por apoptosis y desencadenan un programa activo para resolver la inflamación. La muerte de los patógenos en el interior del fagosoma se produce por las ROS generadas a través de la NADPH-oxidasa, así como por las enzimas liberadas de los gránulos intracelulares. La NADPH-oxidasa también induce la despolarización de la membrana del fagosoma (Tomado de J Exp Med 2013,210:1283-1299) (20).

2. Heterogeneidad y plasticidad de los neutrófilos

La activación de los neutrófilos por señales provenientes de los sitios de inflamación condiciona la expresión de distintos marcadores de superficie o la síntesis *de novo* de citocinas, características que son comúnmente utilizadas para definir subconjuntos de neutrófilos. La *heterogeneidad* de los neutrófilos se puede caracterizar por: 1) el aspecto nuclear (célula en banda, célula segmentada y célula hipersegmentada), 2) la densidad celular y 3) los neutrófilos que liberan NET y los que no lo liberan (21).

En condiciones fisiológicas, una pequeña proporción de neutrófilos coexpresan en su superficie la molécula CD177 (glicoproteína de superficie vinculada a glicosilfosfatidilinositol que desempeña un papel en la activación de neutrófilos) que regula la trans migración a través del endotelio, con la proteinasa-3 localizada en los

gránulos primarios. Sin embargo, las propiedades funcionales de este subgrupo de neutrófilos no han sido totalmente determinadas hasta el momento (22). Por otro lado, los neutrófilos senescentes constituyen otra subpoblación que expresa elevados niveles de receptor de quimiocina CXCR4, que condiciona un aumento de la capacidad migratoria hacia la médula ósea a través de su unión con su ligando, el CXCL2 (23). Otra subpoblación de neutrófilos que se ha identificado en condiciones fisiológicas es la que expresa Olfactomedina-4 (proteína antiapoptótica), presente en los gránulos específicos. Estos neutrófilos parecen inducir respuestas autoinmunes (23). Además, los neutrófilos maduros de donantes sanos, después de la centrifugación de la sangre sobre un gradiente de densidad, por lo general sedimentan en la parte superior de los glóbulos rojos y se denominan "*neutrófilos de densidad normal*" (21). Dentro de esta fracción ha sido identificado un subconjunto de neutrófilos maduros que manifiestan propiedades inmunosupresoras.

En condiciones patológicas, los neutrófilos inmaduros, así como los maduros activados *in vivo* en condiciones inflamatorias, manifiestan propiedades alteradas de flotación y sedimentan dentro de la fracción de células mononucleares y por lo tanto han sido denominados "*neutrófilos de baja densidad*" (24). Dentro de esta fracción de neutrófilos se han identificado a: 1) neutrófilos inmaduros encontrados en pacientes con sepsis, 2) neutrófilos inmunosupresores, también conocidos como "*células supresoras de origen mieloide*", encontrados en pacientes con cáncer, individuos con infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o donantes tratados con G-CSF y 3) neutrófilos proinflamatorios encontrados en pacientes con enfermedades autoinmunes, y que consisten de una población mixta de células inmaduras y maduras (25,26).

La *plasticidad* de los neutrófilos ha sido demostrada por su capacidad de transdiferenciación en: a) híbridos neutrófilos-células dendríticas tras la estimulación con factor estimulante de colonias granulocítica-macrofágica (GM-CSF, del inglés ***Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor***) (27), b) células similares a células dendríticas (28), c) células similares a células presentadoras de antígeno que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (29), y d) fagocitos gigantes, asociados con la autofagia (30). Por otra parte, en condiciones inflamatorias, los neutrófilos en banda, pueden transdiferenciarse en monocitos (31).

3. Mecanismos de muerte celular de los neutrófilos

La muerte celular de los neutrófilos puede ocurrir por distintos mecanismos, tales como: necrosis, NETosis, autofagia y apoptosis.

3.1. Necrosis

La necrosis es una muerte celular violenta como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas. En este tipo de muerte, la degeneración celular es pasiva sin un requerimiento de energía en forma de Adenosina Trifosfato (ATP). En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno también conduce a las células vecinas hacia su muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción de inflamación y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado (32).

La necrosis de los neutrófilos es probablemente una de las principales causas de daño tisular durante la infección. Este tipo de muerte celular se caracteriza por una hinchazón citoplasmática, organelas desorganizadas, ruptura de la membrana plasmática y lisis del núcleo.

3.2. NTEosis

Se ha demostrado que algunos neutrófilos activados gatillan un programa de muerte celular –distinto de la apoptosis y la necrosis– que implica la disolución de la membrana nuclear y de las membranas granulares, y la posterior descondensación de la cromatina en el citoplasma. Este mecanismo de muerte celular, denominado NETosis (33), permite que el contenido granular antimicrobiano y la cromatina se mezclen, posibilitando –luego de la ruptura de la membrana plasmática– la liberación al espacio extracelular de proteínas granulares ancladas a una red de cromatina (mecanismo directo). Este proceso lleva unas 2 o 3 h.

En contraste con las células apoptóticas, las células NETóticas no muestran formación de vesículas de membrana, condensación de la cromatina nuclear, fragmentación de ADN, ni exposición de fosfatidilserina previa a la ruptura de la membrana plasmática (34).

Las infecciones bacterianas, parasitarias o micóticas, así como componentes microbianos (LPS) y ROS, pueden inducir este tipo de muerte celular.

3.3. Autofagia

La autofagia o muerte celular programada de Tipo 2 es un proceso de degradación de los autocomponentes con el propósito del reciclaje de los componentes citoplasmáticos. La autofagia puede ser inducida en las células infectadas, presumiblemente como un mecanismo de defensa del huésped para eliminar el patógeno. Se caracteriza por la formación de autofagosomas, que son grandes vesículas que contienen citosol y organelas, que se fusionan con los lisosomas y son degradados sin daño celular (35,36).

3.4. Apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada de Tipo 1 es un proceso originariamente descrito por Kerr, Wyllie y Currie en 1972 (37) para indicar una nueva forma de muerte celular, que a diferencia de la necrosis, no es inflamatorio. En base a los cambios morfológicos observados en las células éstos autores definieron a la apoptosis como: “un proceso coordinado dependiente de energía, que involucra la activación de un grupo de enzimas, denominadas caspasas, y una compleja cascada de eventos que conectan el estímulo inicial con la desaparición final de la célula” (38).

Cada día, más de 10^{11} neutrófilos circulantes sufren el proceso de apoptosis constitutiva (o espontánea) como un mecanismo para mantener el equilibrio de la homeostasis celular en condiciones fisiológicas. Este proceso se inicia en ausencia de cualquier estímulo extracelular. Luego de la liberación de la médula ósea, los neutrófilos permanecen en circulación entre 5 y 6 días (7), para posteriormente entrar en el bazo y el hígado y eventualmente morir por apoptosis dentro de las 24 hs.

Durante la inflamación aguda, los neutrófilos liberados de la médula ósea migran rápidamente desde la circulación hacia las áreas inflamadas, donde funcionan como células fagocíticas con potencial para causar daño a los tejidos como consecuencia de su elevada actividad oxidativa y proteolítica. Con el fin de resolver la inflamación, estas células deben ser removidas del lugar de la lesión mediante el proceso de apoptosis que limita el potencial proinflamatorio de los neutrófilos (39). Una vez que los neutrófilos inician el proceso de apoptosis, se vuelven no funcionales y pierden la capacidad de quimiotaxis, de fagocitosis, de producción de ROS y de degranulación (40)(41). De esta manera, son reconocidos y fagocitados por los macrófagos, un proceso denominado "eferocitosis" (42).

La apoptosis de los neutrófilos puede ser inducida, retrasada o aumentada por los microorganismos en función de su capacidad para evadir las defensas del huésped o verse afectados por el estado de salud del huésped. Por lo tanto, una compleja red de vías de señalización de muerte/supervivencia intracelular regula la apoptosis de los neutrófilos y el balance de estos circuitos en última instancia, determina el destino de éstas células.

3.4.1. Cambios morfológicos y bioquímicos de las células apoptóticas

La apoptosis se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos como son la disminución del volumen celular y nuclear (picnosis) debido a la condensación del citoplasma, por un lado, y a la compactación de la cromatina y fragmentación nuclear, por otro lado. La disminución del tamaño celular origina una pérdida de adherencia y de los contactos célula-célula (43) debido a la inhibición del sistema de transporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$, pero manteniendo íntegra en todo momento la funcionalidad de la membrana plasmática, evitando de este modo la salida al exterior del contenido intracelular. A medida que avanza el proceso, la membrana plasmática comienza a tener circunvoluciones (ondulaciones en la superficie), con una apariencia vesicular característica. La fosfatidilserina (fosfolípido originariamente enclavado en la membrana interna de la célula) pasa al exterior de la membrana plasmática, facilitando el reconocimiento de la célula por los macrófagos. Posteriormente, se produce una fragmentación del ADN por endonucleasas, impidiendo la replicación celular. Una vez finalizado el proceso, aparecen los cuerpos apoptóticos que mantienen sus membranas intactas y que son reconocidos por los macrófagos o las células

dendríticas procediendo a su fagocitosis e impidiendo así el desarrollo de una respuesta inflamatoria (Figura 2).

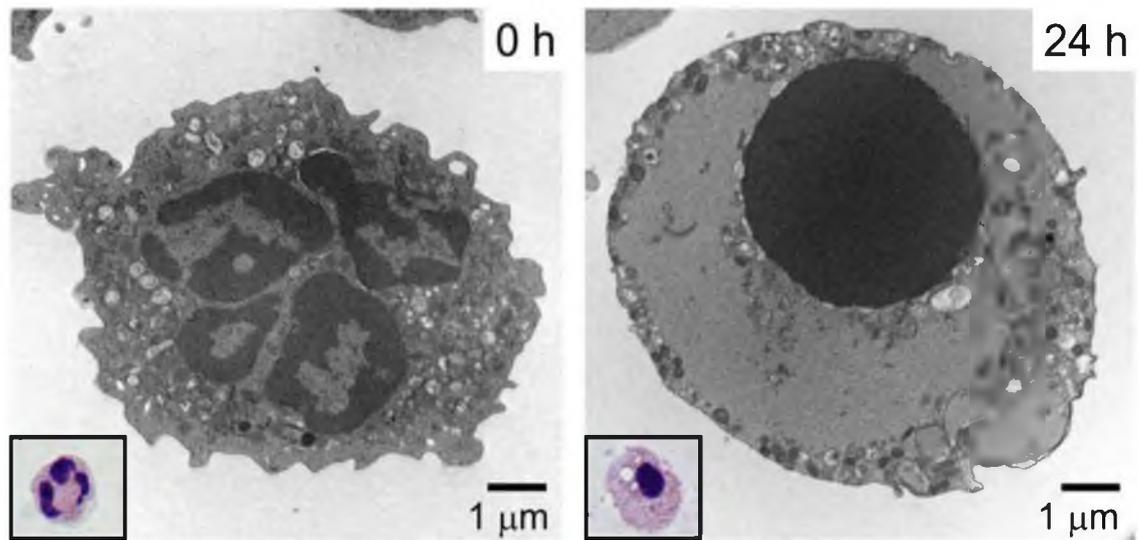


Figura 2. Apoptosis del neutrófilo. Neutrófilos humanos aislados de sangre circulante y procesados por microscopía electrónica de transmisión y con coloración de Giemsa-Wright luego de la purificación y a las 24 hs de cultivo (Tomado de Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2009;1:309–333) (44).

Otra característica específica de la apoptosis es la activación de las caspasas, las que escinden numerosas proteínas y también activan ADNasa que degradan el ADN nuclear. Aunque los cambios bioquímicos explican en parte alguno de los cambios morfológicos de la apoptosis, es importante señalar que los análisis bioquímicos de la fragmentación del ADN o la activación de caspasas no deberían ser los únicos utilizados para definir apoptosis debido a que este proceso puede ocurrir sin fragmentación oligonucleosomal del ADN y puede ser independiente de caspasa (45).

A nivel molecular, el programa de muerte celular de los neutrófilos involucra mecanismos particulares como: expresión predominante de la proteína antiapoptótica de “diferenciación de células de la leucemia mieloide” (Mcl-1, del inglés *Myeloid leukemia cell differentiation protein*), función restringida de la mitocondria, producción de ROS y liberación de proteasas de los gránulos azurófilos.

3.4.2. Vías de inducción de la apoptosis

La apoptosis de los neutrófilos comparte numerosas similitudes con la de otros tipos celulares, pero también exhibe características distintas en la ejecución del programa de muerte. En estas células, la apoptosis puede ser iniciada por dos tipos generales de vías de señalización, dependiendo del origen del estímulo de muerte, y que conducen a la activación de la muerte celular programada: 1) la vía extrínseca o muerte inducida por activación de receptores de muerte (46) y 2) la vía intrínseca o mitocondrial inducida por distintas formas de estrés celular, como puede ser el causado por la privación de factores de crecimiento en el medio, pérdida de adhesión al sustrato, daño al ADN, estrés en el retículo endoplásmico, activación de oncogenes, infección viral y radiaciones ionizantes y ultravioleta. Una tercera vía de señalización que conduce a la muerte celular de los neutrófilos es la inducida por estímulos tales como: fagocitosis de partículas opsonizadas con anticuerpo o con complemento, así como bacterias o virus.

El mecanismo molecular de la apoptosis es extremadamente complejo y puede implicar la activación de las caspasas. Se trata de cisteín-proteasas, ya que presentan un residuo de cisteína en su centro catalítico, que median la ruptura de otras proteínas y se caracterizan por cortar sus sustratos a nivel de un residuo de aspártico, de donde deriva su nombre. Las caspasas intervienen en la iniciación, propagación y ejecución de la apoptosis. El grupo de las caspasas iniciadoras está formado por la caspasa-2, -8, -9 y -10 mientras que el grupo de las caspasas ejecutoras está formado por la caspasa-3, -6 y -7 (38). Los neutrófilos expresan una variedad de caspasas iniciadoras y efectoras, incluyendo la caspasa-1, -3, -4, -6, -7, -8, -9 y -14. Así mismo, expresan la "proteína inhibidora de la apoptosis ligada al X" (XIAP, del inglés *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*) que bloquea la actividad de caspasas efectoras previniendo la apoptosis especialmente en neutrófilos inmaduros (15).

3.4.2.1. Vía extrínseca

Esta vía es inducida por señales de estrés extracelular que son detectadas y propagadas por receptores transmembrana específicos o “receptores de muerte”. La vía extrínseca de la apoptosis es iniciada por la unión de un ligando de muerte, como Fas/CD95 ligando (FasL/CD95L), factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *Tumor Necrosis Factor*) y Apo2L/TRAIL (Ligando inductor de apoptosis asociada a TNF, del inglés *TNF-related apoptosis inducing ligand*) a sus correspondientes receptores de muerte (47). Alternativamente, una señal pro-apoptótica extrínseca puede ser enviada por los llamados «receptores de dependencia», incluyendo a los receptores de netrina (atrayentes quimiotrópico) que sólo ejercen funciones letales cuando la concentración de sus ligandos específicos cae por debajo de un umbral crítico (48).

Cuando el FasL (CD178) se une al receptor Fas (CD95) en la membrana, produce la trimerización del receptor que interacciona con una proteína adaptadora llamada “proteína asociada al Fas con un dominio de muerte” (FADD, del inglés *FAS-associated protein with a Death Domain*). Esta proteína se une a las formas inactivas de la caspasa-8, una caspasa iniciadora, formando el Complejo de Señales Inductoras de Muerte (DISC, del inglés *Death-Inducing Signaling Complex*) (49). Esto lleva a que múltiples moléculas de procaspasa-8 comiencen un mecanismo de autoproteólisis inducido por la proximidad (50) conduciendo a la escisión y activación de la caspasa-3.

Luego de la estimulación de los neutrófilos con FasL o con anti-Fas IgM, la vía extrínseca se puede conectar con la vía intrínseca a través de la acción de caspasa-8 que activa al factor “dominio de muerte para la interacción BH3” (Bid, del inglés *BH-3 Interacting Domain Death*) un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 (Linfoma Célula B 2, del inglés *B-cell lymphoma 2*), alterando la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria (MOMP, del inglés *mitochondrial outer membrane permeabilization*). El Bid activado se transloca a la mitocondria induciendo la liberación de citocromo c, Smac (segundo activador de caspasas derivado de mitocondria, del inglés *Second mitochondria-derived activator of caspases*) y otros factores proapoptóticos que desencadenan una cascada de activación de caspasas escindiendo y activando la caspasa-3 para mediar la etapa de ejecución (51).

Los neutrófilos también expresan TNFR1 y TNFR2, receptores de muerte de la familia del TNF (15). A diferencia de otras citocinas proinflamatorias, la estimulación

con TNF puede inducir, retardar o no ejercer ningún efecto en la apoptosis de los neutrófilos, dependiendo de la concentración y de la duración del estímulo (51). A bajas concentraciones las células sobreviven y a dosis elevadas se induce apoptosis (52).

Como se muestra en la Figura 3, el mecanismo molecular inducido por TNF, difiere del mediado por Fas, principalmente en que no se conectaría con la vía mitocondrial y no se produciría activación de Bid ni liberación de citocromo c (53). Cuando se ligan TNF/TNFR1, se une la “proteína adaptadora con dominio de muerte asociada a TNF-R1” (TRADD, del inglés *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*) que recluta a la “proteína quinasa de interacción con receptor” (RIP, del inglés *Receptor-Interacting Proteinkinases*) (36) que, al fosforilar p38 e inhibir el “fosfoinositol 3-quinasa” (PI3K, del inglés, *Phosphatidylinositide 3-kinases*) activa en los neutrófilos a la NADPH-oxidasa para la producción de ROS. La muerte de los neutrófilos inducida por TNF podría ser, por lo tanto, independiente a la activación de caspasas y requiriendo de la producción de ROS (54).

Aunque los receptores de TNF, de Fas y de TRAIL son los más ampliamente estudiados como inductores de muerte por señales extracelulares, no son los únicos y cada día emergen nuevas evidencias de las vías moleculares por las cuales otros receptores también transducen señales intracelulares de muerte celular por apoptosis. A este respecto, las infecciones microbianas están acompañadas por una importante respuesta del huésped, incluyendo la liberación de citocinas proinflamatorias, que alteran la apoptosis de los neutrófilos. En general, la mayoría de los mediadores inflamatorios están asociados con el retraso de la apoptosis espontánea de los neutrófilos e incluyen factores, tales como: IL-1 β , IL-6, IL-8, GRO- α , PAF, IFN- γ , G-CSF, C5a y GM-CSF.

El Comité para la Nomenclatura de Muerte Celular (48) indica que la apoptosis extrínseca puede ser iniciada por una de las tres principales cascadas letales de señalización: 1) señalización del receptor de muerte y activación de la caspasa-8 (o -10) \longrightarrow cascada de caspasa-3; 2) señalización del receptor de muerte y activación de la caspasa-8 \longrightarrow tBID \longrightarrow MOMP \longrightarrow caspasa -9 \longrightarrow camino de caspasa -3; o 3) señalización a través del receptor de dependencia inducida por privación del ligando seguida por activación (directa o dependiente de MOMP) de la caspasa -9 \longrightarrow cascada de caspasa-3 (Figura 4).

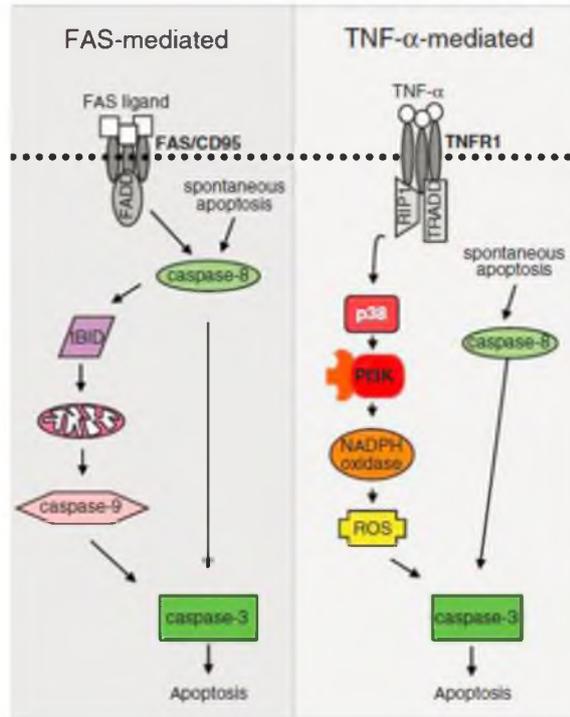


Figura 3. Vías moleculares para la ejecución de apoptosis por la vía extrínseca. La apoptosis inducida por Fas depende en gran medida de la vía de muerte mitocondrial mientras que la apoptosis inducida por TNF es mediada por la generación de ROS (Adaptado de Cell Death and Differentiation. 2011;18: 1457-1469) (15)

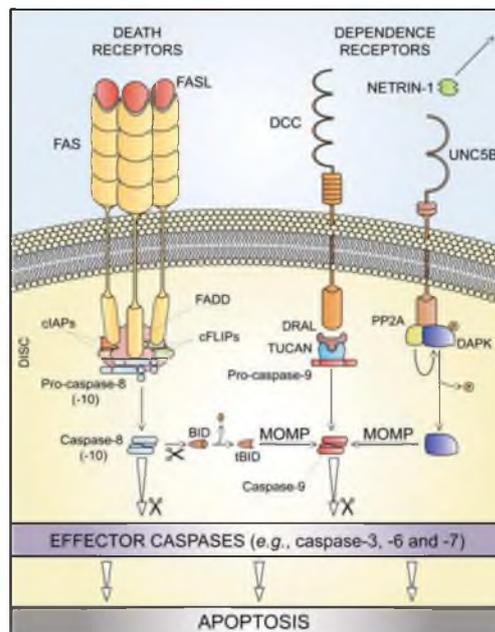


Figura 4. La vía extrínseca de la apoptosis. Esta vía puede ser inducida por unión de un ligando a un receptor de muerte o iniciada a través de receptores de dependencia que transmiten señales letales en ausencia de su ligando (netrina-1) (Tomada de Cell Death and Differentiation. 2012;19: 107–120).(48)

3.4.2.2. Vía intrínseca

La vía intrínseca involucra a la mitocondria y a miembros de la familia Bcl-2 y se inicia como respuesta a una amplia variedad de estímulos, tales como la activación de oncogenes, hipoxia, drogas citotóxicas y ROS, que activan sensores internos que transmiten señales directamente hacia la mitocondria. Esta vía de activación de la apoptosis se caracteriza por la ruptura del equilibrio entre moléculas proapoptóticas y antiapoptóticas que regulan la permeabilidad mitocondrial. Esto lleva a que proteínas, normalmente secuestradas en la mitocondria, se liberen y actúen como proteínas inductoras de muerte (55).

La permeabilidad de la membrana mitocondrial está controlada por miembros proapoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bmf, NOXA, PUMA) y antiapoptóticos (Bcl2, Bcl-X, Mcl-1) de la familia Bcl-2. Normalmente, hay factores de crecimiento que junto a señales de supervivencia estimulan la producción de miembros antiapoptóticos, como Bcl-2 y Bcl-XL, y bloquean la oligomerización de los miembros proapoptóticos. Sin embargo, cuando la célula es afectada por señales negativas (falta de ciertos factores de crecimiento, hormonas o citoquinas) o señales positivas (radiación, toxinas, hipoxia, hipertermia, infecciones virales, radicales libres) (38) este equilibrio se altera y los niveles de Bcl-2 y/o Bcl-XL en la membrana mitocondrial disminuyen y son reemplazados por miembros proapoptóticos (Bak, Bax, Bim, Mcl-1). Este cambio produce un aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial con el escape de proteínas que activan las caspasas. Una de ellas es el citocromo c, que migra del espacio intermembrana mitocondrial al citoplasma.

Si bien los neutrófilos contienen pocas mitocondrias, además del citocromo c, otros factores apoptóticos son liberados desde el espacio mitocondrial intermembrana hacia el citoplasma. Entre ellos se incluye al Smac/DIABLO (Smac/DIABLO, del inglés *Direct IAP-binding protein with low pI*) y a la endonucleasa G que intervienen en la vía intrínseca dependiente de caspasa, mientras que el “factor inductor de apoptosis”(AIF, del inglés *Apoptosis Inducing Factor*) y la “proteasa serinaHtrA2” (proteína A2 que requiere alta temperatura, del inglés *high temperature required protein A2*) (15) intervienen en la vía intrínseca independiente de caspasa (Figura 5).

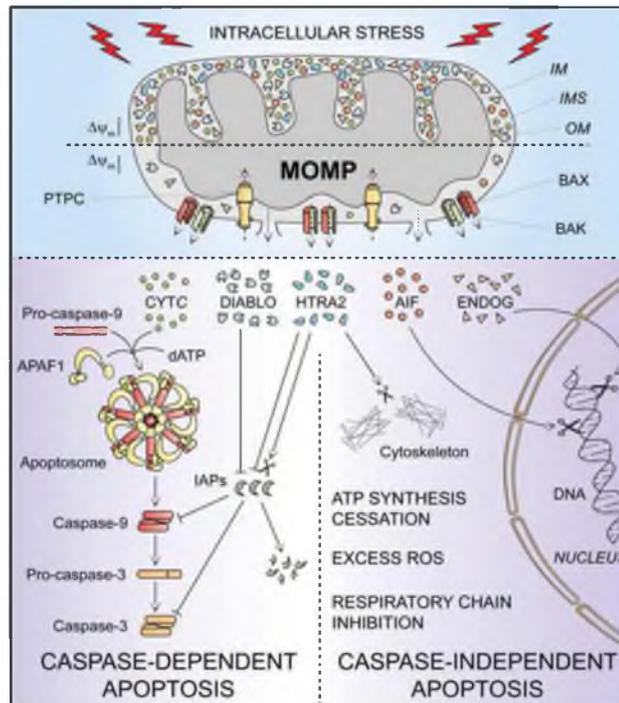


Figura 5. Vía intrínseca de la apoptosis. En respuesta a múltiples condiciones de estrés intracelular se generan signos pro-sobrevivencia y pro-muerte que convergen en un mecanismo de control mitocondrial (Tomada de *Cell Death and Differentiation*. 2012;19: 107–120).(48)

La liberación citoplásmica de citocromo c activa a la caspasa-3 a través de la formación de un complejo conocido como apoptosoma que se compone de citocromo c, “factor activador de la proteasa apoptótica 1” (Apaf-1, del inglés *Apoptotic protease activating factor 1*) y caspasa-9 (50). Por otra parte, Smac/DIABLO u Omi/HtrA2 promueven la activación de caspasas mediante la unión a las “proteínas inhibidoras de la apoptosis” (IAP, del inglés *inhibitor of apoptosis proteins*), que posteriormente conducen a la interrupción de la interacción de las IAPs con la caspasa-3 o -9 (49).

Por otro lado, las calpaínas son una familia de cisteína proteasas no lisosomales presentes en neutrófilos (56). Las isoformas ubicuas calpaína-1 y calpaína-2 se caracterizan por sus requerimientos de calcio *in vitro*. Durante la muerte espontánea de los neutrófilos, los niveles de calpastatina, un inhibidor altamente específico de la calpaína, disminuye dando lugar a un marcado aumento de la actividad de calpaína-1 la cual escinde a Bax en fragmentos activos.

3.4.2.3. Muerte celular inducida por la fagocitosis

Este camino depende de la producción de ROS que puede estar mediada por: 1) activación de la NADPH-oxidasa, 2) mediante mecanismos independientes a esta enzima y en los que pueden participar los canales de potasio de baja conductancia (SK) activados por calcio, y 3) por los bajos niveles de citocromo c que retardan la cadena respiratoria produciendo acumulación de electrones con la consecuente formación de ROS (51).

Según los niveles y el sitio de producción de ROS por la NADPH-oxidasa, los neutrófilos podrán sobrevivir o morir por apoptosis o necrosis. La NADPH-oxidasa se activa tanto en la membrana celular, produciendo ROS que se liberan al medio, como en la membrana de los gránulos, produciendo ROS que se mantienen a nivel intracelular. La excesiva producción de ROS o la disminución de factores antioxidantes, pueden producir la muerte de neutrófilos por necrosis. A valores intermedios, producen la muerte por apoptosis, mientras que a niveles bajos de ROS, los neutrófilos pueden sobrevivir (15) (Figura 6).

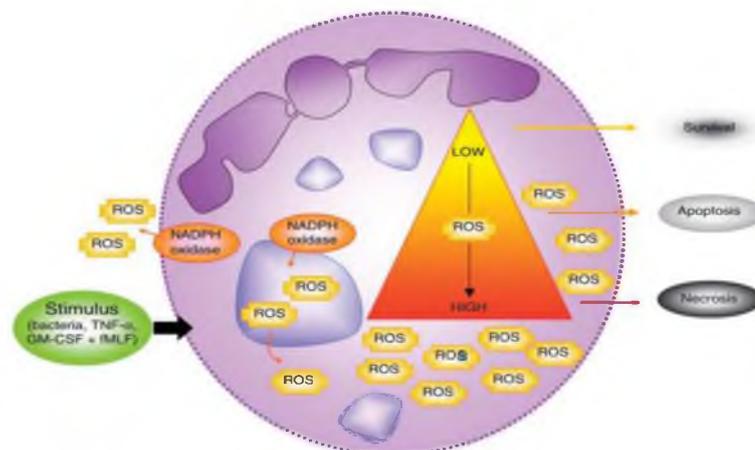


Figura 6. Muerte de neutrófilos mediada por ROS. Al activarse el neutrófilo, la NADPH oxidasa se une a la membrana celular o de los gránulos y se activa, generando ROS intra y extracelular. Dependiendo de la cantidad y del lugar de producción de ROS producido por la NADPH oxidasa, el neutrófilo podrá morir por apoptosis o necrosis, o también incrementar la supervivencia. (Tomada de Cell Death and Differentiation. 2011;18:1457-1469) (15).

Los ROS inducen la ruptura de los gránulos azurófilos lo que produce la liberación de catepsina G. Esta proteasa conduce a la activación de la caspasa -8 independientemente de receptores. Por otro lado, la catepsina G produce activación de Bid y degradación de Mcl-1 lo que favorece la disrupción mitocondrial y activación de la vía intrínseca de la apoptosis.

Independientemente de la vía que inicia la activación de caspasas, todas confluyen en la activación de las principales caspasas efectoras: caspasa -3, caspasa -6 y caspasa -7. Si bien ha sido documentada la relación de la caspasa -8 con la familia de receptores de muerte tipo TNF, de la caspasa -9 con la vía mitocondrial (57) y de Bid con la liberación de citocromo c de la mitocondria, hay evidencias que presentan interacciones a varios niveles y que las moléculas de una vía pueden influir en la otra (38).

La Figura 7 esquematiza las vías extrínseca, intrínseca y de muerte celular inducida por la fagocitosis que activan la apoptosis de los neutrófilos.

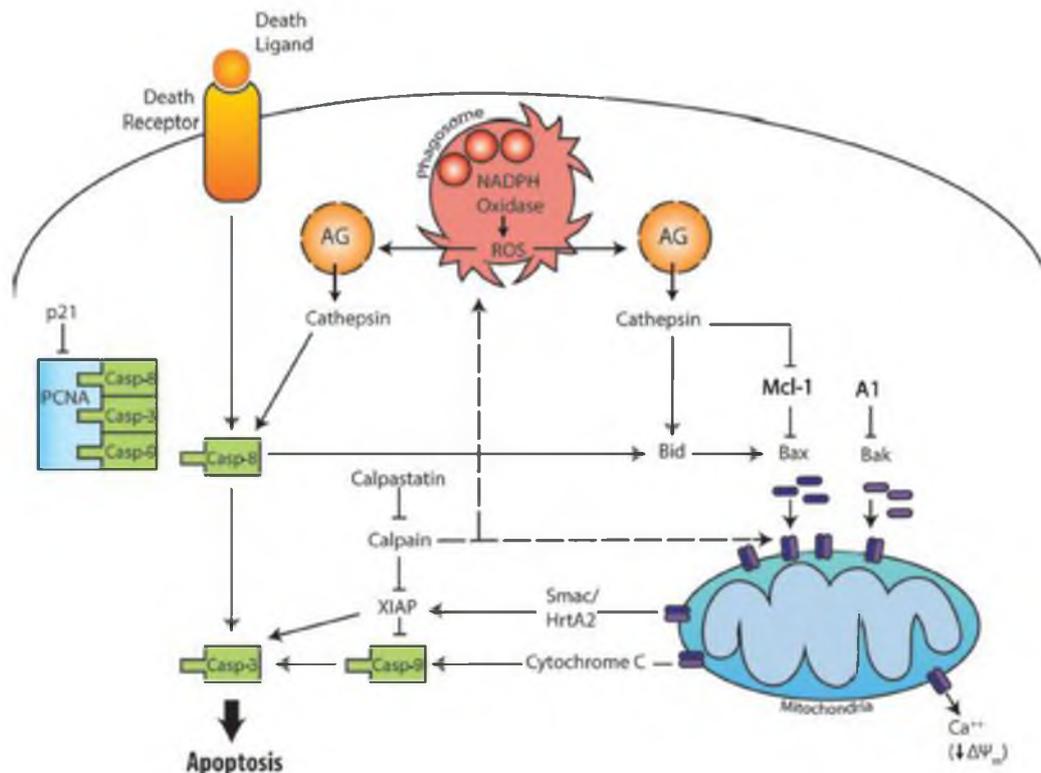


Figura 7. Vías extrínseca, intrínseca y de fagocitosis que inducen la apoptosis de neutrófilos. (Tomado de Journal of Cell Death. 2014;7;15-23). PCNA (proliferating cell nuclear antigen), AG (azurophile granules), XIAP (X-linked inducer of apoptosis protein) (58).

4. Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Desde el reconocimiento inicial del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en 1981 con la presentación de neumonía por *Pneumocystis carinii* en hombres homosexuales en los EE.UU (59), el VIH ha dado lugar a una pandemia de proporciones casi sin precedentes, causando una elevada morbilidad y mortalidad. Se han identificado dos tipos de virus como los agentes etiológicos del SIDA que son genética y antigénicamente diferentes y denominados VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 hace referencia a los virus genéticamente relacionados encontrados en varias regiones de África, Asia, Europa y del continente americano, siendo responsable de la epidemia mundial. El VIH-2 prevalece en determinados países del oeste de África y los individuos infectados con este tipo de virus presentan una menor mortalidad, ya que este virus presenta una menor patogenicidad y menor transmisibilidad. Afortunadamente, la terapia antirretroviral de alta eficacia (HAART, del inglés *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) implementada a mediados de los '90 y actualmente denominada terapia antirretroviral (TAR) combinada, ha logrado modificar el curso clínico y el pronóstico de la infección mejorando notablemente la supervivencia y calidad de vida de los pacientes infectados. Estos avances farmacológicos han permitido convertir a la infección por el VIH-1 en una enfermedad crónica.

La transmisión del VIH-1 se produce a partir de la exposición al virus en las superficies mucosas o por inoculación percutánea y, por lo general, la infección resulta de la transmisión de una única partícula de virus. El virión se replica para generar viremia y una infección persistente en todo el tejido linfoide del cuerpo.

El VIH-1 infecta preferentemente a células que expresan sobre su superficie la molécula CD4, como los linfocitos T (LT), monocitos/macrófagos, células dendríticas y células microgliales del sistema nervioso central. La entrada viral constituye la fase inicial del ciclo vital del VIH. Es un proceso compuesto de varias etapas durante las cuales se produce la interacción entre la proteína gp120 de la envoltura del VIH y las moléculas localizadas en la superficie de la célula diana que actúan como receptores celulares, concretamente el receptor CD4 y los correceptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. La interacción culmina con la fusión de las cubiertas viral y celular, y la liberación de la cápside viral en el citosol.

Al inicio de la infección y durante los primeros años de la infección, el VIH utiliza principalmente el correceptor CCR5 para entrar en la célula (60). Este correceptor está

expresado principalmente en los LT activados y de fenotipo memoria/efector e igualmente en los macrófagos, las células dendríticas inmaduras, las células microgliales del sistema nervioso central y en neutrófilos activados (61). Los virus que utilizan este correceptor constituyen los virus “de tropismo R5” o “macrófago trópicos”. Con el inicio de la inmunodeficiencia, emergen virus que infectan a nuevas células. El cambio de tropismo implica el cambio del uso de CCR5 por CXCR4 y constituyen los virus “de tropismo X4” o “linfotrópico” que se replican principalmente en los linfocitos CXCR4⁺ de tipo naive. La aparición de virus con tropismo por el correceptor CXCR4 se correlaciona con una progresión más rápida hacia la instauración de inmunodeficiencia (62). Un número limitado de virus muestra un tropismo doble, a la vez por CXCR4 y CCR5, y éstos reciben el nombre de R5X4 o duales.

La pérdida de LT-CD4⁺ por sí sola no es la responsable de la disfunción inmune grave observada en la infección por VIH-1. La activación crónica del sistema inmune es un sello de la progresión de la infección. Los LT, linfocitos B y células presentadoras de antígeno evidencian activación funcional y fenotípica. La translocación de productos microbianos desde el tracto gastrointestinal hacia la circulación portal y sistémica se ha propuesto como la principal causa de la activación inmune crónica que se asocia con la progresión de la enfermedad.

Debido a que el VIH tiene como principal célula diana a los LT-CD4⁺, la infección se caracteriza por una pérdida progresiva de estas células que, junto a la activación inmune crónica propician la instauración de un síndrome de inmunodeficiencia caracterizado por numerosas infecciones oportunistas y tumores.

5. Neutrófilos en la infección por VIH

El papel de los neutrófilos en la infección por VIH-1 no está totalmente caracterizado, en parte debido principalmente a que su papel ha sido investigado desde el punto de vista de la mayor susceptibilidad de los pacientes con VIH-1 a las infecciones bacterianas y fúngicas. Sin embargo, actualmente está claro que la relación entre los neutrófilos y el VIH-1 es mucho más compleja de lo que se pensaba.

El VIH tiene la capacidad de unirse a los neutrófilos debido a que estas células poseen un alto nivel de expresión del correceptor del VIH-1, CXCR4 (63), además de un amplio repertorio de receptores de superficie capaces de reconocer otras clases de macromoléculas (64). Por otro lado, los estímulos inflamatorios por infecciones concomitantes aumentan la capacidad de unión del VIH a los neutrófilos. Esta unión

afecta a casi todas las funciones de los neutrófilos, particularmente en los estadios avanzados de la infección, y la función anormal de estas células puede predisponer a aumentar la susceptibilidad a desarrollar algunas infecciones bacterianas secundarias y/o infecciones oportunistas.

Los neutrófilos pueden participar en eventos patogénicos de la infección por VIH mediante su capacidad para *controlar la replicación del virus y promover su eliminación*. Aunque los mediadores derivados de estas células, tales como ROS, TNF e IL-8 pueden incrementar la replicación del virus (65,66), también se ha determinado un papel activo de los neutrófilos en el control de la replicación del VIH-1. Las α -defensinas humanas son péptidos catiónicos ricos en cisteína con actividad antimicrobiana; los neutrófilos producen 4 de las 6 isoformas (proteínas 1-4) expresadas por los seres humanos. Estas α -defensinas han sido implicadas en la inhibición de varias etapas del ciclo de replicación del VIH-1, principalmente bloqueando la entrada y la fusión del virus en las células diana por su capacidad para inhibir la unión de la glicoproteína gp120 de envoltura viral al receptor CD4 y correceptores. Además, las α -defensinas regulan la expresión de las moléculas CD4 y CXCR4 e inhiben la replicación del VIH-1 a nivel de la transcripción inversa y los pasos de integración (67,68).

Saitoh et al. (69) han demostrado que las NET son generadas en respuesta al acoplamiento de TLR7/8 y que puede capturar al VIH-1 y promover su eliminación. Sin embargo, el VIH puede contrarrestar esta eliminación mediante la inducción de IL-10 por las células dendríticas y de esta forma, inhibir la formación de NET.

6. Bibliografia

1. Perobelli SM, Galvani RG, Gonc T, et al. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Brazilian J Med Biol Res.* 2015;48:665-75.
2. Jaillon S, Galdiero MR, Del Prete D, et al. Neutrophils in innate and adaptive immunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35:377-94.
3. Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines : facts beyond expression. *Front Immunol.* 2014;5:1-7.
4. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, et al. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog.* 2015;11:1-23.
5. Bugl S, Wirths S, Martin RM, et al. Current insights into neutrophil homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2012;1266:171-78.
6. Silvestre-Roig C, Hidalgo A, Soehnlein O. Neutrophil heterogeneity : implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood.* 2016;127:2173-82.
7. Pillay J, Braber I Den, Vrisekoop N, et al. In vivo labeling with H₂O₂ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116:625-28.
8. Rørvig S, Østergaard O, Heegaard NHH, et al. Proteome profiling of human neutrophil granule subsets , secretory vesicles , and cell membrane : correlation with transcriptome profiling of neutrophil precursors. *J Leukoc Biol.* 2016;94:711-21.
9. Colom B, Bodkin J V, Beyrau M, et al. Leukotriene B₄ -Neutrophil Elastase Axis Drives Neutrophil Reverse Transendothelial Cell Migration In Vivo Article Leukotriene B₄-Neutrophil Elastase Axis Drives Neutrophil Reverse Transendothelial Cell Migration In Vivo. *Immunity.* 2015;42:1075-86.
10. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Review Immunology.* 2006;6:173-82.
11. Segal AW. How Neutrophils Kill Microbes. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:197-223.
12. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science.* 2004;303:1532-35.
13. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, et al. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med.* 2007;39:421-38.
14. McDonald B, Kubes P. Cellular and molecular choreography of neutrophil recruitment to sites of sterile inflammation. *J Mol Med.* 2011;89:1079-88.
15. Geering B, Simon H. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death and Differentiation.* 2011;18:1457-69.

16. Papayannopoulos V, Zychlinsky A. NETs : a new strategy for using old weapons. *Trends Immunol.* 2009;30:513-21.
17. Hirsch JG. Bactericidal action of histone. *J Exp Med.* 1958;108:925-44.
18. Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes : an integrated view. *Immunol Rev.* 2007;219:88-102 .
19. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107:15880-85.
20. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210:1283-99.
21. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood.* 2014;124:710-19.
22. Bauer S, Abdgawad M, Gunnarsson L, et al. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2007;8:458-64.
23. Beyrau M, Bodkin JV. Neutrophil heterogeneity in health and disease: a revitalized avenue in inflammation and immunity. *Open Biol.* 2012;2:120-34.
24. Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes : a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol.* 2013;35:455-63.
25. Brandau S, Dumitru CA, Lang S. Protumor and antitumor functions of neutrophil granulocytes. *Semin Immunopathol.* 2013;35:163-76.
26. Drifte G, Dunn-Siegrist I, Tissières P, et al. Innate Immune Functions of Immature Neutrophils in Patients With Sepsis and Severe Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Crit Care Med.* 2013;41:820- 32.
27. Matsushima H, Geng S, Lu R, et al. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood.* 2013;121:1677-89.
28. Iking-Konert C, Ostendorf B, Sander O, et al. Transdifferentiation of polymorphonuclear neutrophils to dendritic-like cells at the site of inflammation in rheumatoid arthritis: evidence for activation by T cells. *Ann Rheum Dis.* 2005;64:1436-43.
29. Pliyev BK, Sumarokov AB, Buriachkovskaia LI, et al. Extracellular acidosis promotes neutrophil transdifferentiation to MHC class II-expressing cells. *Cell Immunol.* 2011;71:214-18.
30. Dyugovskaya L, Berger S, Polyakov A, et al. The development of giant phagocytes in long-term neutrophil cultures. *J Leukoc Biol.* 2014;96:511-21.

31. Köffel RE, Meshcheryakova A, Warszawska J, et al. Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation. *Blood*. 2014;124:2713–24.
32. Iba T, Hashiguchi N, Nagaoka I, et al. Neutrophil cell death in response to infection and its relation to coagulation. *Intensive Care*. 2013;1: 1-13.
33. Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18:1386-93.
34. Kobayashi Y. Neutrophil Biology : An update. *EXCLI Journal*. 2015;14:220-27.
35. Labbé K, Saleh M. Cell death in the host response to infection Significance of Cell Death During Infection. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15:1339-49.
36. Iranpour M, Moghadam AR, Yazdi M, et al. Apoptosis, autophagy and unfolded protein response pathways in Arbovirus replication and pathogenesis. *Expert Rev Mol Med*. 2016;18:1-21.
37. Kerr JFR, Wyllie AH and Currie AR. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-57.
38. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007;35:495-516.
39. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, et al. Neutrophils : Molecules , Functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*. 2000;80:617-53.
40. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*. 2001;487:318-22.
41. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR et al. Down-Regulation of Proinflammatory Capacity During Apoptosis in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *J Immunol*. 2013;170:3357-68.
42. Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: When the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol*. 2011;32:350-57.
43. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146:3-15.
45. Kobayashi S. Towards a comprehensive understanding of the role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009;1:309-33.
45. Anita HP, Paras J, Patnaik A. Apoptosis (programmed cell Ideath) – A review. *World J Pharm Res*. 2014;3:1854-72.
46. Salmen S, Montes H, Soyano A, et al. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: Role of reactive oxygen species,

- caspases and map kinase pathways. *Clin Exp Immunol*. 2007;150:539-45.
47. Salmen S, Terán G, Borges L, et al. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*. 2004;137:166-72.
 48. Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differentiation*. 2012;19:107-20.
 49. Rojas M, Salmen S, Berrueta L. Muerte celular programada: Activación y mecanismos de regulación. *Rev Médica la Extensión Port*. 2009;4:92-106.
 50. Reed J. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol*. 2000;157:1415-30.
 51. Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms and regulation. *Am J Hematol*. 2008; 83:288-95.
 52. van der Berg JM Van Den, Weyer S, et al. Divergent effects of tumor necrosis factor α on apoptosis of human neutrophils. *J Leukoc Biol*. 2001;69:467-73.
 53. Geering B, Gurzeler U, Federzoni E et al. A novel TNFR1-triggered apoptosis pathway mediated by class IA PI3Ks in neutrophils. *Blood*. 2011;117:5953-62.
 54. Chen H, Wang C, Chou C, et al. Tumor necrosis factor- α induces caspase-independent cell death in human neutrophils via reactive oxidants and associated with calpain activity. *J Biomed Sci*. 2006;13:261-73.
 55. Salmen S, Guillermo C, Colmenares M, et al. Papel del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en la apoptosis de leucocitos de pacientes infectados. *Invest Clin*. 2005;46:289-305.
 56. Elbim C, Katsikis PD, Estaquier J. Neutrophil apoptosis during viral infections. *Open Virol J*. 2009;3:52-9.
 57. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differ*. 2009;16:1093-107.
 58. McCracken JM, Allen L-AH. Regulation of Human Neutrophil Apoptosis in Health and Disease. *J Cell Death*. 2014;7:15-23.
 59. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med*. 1981;305:1425-31.
 60. Deng H, Liu R, Ellmeier W et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661-66.
 61. Hartl D, Krauss-Etschmann S, Koller B, et al. Infiltrated Neutrophils Acquire

- Novel Chemokine Receptor Expression and Chemokine Responsiveness in Chronic Inflammatory Lung Diseases. *J. Immunol.* 2008;181:8053-67.
62. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, et al. Change in Coreceptor Use Correlates with Disease Progression in HIV-1–Infected Individuals. *J Exp Med.* 1997;185:621-28.
63. Förster R, Kremmer E, Schubel A, et al. Intracellular and Surface Expression of the HIV-1 Coreceptor CXCR4/Fusin on Various Leukocyte Subsets: Rapid Internalization and Recycling Upon Activation. *J Immunol.* 1998;160:1522–31.
64. Gordon S. Pathogen recognition or homeostasis? APC receptor functions in innate immunity. *C R Biol.* 2004;327:603-07.
65. Ho JL, He S, Hu A, et al. Neutrophils from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-seronegative Donors Induce HIV replication from HIV-infected patients' mononuclear cells and cell lines: an in vitro model of HIV Transmission facilitated by *Chlamydia trachomatis*. *J Exp Med.* 1995;181:1493-505.
66. Yoshida T, Jones VC, Kobayashi M, et al. Acceleration of R5 HIV replication by polymorphonuclear neutrophils in cultures of macrophages. *Immunol Cell Biol.* 2007;85:215-99.
67. Demirkhanyan LH, Marin M, Padilla-Parra S, et al. Multifaceted Mechanisms of HIV-1 Entry Inhibition by Human α Defensin. *J Biol Chem.* 2012;287:28821-38.
68. Seidel A, Ye Y, De Armas LR, et al. Cyclic and Acyclic Defensins Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type-1 Replication by Different Mechanisms. *PLoS One.* 2010;5:e9737.
69. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe.* 2012;12:109-16.

II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el año 1981 se describió por primera vez el SIDA, como una enfermedad infecciosa que afecta directa y profundamente al sistema inmune, causando un amplio espectro de manifestaciones clínicas que terminan siendo letales para el individuo (1). Dos años más tarde se identificó al VIH como causante de esta enfermedad (2). Desde entonces, el aumento del número de casos, la altísima mortalidad en ausencia de tratamiento y la falta de una vacuna, hacen que esta sea una de las infecciones más importantes del siglo XXI (3). Actualmente, mediante la TAR combinada se ha logrado controlar la replicación viral, convertido a la infección por VIH en una enfermedad crónica no mortal (4). Sin embargo, con la progresión de la enfermedad, se instaura un estado de inflamación crónica persistente y de hiperactivación del sistema inmune, incluso durante la TAR, que puede ser una causa potencial para el desarrollo de otras patologías asociadas a mortalidad y comorbilidad (4,5).

A pesar de 36 años de investigación intensiva, la comprensión de cómo el VIH socava la capacidad del sistema inmunitario para combatir infecciones comunes es limitada. El deterioro progresivo de la respuesta inmune causado por el VIH, es debido fundamentalmente a la pérdida gradual numérica y funcional de los elementos del sistema inmunitario, especialmente de los LT-CD4+, lo que conlleva al desarrollo del SIDA y a la instauración de infecciones oportunistas, de distintos tipos de neoplasias y a la muerte del paciente (6). Existen evidencias que indican que esta pérdida progresiva de la población de LT-CD4+ es debida a una inapropiada producción a nivel del timo, a la relocalización de los linfocitos virus-específicos en los órganos linfoides y a la alteración en la homeostasis entre la proliferación y muerte celular por apoptosis, siendo este último mecanismo uno de los principales eventos que conduce a la destrucción de las células del sistema inmune y a la progresión hacia la fase de SIDA (7).

El VIH cuenta con diversas estrategias para activar la maquinaria de apoptosis tanto en células infectadas como en las no infectadas, induciendo así la muerte de células efectoras del sistema inmune (4). La contribución de la apoptosis en la progresión de la enfermedad ha sido documentada en varios modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha evidenciado que los individuos progresores lentos muestran una tasa de apoptosis más baja, en comparación con los individuos progresores rápidos y de esta manera, se contribuye al incremento en la susceptibilidad a sufrir infecciones por gérmenes oportunistas (8). Así, la muerte celular acelerada activada por el virus o sus componentes es considerada como clave en la declinación progresiva de las células del sistema inmune, lo que conduce a la

disfunción no sólo de los elementos de la inmunidad adquirida, sino también a una parte importante de componentes de la inmunidad innata (9). Aunque la inmunidad antiviral ha sido clásicamente estudiada en términos de la respuesta inmune adaptativa, existen muchas pruebas que sugieren que la inmunidad innata juega un papel importante desde las etapas tempranas de la infección (10).

Los neutrófilos constituyen la población celular predominante del sistema inmune innato, y tradicionalmente representaron la primera línea de defensa del organismo frente a lesiones e infecciones bacterianas y micóticas (11). Sin embargo, además de esta función, en los últimos años se ha demostrado que los neutrófilos constituyen un componente del circuito regulatorio y efector del sistema inmune innato y adaptativo (12). Estas células abundan en las mucosas oral, genital e intestinal inflamadas y también en los ganglios linfáticos de los pacientes infectados con el VIH, lo que sugiere la importancia del estudio de la relación entre el VIH y los neutrófilos (4). Una mayor comprensión acerca de cómo la infección por VIH impacta en la inmunidad innata, en particular en los neutrófilos, resulta de gran importancia debido a que podría contribuir al desarrollo de nuevas medidas profilácticas y estrategias terapéuticas, que complementen y sinergicen el abordaje terapéutico de esta infección centrado en la restitución de la respuesta adaptativa (9).

Por todo lo mencionado anteriormente, la Hipótesis que se plantea en este Trabajo de Tesis consiste en que los neutrófilos manifiestan un proceso de muerte celular acelerado, mediado por mecanismos dependientes de caspasas, desde estadios iniciales de la infección por VIH y que dicho proceso afecta su funcionalidad. En base a esta hipótesis, el Objetivo General de la presente Tesis ha sido evaluar el efecto de la infección por VIH sobre la muerte celular de los neutrófilos en pacientes asintomáticos y sin TAR.

Este Objetivo General ha sido desglosado a su vez en los siguientes Objetivos Específicos:

- Determinar el nivel de apoptosis de neutrófilos en la infección asintomática por VIH
- Evaluar la expresión de moléculas de superficie en neutrófilos y su relación con la apoptosis
- Analizar la expresión de receptores que participan en la modulación de la apoptosis de neutrófilos
- Evaluar la relación de biomarcadores de inflamación con la apoptosis de los neutrófilos

Para la realización de este Trabajo, se consideraron estudios previos dirigidos a definir el papel de los neutrófilos en la infección por VIH, los que siguen siendo poco concluyentes y con resultados muchas veces contradictorios, lo que indica que esta relación es mucho más compleja que lo esperado previamente (13). Si bien se han reportado alteraciones funcionales y niveles altos de apoptosis de neutrófilos en pacientes con infección por VIH (14,15), la mayoría de los estudios realizados han incluido un número escaso de pacientes infectados, principalmente en etapas avanzadas de la infección, con un sistema inmunológico muy comprometido y con cargas virales muy disímiles (16,17). Así mismo, el uso de metodologías que insumen mucho tiempo y la demora en el procesamiento de las muestras, podrían afectar los resultados y conducir a una mala interpretación en la evaluación de la relación entre neutrófilos y el VIH o sus componentes (18). Es por ello que en este Trabajo de Tesis no se realizaron experimentos *ex vivo* para la evaluación de la apoptosis, expresión de moléculas de superficie y receptores en neutrófilos, así como para el estudio de biomarcadores de activación inmune involucrados. Otro aspecto original de este Trabajo de Tesis consistió en evaluar el impacto de la infección por VIH sobre los neutrófilos de pacientes en los primeros estadios de la infección y rigurosamente seleccionados según los siguientes criterios: infección asintomática, sin previas manifestaciones clínicas o eventos asociados a SIDA, sin coinfección con otros agentes virales, sin TAR al momento de la evaluación y sin compromiso inmunológico o con un compromiso moderado, Además, el amplio número de pacientes infectados por VIH y de donantes seronegativos que se incluyeron, otorgan mayor sustento a los resultados obtenidos.

7. Bibliografía

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1981;305:1425-31.
2. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983; 220:868-71
3. Sterne JA, MayM, Costagliola D, et al. Timing of initiation of antiretroviral therapy in AIDS-free HIV-1-infected patients: a collaborative analysis of 18 HIV cohort studies. *Lancet.* 2009; 373:1352-63.
4. Moir S, Chun W, Fauci A. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6:223-46.
5. Borato DCK, Parabocz GC, Ribas SRW, et al. Changes of metabolic and inflammatory markers in HIV infection: Glucose, lipids, serum Hs-CRP and myeloperoxidase. *Metabolism.* 2012;61:1353-60.
6. Salmen S, Guillermo C, Colmenares M, et al. Papel del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en la apoptosis de leucocitos de pacientes infectados. *Invest Clin.* 2005;46:289-305.
7. Février M, Dorgham K, Rebollo A. CD4+ T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection: Role of apoptosis. *Viruses.* 2011;3(5):586–612.
8. Casado C, Colombo S, Rauch A, et al. Host and viral genetic correlates of clinical definitions of HIV-1 disease progression. *PLoS One.* 2010;5(6):2–7.
9. Borrow P, Shattock RJ, Vyakarnam A. Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. *Retrovirology.* 2010;7:84-101
10. Salmen S, Berrueta L, Montes H. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa ULA.* 2007;1:29-44.
11. Fox S, Leitch A, Duffin R et al. Neutrophil apoptosis: relevance to innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* 2010;2:216-27.
12. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210:1283-1299
13. Casulli S, Elbim C. Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and polymorphonuclear neutrophils. *J Innate Immun.* 2014;6:13-20.

14. Hadad N, Levy R, Schlaeffer F, et al. Direct effect of Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors on neutrophil function and apoptosis via calpain inhibition. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:1515-21.
15. Kuritzkes DR. Neutropenia , Neutrophil Dysfunction and Bacterial Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease: The Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Clin Infect Dis*. 2000;30:256–60.
16. Mastroianni CM, Mengoni F, Lichtner M, et al. Ex vivo and in vitro effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on neutrophil apoptosis. *J Infect Dis*. 2000;182:1536-39.
17. Anita HP, Paras J, Patnaik A. Apoptosis (programmed cell death)- A review. *World J Pharm Res*. 2014;3:1854-72.
18. Baldelli F, Preziosi R, Francisci D, et al. Programmed granulocyte neutrophil death in patients at different stages of HIV infection. *AIDS*. 2000;14:1067-69.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

8. Pacientes y controles

8.1. Grupo de estudio

Estuvo constituido por una muestra de 38 pacientes con infección por VIH asintomática y sin TAR de ambos sexos (23 mujeres y 15 varones) provenientes de la población de pacientes atendidos en el Hospital Rawson de la ciudad de Córdoba. El diagnóstico de la infección por VIH se realizó mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) para detectar anticuerpos y se confirmó con la técnica de Western-Blot (1). El período medio de la seroconversión fue de 12 meses. La inclusión de los pacientes se realizó a través de un muestreo no probabilístico discriminado.

Criterios de Inclusión:

- Individuos con infección por VIH asintomática (serología demostrada o carga viral)
- Edad: \geq a 21 años
- Ambos sexos
- Manifestar su consentimiento por escrito

Criterios de Exclusión:

- Individuos menores de 18 años y mayores de 60 años
- Mujeres embarazadas
- Individuos que manifiesten baja probabilidad de seguimiento y no adherencia a los requerimientos del estudio
- Individuos con coinfecciones asociadas.

En todos los pacientes, un médico infectólogo realizó un examen clínico completo que, junto con el nivel de LT-CD4⁺, permitió determinar el estadio clínico e inmunológico de los pacientes. A partir de las historias clínicas se confeccionó una base de datos donde se registraron las siguientes variables: código de paciente, sexo, edad, tiempo de la seroconversión, el estadio de la infección según la clasificación del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC) para la infección por VIH en adultos (2), valor porcentual y absoluto de LT-CD4⁺ y cuantificación de la carga viral plasmática.

8.2. Grupos Controles

8.2.1. Controles negativos

Como grupo control negativo, se incluyeron a 40 individuos sanos de ambos sexos (20 mujeres y 20 varones) dadores de sangre, de entre 18 y 58 años provenientes del Banco de Sangre del Instituto de Hematología y Hemoterapia de la Universidad Nacional de Córdoba con serología negativa para:

- Hepatitis B: Antígeno de superficie y anticuerpo anticore del virus de la hepatitis B (VHB) (ELISA).
- Hepatitis C: Anticuerpo anti virus de la hepatitis C (VHC) (ELISA)
- HTLV 1 y 2: Anticuerpos anti HTLV (ELISA)
- VIH 1 y 2: Anticuerpos anti VIH 1 y 2 (ELISA)
- Chagas: Anticuerpos anti antígenos citoplasmáticos de *Trypanosoma cruzi*: técnica de hemaglutinación indirecta (HAI) y ELISA.
- Sífilis: Anticuerpos anti cardiolipina (VDRL, del inglés *Venereal Disease Research Laboratory*)
- Brucelosis: Técnica de Huddleson y de Rosa de Bengala

8.2.2. Controles positivos

Se incluyeron 40 pacientes con infección asintomática por el VIH con TAR (13 mujeres y 27 varones, edad: 28 a 58 años) constituido por: dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos asociados a un inhibidor de la integrasa o un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósidos o un inhibidor de la proteasa potenciado. El período medio del TAR fue de 56 meses (1 a 156 meses). Todos los pacientes tenían una carga viral indetectable.

Para la realización de este trabajo de tesis se respetaron las normas provinciales, nacionales e internacionales referidas a la investigación en seres humanos. Los individuos fueron invitados a participar en el estudio de investigación y luego de brindarles la información pertinente fueron incluidos quienes manifestaron su consentimiento por escrito. El estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Niño y del Adulto del Polo Hospitalario (CIEIS) de la ciudad de Córdoba y fue registrado en el Registro Provincial de Investigación en Salud (RePis) con el número de inscripción 1232.

9. Obtención de muestras biológicas

9.1. Suero

Obtenido a partir de sangre entera sin anticoagulante en tubos separadores (Eurotubo). La sangre fue incubada a 37° C y luego de la retracción del coágulo y posterior centrifugación, el suero fue separado, alicuotado y congelado a -70° C.

9.2. Plasma

Obtenido a partir de sangre entera anticoagulada en tubos con gel (BD Vacutainer) y posterior centrifugación.

9.3. Sangre entera

Obtenida por venipuntura en tubos con EDTA-K₃ (DVS).

9.4. Neutrófilos

Para el aislamiento de los neutrófilos de sangre periférica se procedió a su separación del resto de los componentes de la sangre mediante un gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) (3) y posterior sedimentación en Dextrán (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 6%. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) En un tubo de centrifuga de poliestireno graduado de 10 ml, se colocaron 2 mL de Ficoll-Hypaque de densidad 1.077 g/ml y sobre ellos se depositaron cuidadosamente 4 mL de sangre anticoagulada y diluida 1/2 en tampón salino fosfato (PBS) pH: 8.4. Después de centrifugar durante 30 minutos a 2.500 rpm se obtuvieron tres fases (eritrocitos, Ficoll y plasma).
- 2) Se recogió el plasma y se colocó en un tubo de Kahn de poliestireno, se aspiró con una pipeta Pasteur la capa que contiene las células mononucleares - situada entre el plasma diluido y el Ficoll- y se descartó; luego se descartó la capa de Ficoll hasta 1 mm por encima de la capa de neutrófilos situada sobre la capa de los eritrocitos.

- 3) Se agregó 1 mL del plasma, se mezcló y se añadieron 0,4 mL de dextrán 6% (en solución fisiológica); la mezcla se transfirió a tubos de Kahn y se dejó reposar en posición vertical en heladera (4°- 8°C) durante 30 minutos y luego 15 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Se recolectó la capa superior que contiene a los neutrófilos, se resuspendió en PBS y se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos (proceso de lavado). Esta operación se repitió dos veces. Al pellet celular se le realizó una lisis osmótica de los glóbulos rojos contaminantes durante 30 segundos con NaCl 0,2% (4 mL) y la isotonicidad se recuperó con una solución de PBS. Posteriormente, se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 minutos. El pellet de neutrófilos se resuspendió y se lavó dos veces con PBS centrifugando cada vez a 1.500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el sedimento enriquecido en neutrófilos fue resuspendido en 1 mL de PBS.

9.4.1. Recuento y Ensayo de viabilidad de los neutrófilos

En la suspensión celular se determinó la concentración de células con un contador hematológico (Cell Dyn 3200 de Abbott) y se determinó la viabilidad mediante la dilución con Azul Tripán al 0,2% (*Sigma*). Este colorante es capaz de penetrar en las células muertas por tener la membrana plasmática desestructurada, tiñendo de esta forma las células de color azul. Las células vivas y las apoptóticas (que no sufren desestructuración de la membrana plasmática) no se tiñen.

Para el conteo de células viables se mezclaron 10 µl de solución de Azul Tripán y 10 µl de la suspensión de células y se depositaron en un portaobjeto. Se cubrió con un cubreobjetos y la mezcla se observó a 40x en un microscopio óptico (Primo Star, Karl Zeiss®, Alemania). El porcentaje de células vivas se estableció por la capacidad de exclusión del colorante. Sólo se prosiguió el experimento en aquellos casos en que la viabilidad celular fue superior al 95%.

10. Anticuerpos utilizados

Se utilizaron anticuerpos monoclonales antihumanos marcados con distintos fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, *fluorescein isotiocianate*),

ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*), alofococianina (APC, *allophycocyanin*), peridinina-clorofila (PerCP, *peridinin-chlorophyll protein complex*) y Alexa Fluor 488. En la Tabla I se especifican los anticuerpos utilizados.

Tabla I. Anticuerpos monoclonales utilizados en estudios de apoptosis y expresión de moléculas y receptores de superficie de los neutrófilos.

Anticuerpo	Fluorocromo	Tipo, especie, origen	Dilución	Marca Comercial
Anti-CD282	Alexa Flour® 488	Ratón, clon 11G7	Puro	BD Pharmingen™
Anti-CD95	FITC	Ratón, clon DX2	Puro	BD Pharmingen™
Anti-CD11b	APC	Ratón, clon D12	½	BD Bioscience
Anti-CD16	FITC	Ratón, clon 3G8	Puro	Beckman Coulter (IOtest®)
Anti-CD62L	PE	Ratón, clon SK11		Becton & Dickinson
Anti-CD3	FITC	Ratón, Clon SK7	Puro	BD Bioscience
Anti-CD4	APC	Ratón, Clon SK3	Puro	BD Bioscience
Anti-CD8	PE	Ratón, Clon SK1	Puro	BD Bioscience
Anti-CD45	PerCP	Ratón, Clon 2D1	Puro	BD Bioscience
Anti-Caspasa -3 activa	PE	Conejo, clon C92-605	Puro	BD Pharmingen™
Anti-Caspasa -8	----	Ratón, clon 1C12	1/1000	Cell Signaling Technology®
Anti-Caspasa -9	----	Ratón, clon C9	1/1000	Cell Signaling Technology®

11. Hemograma

Fue realizado en sangre entera anticoagulada con EDTA-K₃ con un contador hematológico (Cell Dyn 3200 de Abbott) de 18 parámetros. El conteo leucocitario diferencial fue realizado en extendidos de sangre sobre 200 elementos sanguíneos.

12. Cuantificación de LT-CD4⁺ y LT-CD8⁺

Se realizó en sangre entera anticoagulada con EDTA-K₃ con marcación con 4 fluorocromos BD multitest con tubos Trucount CD3/CD8/CD45/CD4 (FITC, PE,

PerCP, APC, respectivamente) en plataforma única en un citómetro de flujo Facscalibur (Becton Dickinson) con software MultiSET V2.2.

13. Carga viral para VIH

La cuantificación del ácido ribonucleico (ARN) del VIH-1 fue realizada en plasma por la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) cuantitativa en tiempo real (COBAS TaqMan HIV-1 test, versión 2.0, ROCHE) con un límite de detección de 34 copias/mL.

14. Evaluación del proceso de muerte celular por apoptosis

Para demostrar la muerte celular por apoptosis es necesario el uso de técnicas complementarias y no relacionadas ya que ninguna puede hacerlo por sí sola. Es por ello que es conveniente utilizar técnicas que se basen tanto en las características bioquímicas como morfológicas ya que la apoptosis es un proceso secuencial (4).

14.1. Estudios citomorfológicos

14.1.1. Microscopía óptica

La apoptosis de neutrófilos se evaluó en sangre entera anticoagulada y en células aisladas y adheridas al vidrio. Para evaluar apoptosis en sangre entera, se realizaron extensiones de la sangre en portaobjetos y para células aisladas, las mismas se concentraron utilizando una cámara citospin colocando en la misma un volumen de suspensión de células en PBS correspondiente a 2×10^5 células. Luego de 5 minutos, se retiró la cámara y se dejó secar. En ambos casos, se realizó una coloración con May-Grünwald por 3 min, agua por 1 min y solución de Giemsa 1/50 por 5 minutos. Las improntas se observaron en microscopio de luz visible con un aumento de 100x (Primo Star, Karl Zeiss®, Alemania) y las células apoptóticas fueron

definidas por la presencia de núcleo condensado y pérdida simultánea del aspecto polisegmentado del mismo.

El porcentaje de células apoptóticas se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{Apoptosis} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células con núcleos apoptóticos}}{\text{N}^\circ \text{ total de células}} \times 100$$

14.1.2. Microscopía fluorescente

El Naranja de Acridina (5) es un fluorocromo que se intercala en la doble hélice de ADN y se puede utilizar para identificar células que han entrado en apoptosis. Como no permite la diferenciación entre células viables y no viables, se utilizó el Ioduro de Propidio (IP), un colorante vital, que es excluido de las células viables. El IP se utiliza como marcador de las fases tardías de apoptosis/necrosis porque es capaz de atravesar las membranas de las células en condiciones propias de esas etapas e interacciona con el ADN nuclear.

Con esta coloración los núcleos de las células viables aparecen como verdes fluorescentes mientras que los núcleos de las células muertas aparecen teñidos de naranja (6).

Para llevar a cabo esta evaluación, se tomó el volumen de suspensión de células en PBS correspondiente a 5×10^5 células y se llevó a volumen final de 1 ml con PBS. De esta dilución se tomaron 25 μl y en un tubo de poliestireno se agregó 1 μl de mezcla 1:1 de Ioduro de Propidio (100 $\mu\text{g/ml}$ en PBS, Sigma) y Naranja de Acridina (100 $\mu\text{g/ml}$ en PBS, Sigma) y se dejó a temperatura ambiente en oscuridad durante 5 minutos. En un portaobjeto, se colocaron 10 μL de esta mezcla, se colocó un cubre objetos y se observó en microscopio de fluorescencia (Modelo BX50F4, Olympus®. Japón), contando al menos 200 células.

La interpretación fue la siguiente:

- Células viables normales (VN): núcleo verde brillante con estructura organizada, citoplasma verde y granularidad naranja fina
- Células no viables muertas por necrosis (NVN): núcleo naranja con estructura organizada y citoplasma naranja tenue
- Células viables apoptóticas (VA): núcleo verde intenso condensado o fragmentado

- Células no viables apoptóticas (NVA): núcleo naranja intenso condensado o fragmentado

Para el cálculo de los porcentajes correspondientes se aplicaron las siguientes fórmulas (4) :

Porcentaje de células apoptóticas:

$$\frac{VA+NVA}{VN+VA+NVN+NVA} \times 100$$

Porcentaje células necróticas:

$$\frac{NVN}{VN+VA+NVN+NVA} \times 100$$

Porcentaje de células muertas:

$$\frac{NVN+NVA}{VN+VA+NVN+NVA} \times 100$$

14.2. Estudios bioquímicos

14.2.1. Estudio mediante Citometría de flujo

Un paso crítico en el proceso de apoptosis es la adquisición de cambios en la superficie celular. En las células normales la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica: la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina (PS), y la externa fundamentalmente fosfolípidos neutros. La translocación o externalización de la PS es un evento temprano en la apoptosis y ocurre aun cuando la membrana celular se encuentra intacta y la célula excluye la entrada de colorantes vitales.

La Anexina V es una proteína de 35-36 kDa que se une con alta afinidad a la PS en presencia de Ca^{2+} , lo que posibilita identificar células apoptóticas mediante la incubación de las células con Anexina V unida a ficoeritrina (PE). De esta manera se puede detectar apoptosis en estadios más tempranos que otros ensayos basados en cambios que experimenta el núcleo de la célula, como la fragmentación del ADN, y se evidencia antes que se produzca la pérdida de la integridad de la membrana en las etapas finales de muerte de la célula, ya sea por apoptosis o necrosis (4).

La pérdida de la integridad estructural de la membrana plasmática, característica distintiva de la necrosis, representa la etapa final en la que una célula no puede mantener su identidad independiente de la del entorno. Bioquímicamente, puede manifestarse por entrada a la célula de colorantes vitales como 7-amino-actinomicina (7-AAD).

Por lo tanto, mediante este doble marcaje se puede determinar por citometría de flujo (Figura 8):

- células viables: Anexina V⁻ / 7-AAD⁻
- células en apoptosis temprana: Anexina V⁺ / 7-AAD⁻
- células en apoptosis tardía: Anexina V⁺/7-AAD⁺
- células necróticas: Anexina V⁻ / 7-AAD⁺

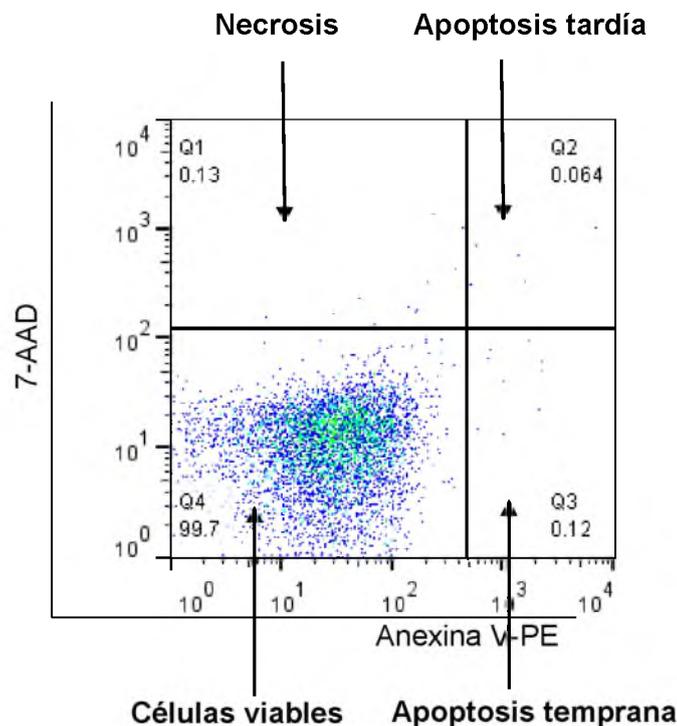


Figura 8. Ejemplo de diagrama de puntos del marcaje simultáneo con Anexina V-PE (eje X) y 7AAD (eje Y). Las células positivas con Anexina V y negativas con 7-AAD se consideraron apoptóticas tempranas. La emisión de luz de excitación fue realizada a 488 nm con un láser de argón. La señal de PE se detectó a 585 nm y el log de esta fluorescencia se representó en el eje X. La señal del 7-AAD se detectó a 670 nm y el log de esta se representó en el eje Y.

Para detectar la apoptosis se utilizó un equipo comercial (BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA) en el cual la Anexina V esta conjugada con PE. La detección de

apoptosis se realizó en neutrófilos aislados y en sangre entera siguiendo las recomendaciones del fabricante.

14.2.1.1. Método en neutrófilos aislados

Dado que la unión de la Anexina V a la PS es dependiente de calcio, se lavaron 1×10^6 células con PBS frío y se resuspendieron en 1.000 μL de una solución reguladora de unión rica en calcio (Bb, del inglés *Binding buffer*) constituido por: 0,1 M HEPES/NaOH (pH = 7,4), 1,4 M NaCl, 25 mM CaCl_2 y diluido 1/10 en agua destilada. A continuación se realizó el marcaje de las muestras:

- 1) De la suspensión de células en Bb, se colocó el volumen correspondiente a 1×10^5 células en tubo de poliestireno, apto para citometría de flujo, y se marcó con 3 μL de Anexina V-PE, 3 μL de 7-AAD y 4 μL de CD11b-APC
- 2) La suspensión de células se agitó suavemente con un vórtex y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 3) La suspensión de células se llevó a volumen final de 100 μL con Bb y se analizó por citometría de flujo dentro de la hora.

14.2.1.2. Método en sangre entera

Se lisaron 300 μL de sangre entera anticoagulada con EDTA- K_3 con 3 mL de solución de lisis de NH_4Cl (NH_4Cl 8,29 g, KHCO_3 1,00 g, EDTA- Na_2 37mg, llevando a volumen final de 100 mL con H_2O destilada, pH 7,4) durante 15 minutos, rotando suavemente. Luego de centrifugar 5 minutos a 1.500 rpm, se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 1 mL de PBS frío centrifugando nuevamente 5 minutos a 1.500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 500 μL Bb 1x (dil. 1/10 buffer 10X). El marcaje de las células se realizó como se describe a continuación:

- 1) Se colocaron 100 μL del lisado en tubo de poliestireno, apto para citometría de flujo, y se marcó con 3 μL de Anexina V-PE, 3 μL de 7-AAD y 4 μL de CD11b-APC
- 2) La suspensión de células se agitó suavemente con un vórtex y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 3) Se analizó por citometría de flujo dentro de la hora.

El control positivo de apoptosis se obtuvo mediante la incubación, por triplicado, de muestras de sangre anticoagulada provenientes de controles sanos durante 24 h

a 4° C y posteriormente por 3 h a 42° C. Luego de estos períodos de incubación, se realizaron frotis y se colorearon con May-Grünwald Giemsa.

En ambos métodos se realizaron controles de células sin marcar, células con monomarca de cada monoclonal, células incubadas con anticuerpos monoclonales irrelevantes del mismo isotipo conjugados con los fluorocromos correspondientes y células control positivo de apoptosis. Se adquirieron 100.000 eventos en cada muestra en un citómetro de flujo *FACScan Canto II Becton Dickinson* equipado con un láser de argón de Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI) del Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC).

La población de neutrófilos fue identificada por sus propiedades físicas: tamaño celular (FSC, del inglés *Forward Scatter*) (eje Y) y granularidad o complejidad citoplasmática (SSC, del inglés *Side Scatter*) confirmada marcando la región alrededor de la población CD11b⁺-APC (eje X) (Figura 9).

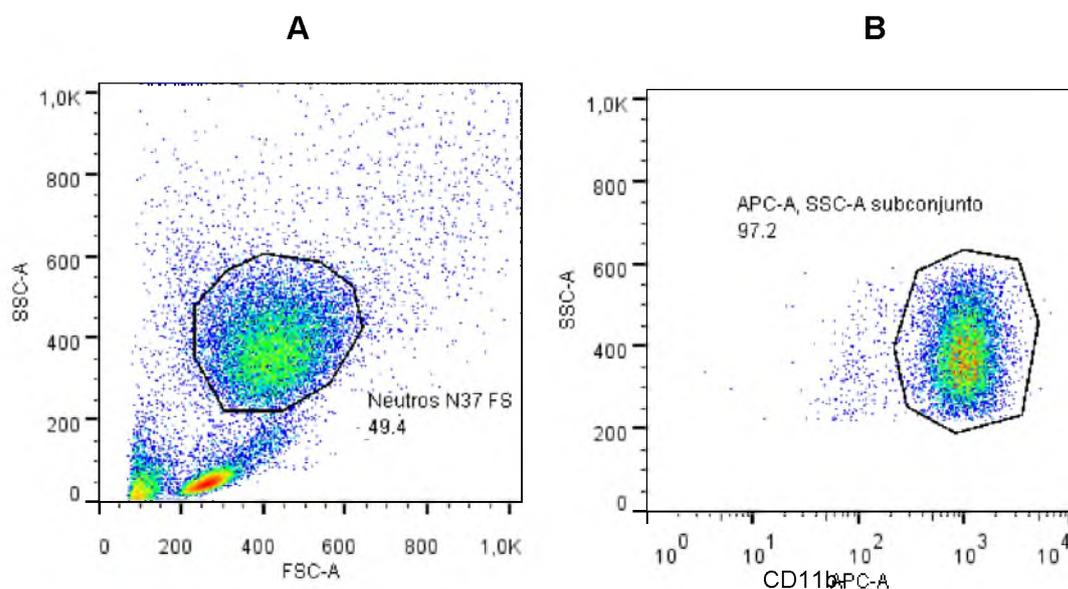


Figura 9. Selección de la población de neutrófilos mediante citometría de flujo de una muestra de sangre total de un individuo control sano. A) En el primer paso, los neutrófilos fueron identificados por sus propiedades físicas, B) En el segundo paso, la población de neutrófilos fue confirmada con CD11b.

De la población de neutrófilos así seleccionada (20.000 a 50.000 eventos) se evaluó el nivel de apoptosis mediante la detección de anexina V-PE (con un filtro de excitación para 585 nm y otro de emisión de 578 nm) y de 7-AAD (con un filtro de excitación para 670 nm y otro de emisión de 675 nm). Para cuantificar la apoptosis

de los neutrófilos, se determinó el porcentaje de células marcadas positivas para Anexina V-PE y la intensidad media de fluorescencia (IMF). El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo 5.7.2 (Tree Star, Inc).

14.2.2. Extracción de ADN

Durante la apoptosis se activan específicamente caspasas que hidrolizan y activan endonucleasas. Estas endonucleasas degradan el ADN en fragmentos oligonucleosomales que son múltiplo de aproximadamente 200 pares de bases que es la distancia internucleosomal. Esto genera fragmentos de pequeño tamaño de ADN que pueden ser extraídos de las células apoptóticas mediante una solución de extracción que contiene buffer citrato y detergente. Debido a la extracción de parte del ADN en las células apoptóticas, éstas presentan un menor contenido de ADN (hipodiploide) en comparación con el contenido de las células viables (diploide).

Para la extracción y purificación del ADN se utilizaron distintos métodos:

- Con Fenol/Cloroformo: 10^7 neutrófilos fueron lisados con un buffer de lisis hipotónico (10 mM EDTA, 0,2% Tritón-X100, 10 mM Tris a pH: 7,5.) por 10 minutos y en hielo. Luego, se centrifugó por 10 minutos a 13.000 r.p.m. a 4°C. Finalmente, la extracción de ADN fue realizada con una mezcla de Fenol (USB Corporation, Estados Unidos) y Cloroformo (Laboratorios Cicarelli, Argentina) y precipitación con Etanol 70% (Laboratorios Cicarelli, Argentina) (7).
- Con Wizard® DNA Purification Kit (Cat. #A1120, Promega): 150 µL de la suspensión de neutrófilos se lisaron con solución de lisis celular y nuclear (*Cell Lysis Solution* y *Nuclei Lysis Solution*). Luego, se centrifugó la muestra y se descartó el sobrenadante. Para la extracción del ADN se utilizaron distintas soluciones provistas por el fabricante: solución ARNasa (*RNAse Solution*), solución de precipitación de proteínas (*Protein Precipitation Solution*) con posteriores centrifugaciones breves a 13.000 r.p.m. y para la precipitación del mismo se utilizó Isopropanol y Etanol 70%. Por último, el ADN extraído se resuspendió en solución de rehidratación del ADN (*DNA Rehydration Solution*) (8)

Para la cuantificación del ADN extraído se midió la absorbancia a 260nm, ya que esa longitud de onda se puede determinar la concentración del mismo (relación 1

DO = 50 µg/ml) (7). La medición se realizó a partir de una dilución 1/25 de la suspensión de ADN con agua destilada y en cubeta de cuarzo de 1mL (con un paso óptico de 0,5mm) en un espectrofotómetro UV (Hach DR5000, Estados Unidos).

Una vez cuantificado el ADN, se procedió a su separación electroforética en un gel de agarosa (8) (Invitogten UltraPore®, España) al 1,8% en buffer TAE al cual se le adicionaron 2,5 µL de Bromuro de Etidio calidad biología molecular (10mg/mL, Promega™). Se realizó la corrida electroforética de forma horizontal tomando 4 µL de la muestra de ADN y 1µL de solución de azul de bromofenol 2X (65% Sucrosa, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8, 0,3% Azul de Bromofenol). Se migró a 100 V, durante 30 minutos con fuente de poder BioRad® (PowerPac Basic™). En la corrida electroforética se utilizaron marcadores de peso molecular (MPM) de 100 y de 1000 pb (PB-L, Productos Bio-Lógicos®, Argentina), muestras control de ADN y como control de apoptosis se utilizó una muestra de neutrófilos a los que se les indujo la apoptosis por cambios de temperatura. El gel fue observado en transluminador UV (Modelo M20, UVP®, Estados Unidos).

14.2.3. Determinación de Caspasas

Las caspasas son cisteína proteasas que juegan un rol central en la regulación y ejecución de la muerte celular por apoptosis (10). La caspasa -8 es la principal caspasa iniciadora del proceso apoptótico mediado por la vía extrínseca mientras que la caspasa -9, es la iniciadora cuando la apoptosis ocurre por la vía intrínseca. La caspasa -3 es la caspasa efectora de la apoptosis por las dos vías y es sintetizada como una proenzima inactiva que se activa al clivarse en los estadios tempranos de la apoptosis.

14.2.3.1. Ensayo de la actividad de Caspasa -8 y Caspasa -9

A fines de evaluar las vías de activación de la apoptosis, se procedió a detectar la activación de Caspasa -8 (vía extrínseca) y Caspasa -9 (vía intrínseca) por Western blot (11,12). Para la obtención de los extractos proteicos, las muestras fueron preparadas a partir de 1×10^6 neutrófilos colocados en un tubo eppendorf con 100 µL de buffer Laemmli 1X a partir de 5X preparado con 4 mL de 1,5 M Tris-Cl pH 6,8, 10 mL de glicerol, 5 mL β-mercaptoetanol, 2 g SDS y 1 mL de azul de bromofenol 1%; se alicuotó y conservó a -20°C) (13). La suspensión celular fue incubada durante 5

minutos en baño de agua hirviendo y luego se enfrió en baño de hielo por 10 minutos. Finalmente, las suspensiones se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante correspondió al extracto proteico total.

La concentración de proteínas de las muestras se cuantificó utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad). La absorbancia se midió a 595 nm en el lector de placas MultiPlate Reader (Bio-Rad). Para la cuantificación de proteínas se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine serum albumin*) (500 µg/mL)

Una vez cuantificadas las proteínas, se procedió a su separación mediante electroforesis SDS-PAGE, técnica que separa las proteínas en función de su peso molecular y carga. La separación de proteínas se realizó en geles de acrilamida:bisacrilamida (29:1): gel concentrador (*stacking gel*) 5%(pH: 6,8) y gel resolutivo (*separating gel*) 10% (pH: 8,8); una vez preparados se les agregó APS (persulfato de amonio) 10% y N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED). Las muestras en tampón Laemmli se calentaron a 95°C durante 5 minutos, posteriormente se sembró el volumen correspondiente a 70 µg de proteínas totales y se separaron aplicando una diferencia de potencial de 100 V. Para monitorizar el progreso de la electroforesis, se utilizó azul de bromofenol. Una vez concluida la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 10 cm x 10 cm (Tecnolab S.A., tamaño de poro 0,45 µm) embebidas previamente en tampón de transferencia, en un equipo de transferencia (Bio-Rad) a temperatura ambiente durante 60 minutos a 100 V. La evaluación de la transferencia se realizó con Rojo Ponceau. Seguidamente las membranas se bloquearon con una solución de bloqueo compuesta por leche en polvo descremada al 5 % (p/v) disuelta en PBS pH: 7,4 con 0,05 % de Tween-20 (v/v) durante una hora de temperatura ambiente y posteriormente se lavaron tres veces con TBS/Tween20 (TBST). A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anticaspasa -8 o anticaspasa -9 en una dilución 1:1000 en solución de bloqueo, a temperatura ambiente durante 60 minutos en agitador de balanceo. Luego de realizar tres lavados con TBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1/2000 en solución de bloqueo, durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitador. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBST y la detección se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL con el kit de Amersham Pharmacia "ECLTM Western Blotting Deteccion Reagents" y la impresión se realizó

en una película de autorradiografía (Agfa Curix RP2 Plus), que se reveló en el equipo *Agfa Curix 60*.

14.2.3.2. Ensayo de Caspasa -3 activa

El análisis de la caspasa -3 activa fue realizado con un equipo comercial PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen™). El ensayo se basa en que las formas procesadas de caspasas comprenden subunidades grandes (17-22 kDa) y pequeñas (10-12 kDa) que se asocian para formar una enzima activa. La caspasa-3 activa es un marcador de células en apoptosis y es caracterizado como un heterodímero de subunidades de 17 y 12 kDa derivado de la proenzima de 32 kDa. El anticuerpo utilizado en el equipo reconoce específicamente la forma activa de caspasa-3 en células humanas y de ratón.

Para el ensayo de caspasa-3 activa, se siguieron las recomendaciones del fabricante. Brevemente, se lavaron 1×10^6 células con PBS frío, se fijaron y permeabilizaron usando la solución para permeabilización y fijación (*Cytofix/Cytoperm Fixation and Permeabilization*) durante 20 minutos en hielo. Posteriormente, se aspiró y se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con el buffer de lavado (*Perm/Wash*). Seguidamente, las células fueron marcadas con el anticuerpo anticaspasa -3 activa-PE, que reconoce específicamente la forma activa de caspasa -3 en células humanas y de ratón, incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron y se resuspendieron en buffer "Perm/Wash". Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo *FACScan Canto II Becton Dickinson*, adquiriendo 50.000 eventos. El análisis de los datos se realizó utilizando el software FlowJo 5.7.2 (Tree Star, Inc). La Figura 10 muestra un histograma de Caspasa -3 activa en neutrófilos sin marcar (control negativo) y neutrófilos sometidos a apoptosis por cambios de temperatura (control positivo de apoptosis)

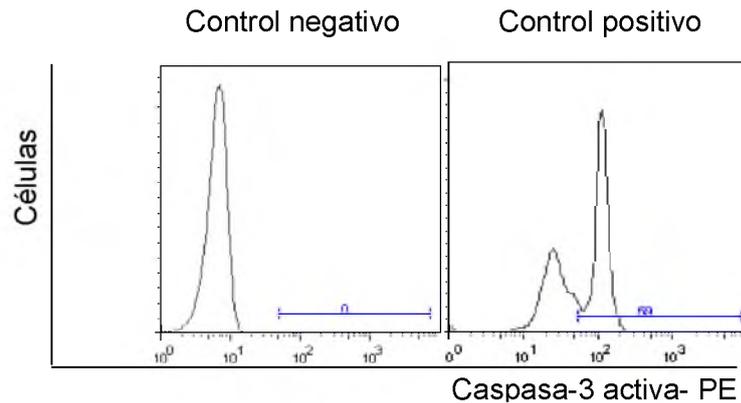


Figura 10. Determinación de Caspasa -3 Activa. Los parámetros se representan en escala lineal para el número de células y escala logarítmica para Caspasa -3 Activa- PE. Se señala el porcentaje de neutrófilos con marcación positiva para Caspasa -3 Activa-PE.

15. Expresión de moléculas y receptores en la superficie de neutrófilos

Para determinar el efecto de la infección con VIH sobre la expresión de moléculas y receptores de superficie en los neutrófilos, se determinaron los niveles de:

- **CD11b:** Es un miembro de la familia de las integrinas que forma un heterodimero glicoproteico con la subunidad β (CD18). Esta integrina es el receptor 3 del complemento y regula la adhesión de leucocitos a células endoteliales y su migración para mediar una respuesta inflamatoria (14).
- **CD62L:** Es una molécula de adhesión celular que pertenece a la familia de las selectinas y que interviene en la adhesión inicial de leucocitos al endotelio vascular (15).
- **CD16:** Corresponde a una molécula perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas e involucrada en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. CD16 es el receptor de baja afinidad para la porción Fc de algunas inmunoglobulinas G, Fc γ RIII (16).
- **CD282:** Los receptores TLR desempeñan un rol central en el reconocimiento de patógenos y en la activación de la respuesta inmune innata. Los neutrófilos expresan, entre otros, el TLR2, también conocido como CD282. Su activación regula importantes funciones del neutrófilo, como adhesión, generación de

ROS, liberación de quimiocinas y activación de señalización proinflamatoria (17).

- **CD95**: Es una proteína transmembrana de 45 kDa, miembro de la superfamilia de receptores TNF. También conocido como Fas/Apo1, es un receptor que media la apoptosis cuando es activado por anticuerpos agonistas o el ligando Fas (FasL) (18) .

La expresión de las moléculas y receptores de superficie en neutrófilos fue determinada por citometría de flujo en controles sanos, pacientes VIH sin TAR y pacientes VIH con TAR a partir de muestras de sangre entera. Para la marcación de CD11b, CD62L y CD95 se procedió como se indica a continuación:

- 1) En tubo de poliestireno apto para citometría de flujo, se colocaron 4 μ L de anticuerpo anti CD11b-APC, 3 μ L de anticuerpo anti CD62L-PE y 3 μ L de anticuerpo anti CD95-FITC.
- 2) Se agregaron 25 μ L de sangre entera anticoagulada y 25 μ L de solución de lisis de NH_4Cl . Se agitó suavemente con un vórtex y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 3) Se agregaron 500 μ L de solución de lisis de NH_4Cl y se colocaron los tubos en freezer a -20°C , durante 5 minutos. Finalmente se agregaron 200 μ L de PBS.
- 4) Se analizó por citometría de flujo dentro de la hora.

Para la marcación de TLR2 en sangre entera, se procedió de la manera anterior, pero utilizando 3 μ L de anti CD282- Alexa-fluo®488 y 4 μ L de anticuerpo anti CD11b-APC.

Para evaluar la relación entre apoptosis y expresión de moléculas de superficie, se realizó triple marcación con Anexina V-PE/7-AAD/CD11b-APC; Anexina V-PE/7-AAD/CD16 FITC en muestras de sangre entera y en neutrófilos aislados. La adquisición de eventos se realizó en un citómetro de flujo *FACScan Canto II Becton Dickinson* del CIBICI- Facultad de Ciencias Químicas, UNC. La población de PMN fue seleccionada de acuerdo al tamaño (FSC) y complejidad (SSC) de las células, incluyendo 20.000- 50.000 células. El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante el software FlowJo 5.7.2 (Tree Star, Inc), analizando el porcentaje de neutrófilos que expresaron las moléculas de superficie y la IMF de expresión.

16. Mediadores solubles

La concentración sérica de Proteína C Reactiva de alta sensibilidad (PCR-as) se midió por inmunoturbidimetría (analyzer automatizado ADVIA 1200 - Siemens).

Las concentraciones séricas de IL-6 y TNF fueron cuantificadas por la técnica de ELISA utilizando los respectivos equipos comerciales (BD OptEIA). En todas las determinaciones se siguieron las instrucciones del fabricante. Las lecturas se obtuvieron a 450 nm dentro de los 30 minutos de finalizado el ensayo, en un lector de ELISA (Microplate Reader 450, BioRad) y la concentración de citocinas fue calculada utilizando la curva de testigos realizada con la correspondiente citocina partiendo de concentraciones conocidas de las mismas.

17. Análisis estadístico

El análisis univariado descriptivo de las variables continuas incluyó la media, la mediana, la desviación estándar, el coeficiente de variación, el error estándar, el rango intercuartílico (RIC) y los valores mínimos y máximos. Los coeficientes de correlación lineal se estimaron por el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman. La asunción de distribución normal para las variables continuas se comprobó mediante pruebas gráficas y la prueba de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de la significación de Lilliefors. Cuando se asumió normalidad se utilizó la prueba *t* de Student para comparar las medias de las variables cuantitativas. En caso de no aceptarse la hipótesis de normalidad de la variable cuantitativa se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa MedCalc version 16.8. La significación estadística se ajustó a $p < 0,05$.

El análisis multivariado se realizó mediante un análisis de regresión logística buscando el mejor modelo para obtener una medida ajustada del efecto del estado inmunológico y virológico sobre el riesgo de niveles elevados de mediadores solubles de la inflamación. Los datos fueron analizados por el programa R Development Cores Team (2008).

18. Bibliografía

1. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981;112:195-203.
2. Selik RM, Mokotoff ED, Branson B, et al. Revised Surveillance Case Definition for HIV Infection - United States, 2014. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR. Recommendations and Reports.* 2014; 63:1–10
3. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest.* 1968; 97:77-89.
4. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differentiation.* 2009; 16:1093-1107.
5. Ribble D, Goldstein NB, Norris D, et al. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol.* 2005;5:12.
6. Mascotti K, McCullough J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion.* 2000; 40:693-96.
7. Rada A, Taboada G. Métodos de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. *Biofarbo.* 1998; 6:63-7.
8. Promega. Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Promega Corp Web site. 2014;50.
9. Chandna S. Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death. *Cytom Part A.* 2004; 61:127-33.
10. Vaculova A, Zhivotovsky B. Chapter Eight Caspases: Determination of Their Activities in Apoptotic Cells. *Methods Enzymol.* 2008; 442:157-81.
11. Western Blotting Protocol | CST Cell Signaling Technology. <https://www.cellsignal.com/common/content/content.jsp?id=western>
12. BioRad. General Protocol for Western Blotting. *Boletín 6376.* 2016; 20:7-8.
13. Roland JT. Laemmli Sample Buffer - 20 ml. www.Cytographica.com. 2007.
14. Jablonowska E, Wojcik K, Nocun M. The influence of treatment with pegylated interferon-alfa and ribavirin on neutrophil function and death in patients with HIV/HCV coinfection. *Viral Immunol.* 2012; 25:166-72.
15. Vassena L, Giuliani E, Koppensteiner H, et al. HIV-1 and Vpu Interfere with L-

- Selectin (CD62L) cell surface Expression To Inhibit Adhesion and Signaling in Infected CD4+ T Lymphocytes. *Journal of Virology*. 2015; 89:5687-700.
16. Bangani N, Nakiwala J, Martineau AR, et al. HIV-1 Infection Impairs CD16 and CD35 Mediated Opsonophagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by Human Neutrophils. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016; 73:263-7.
 17. Sabroe I, Dower SK, Whyte MKB. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. *Clin Infect Dis*. 2005; 41:421-26.
 18. Salmen S, Teran G, Borges L et al. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*. 2004; 137:166-72.

IV. RESULTADOS

19. Características de los individuos en estudio

En el grupo de estudio se incluyeron a 38 pacientes con infección asintomática por VIH sin TAR al momento de la evaluación. Previamente, ninguno presentó manifestaciones clínicas o eventos asociados a SIDA, ni coinfección con otros agentes virales. Los pacientes fueron categorizados según el sistema de clasificación del CDC 2014 en:

22 pacientes con infección por VIH, etapa 1

- Confirmación de laboratorio de infección por VIH sin afección de SIDA definida, y
- recuento de LT-CD4⁺ de ≥ 500 células/ μ l o
- porcentaje de LT-CD4⁺ del total de linfocitos ≥ 26 %.

16 pacientes con infección por VIH, etapa 2

- Confirmación de laboratorio de infección por VIH sin afección de SIDA definida, y
- recuento de LT-CD4⁺ de 200 a 499 células/ μ l o
- porcentaje de LT-CD4⁺ del total de linfocitos entre 14 % y 25 %.

Como grupo control de la infección, se incluyeron a 40 pacientes VIH seropositivos con TAR. Estos pacientes fueron categorizados según el sistema de clasificación del CDC 2014 en:

18 pacientes con infección por VIH etapa 1 y 22 pacientes con infección por VIH, etapa 2

Como grupo control sano se incluyeron a 40 individuos VIH negativos de ambos sexos donantes de sangre, a quienes se les realizaron las pruebas serológicas para: VIH, hepatitis B, hepatitis C, HTLV 1 y 2, chagas, sífilis y brucelosis, siendo todas negativas o no reactivas.

Las características de los distintos grupos incluidos se muestran en la Tabla II.

Tabla II. Características de controles sanos y pacientes con infección por VIH asintomáticos sin y con TAR.

	Control sano	Pacientes VIH sin TAR	Pacientes VIH con TAR
Edad	33 (26-43)	36 (28-46)	43 (33-48)
Mujeres (n)	20	23	13
Varones (n)	20	15	27
Detección de la infección (meses)	-----	12 (4-24)	58 (26-114) *
Inicio del tratamiento (meses)	-----	-----	36 (18-34)
Linfocitos (%)	52 (35-58)	24 (18-34)	26 (19-31)
TCD4+ (μ l)	734 (512-1230)	538 (414-659)	485 (356-627)
Linfocitos (%)	29 (22-34)	49 (42-56)	51 (38-67)
TCD8+ (μ l)	498 (359-521)	1101 (752-1499)	775 (637-1444)
Relación CD4+/CD8+	1,74 (1,57-1,72)	0,52 (0,34-0,73)	0,49 (0,31-0,82)
Carga Viral (copias/ml)	-----	11.725 (4936-36.012)	50 (10-52) *
Carga Viral (\log_{10} VIH ARN)	-----	4,0 (3,7-4,6)	< 1,7 *

Valores expresados en mediana (rango intercuartilo).

* $p < 0,001$ respecto a pacientes sin TAR obtenido mediante la prueba de Mann-Whitney.

20. Evaluación del nivel de apoptosis de neutrófilos

20.1. Transloción de la fosfatidilserina por citometría de flujo

Los primeros estudios realizados consistieron en determinar el nivel de apoptosis de los neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR respecto al de los grupos controles. En los estudios de citometría de flujo, los neutrófilos se seleccionaron mediante una estrategia que combinó características citomorfológicas y la expresión del antígeno de superficie CD11b. El nivel de apoptosis se midió por tinción con Anexina V-PE y 7-AAD por citometría de flujo. Esta metodología permitió analizar: a) los cambios morfológicos que experimentan las células en apoptosis según las variaciones de tamaño (FSC) y granularidad o complejidad citoplasmática

(SSC) y b) las alteraciones de la membrana, como la pérdida de la asimetría por exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular, detectada por Anexina V-PE, y c) la ruptura de la membrana celular detectada por incorporación de 7-AAD en las células dañadas o muertas.

La evaluación del nivel de apoptosis de los neutrófilos de pacientes y controles se realizó en paralelo con un control positivo de apoptosis inducida por cambios de temperatura en muestras de sangre entera anticoagulada. Las condiciones que permitieron lograr un mayor nivel de apoptosis se muestran en la Tabla III. En base a estos resultados, se decidió incorporar como control positivo de apoptosis a muestras de sangre entera anticoagulada sometida a 4° C durante 24 hs y posteriormente a 42° C durante 3 hs.

Tabla III. Condiciones para inducir apoptosis de neutrófilos de sangre entera anticoagulada.

Condiciones	% de apoptosis
42° C – 4 hs	17,40 ± 2,80
4° C – 24 hs	13,80 ± 2,90
4° C – 24 hs + 42° C – 3 hs	49,0 ± 3,40

El nivel de apoptosis total de neutrófilos de sangre circulante de pacientes VIH seropositivos sin TAR ($8,73 \pm 2,15$ %) fue significativamente mayor al detectado en neutrófilos de los grupos controles (pacientes con TAR: $5,11 \pm 2,13$ % y controles sanos: $0,97 \pm 1,02$ %, $p < 0,05$) (Figura 11). Al comparar los niveles de apoptosis obtenidos en muestras de sangre entera y en neutrófilos aislados no hubo diferencias significativas.

Cuando se consideró la cantidad de AnexinaV-PE unida a los neutrófilos (como intensidad media de fluorescencia) se determinó que en pacientes VIH seropositivos sin TAR hubo un aumento significativo de la translocación de fosfatidilserina en relación a pacientes con infección por VIH con TAR y controles no infectados (Figura12).

Cuando se evaluó el nivel de apoptosis de los neutrófilos en las distintas etapas de este proceso de muerte celular, se determinó un aumento significativo de la apoptosis temprana de los neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR respecto a los grupos controles (Tabla IV).

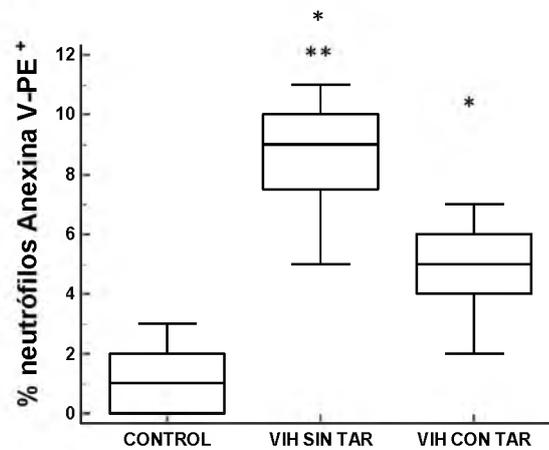


Figura 11. Porcentaje de apoptosis de neutrófilos de pacientes VIH seropositivos y controles sanos. Las cajas representan la mediana y los rangos intercuartilo y las barras de error, los valores mínimo y máximo * $p < 0,0001$ respecto a controles sanos; ** $p < 0,05$ respecto pacientes VIH con TAR. Valores de p obtenidos con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Test de comparación múltiple de Dunn)

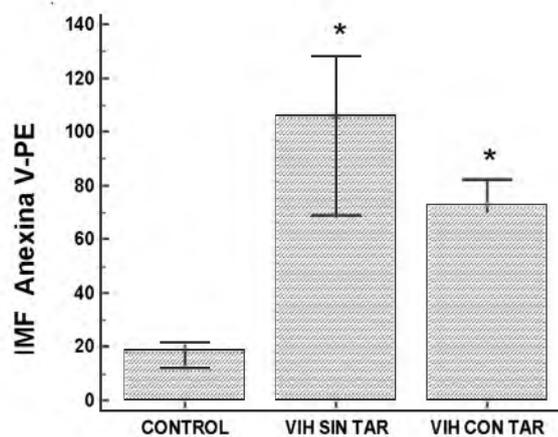


Figura 12. Intensidad Media de Fluorescencia de Anexina V-PE en neutrófilos de pacientes sin y con TAR y controles no infectados. Valores expresados como mediana y rangos intercuartilo. * $p < 0,0001$ respecto a controles obtenida con la prueba Mann-Whitney.

Tabla IV. Nivel de apoptosis de neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR y controles, en las distintas etapas del proceso de muerte.

Anexina-V /TAAD	Control Sano	VIH sin TAR	VIH con TAR	Control de apoptosis
Viables	97,87% ± 1,71	89,18% ± 1,66*	92,25% ± 3,29	53,67% ± 0,58
Apoptosis temprana	0,55% ± 0,62	5,63% ± 1,57*	1,75% ± 1,38*	37,25% ± 3,77
Apoptosis tardía	0,42% ± 0,62	3,09% ± 1,30*	3,35% ± 1,61	7,00% ± 4,36
Necrosis	1,03% ± 1,17	2,09% ± 1,14	2,61% ± 1,52	2,33% ± 0,58

Valores expresados como media ± DS. * $p < 0.01$ respecto a control sano obtenido mediante la prueba t de Student.

20.2. Estudios citomorfológicos

Para caracterizar el efecto de la infección por VIH se analizaron, además de la translocación de fosfatidilserina, parámetros morfológicos característicos de la apoptosis. En todos los casos se corroboró la muerte celular por apoptosis examinando las características citomorfológicas utilizando la microscopía óptica mediante coloración con May-Grünwald Giemsa y la microscopía fluorescente utilizando el doble marcaje con naranja de acridina-ioduro de propidio (Figura 13).

Mediante un análisis de correlación se estudió el grado de asociación entre apoptosis, carga viral y compromiso inmunológico. No hubo correlación entre apoptosis temprana y niveles de LT-CD4+ ($r = -0,28$; $p = 0,47$) ni con la carga viral ($r = 0,10$; $p = 0,79$). Sin embargo, el hecho que en los pacientes VIH seropositivos con TAR los niveles de neutrófilos muertos por apoptosis temprana desciendan significativamente, sugiere que el aumento de apoptosis en los pacientes VIH sin TAR podría estar relacionado con los niveles de carga viral más altos que presentan.

Por otro lado, el aumento de la apoptosis de los neutrófilos de pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR podría justificar el valor absoluto de neutrófilos disminuido ($2,67 \pm 0,50 \times 10^9/L$) en estos pacientes, respecto a controles sanos ($4,35 \pm 0,69 \times 10^9/L$) y pacientes VIH seropositivos con TAR ($3,43 \pm 1,28 \times 10^9/L$).

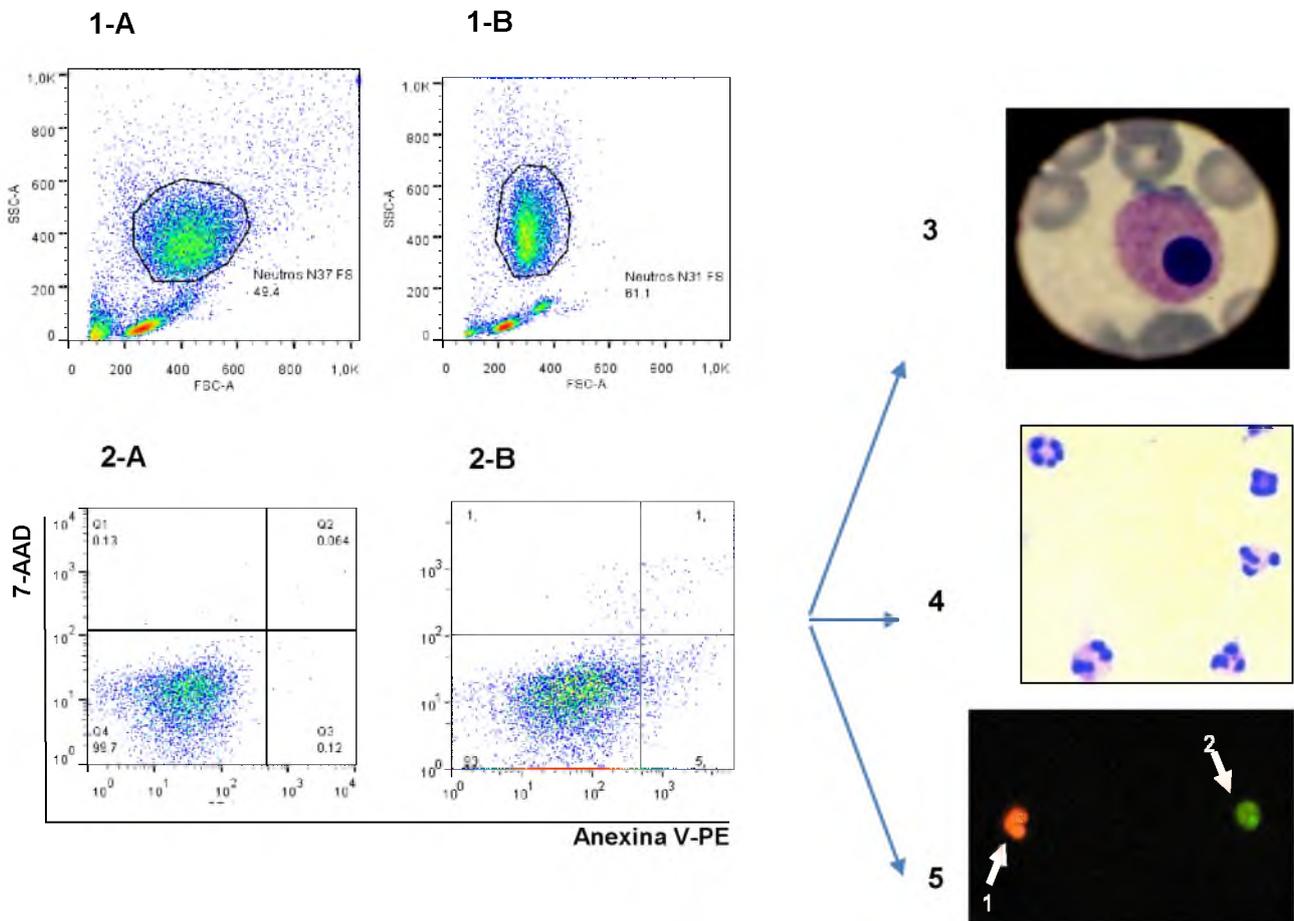


Figura 13. Apoptosis de neutrófilos de un paciente VIH seropositivo sin TAR. Población de neutrófilos seleccionada según tamaño (FSC) y granularidad (SSC) en un control sano (1-A) y en el paciente (1-B). Translocación de la fosfatidilserina, Anexina-V-PE y 7-AAD en un control sano (2-A) y en el paciente (2-B) donde muestra un aumento de la apoptosis temprana en el cuadrante inferior derecho. Neutrófilo apoptótico en: sangre entera (3), neutrófilos aislados (4) con coloración de May-Grünwald Giemsa y 5) tinción con naranja de acridina-ioduro de propidio que muestra un neutrófilo no viable con núcleo apoptótico (5-1) y un neutrófilo viable con núcleo normal (5-2).

20.3. Fragmentación del ADN

Una de las características más importantes de la apoptosis es la condensación del núcleo y la fragmentación del ADN en fragmentos de 200 pares de bases o múltiplos de ellos.

La extracción de ADN con la técnica de Fenol/Cloroformo no resultó exitosa ya que no se observó ADN en el gel de electroforesis lo que pudo ser consecuencia de la pérdida de fragmentos pequeños debido a las extracciones orgánicas. En relación al método propuesto por el Wizard® DNA Purification permitió disminuir el tiempo de extracción del ADN y su visualización en el gel de agarosa. Por estos motivos, se decidió utilizar como método de extracción el kit comercial Wizard® DNA Purification Kit. Para continuar evaluando la conservación del ADN a -20°C , se sembraron muestras de ADN de PMN frescos, variando el tiempo de almacenamiento. Se observó que el ADN puede mantenerse a -20°C hasta un mes sin alteración bioquímica, aunque es recomendable un tiempo máximo de 20 días ya que la visualización del ADN es más nítida. Por lo tanto, el almacenamiento del ADN extraído a -20°C facilitó la optimización de los tiempos ya que permitió recolectar una cantidad de muestras apropiada para realizar un único análisis por electroforesis y, así, disminuir costos. A su vez, se evaluó la cantidad de muestra a sembrar para una visualización exitosa en gel de agarosa. Fue posible visualizar ADN incluso sembrado en cantidades tan bajas como $0,45\ \mu\text{g}$. Siendo uno de los mayores inconvenientes de las técnicas de fragmentación de ADN su baja sensibilidad, esta cantidad resulta muy alentadora y supone una gran ventaja. El determinar la cantidad mínima de ADN a sembrar permite independizarse de la cantidad de células aisladas. Otros protocolos de medición cuantitativa de fragmentación, como técnicas colorimétricas con DPA (difenilamina) requieren, como mínimo, $1\ \mu\text{g}$ de ADN.

En este trabajo, la concentración promedio de ADN extraído a partir de $150\ \mu\text{l}$ de suspensión de células, que representan entre 1×10^6 a 2×10^6 neutrófilos, fue de $130,13\ \mu\text{g/mL}$. Estos resultados son de suma utilidad para el estudio de la apoptosis tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, ya que permitiría analizar la fragmentación a partir de una cantidad fija (en μg) de ADN sin que sea determinante la cantidad de neutrófilos aislados. Al analizar los marcadores de peso molecular de 100 pb y de 1000 pb, se observó que el más adecuado para visualizar los fragmentos de ADN que se correlacionan con apoptosis es el de 100 pb ya que en el marcador de peso molecular de 1000 pb se superponen las bandas de menor tamaño.

Cuando se analizó el ADN de neutrófilo de pacientes sin y con TAR, no se evidenció fragmentación del ADN de éstas células en ninguno de los grupos (Figura 14).

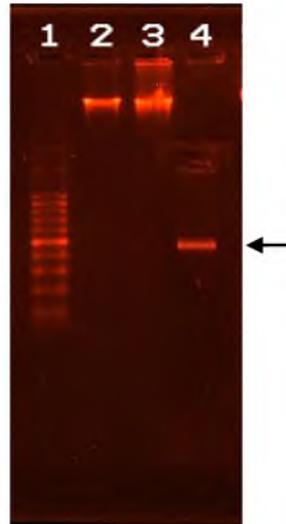


Figura 14. Fragmentación del ADN. Electroforesis en gel de poliacridamida de ADN de neutrófilos de pacientes sin y con infección por VIH y controles sanos. A la izquierda (1) se muestra el marcador de pesos moleculares, en las calle (2 y 3) el ADN de neutrófilos de un paciente con infección con VIH sin TAR y con TAR, respectivamente y en la calle (4) el ADN de neutrófilos sometidos a cambios de temperatura que sufrieron apoptosis y se ha degradado en segmentos de 200 pares de bases o múltiplos (flecha).

20.4. Actividad de Caspasas

Con el fin de valorar la expresión de las caspasas iniciadoras de la vía extrínseca e intrínseca, se analizó la expresión de caspasa -8 y caspasa -9, respectivamente. Tanto en neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR como pacientes con TAR, en los inmunoblots solamente se observó la expresión de la proforma de estas caspasas (o forma entera) sin expresión de las formas clivadas (Figura 15). Estos hallazgos indicarían una posible falta de activación de las vías intrínseca o extrínseca en el proceso de muerte celular de los neutrófilos de pacientes sin TAR, lo que debería ser confirmado en estudios posteriores utilizando otras metodologías.

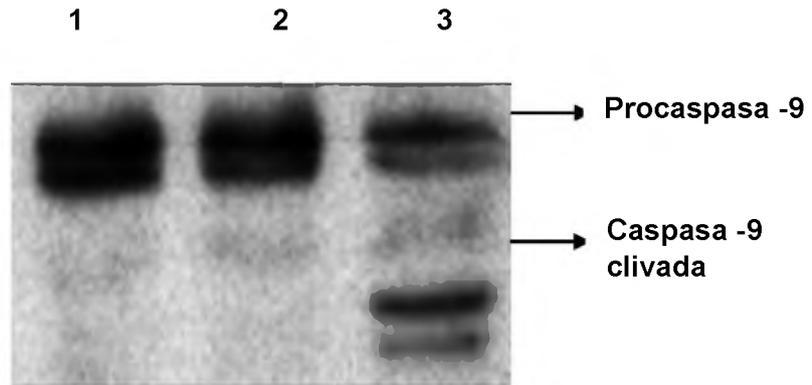


Figura 15. Análisis de Caspasa -9 por Western blot. 70 μ g de proteínas totales, obtenidas del lisado de neutrófilos, fueron separados en un gel de poliacrilamida-SDS y marcado con un anticuerpo monoclonal anticaspasa -9. 1) Neutrófilos de control sano, 2) Neutrófilos de paciente con infección por VIH sin TAR, 3) Neutrófilos sometidos a cambios de temperatura.

En base a los resultados anteriores, se procedió a determinar, por citometría de flujo, si había activación de la caspasa -3, ya que es una proteasa clave en la muerte celular por apoptosis, siendo activada durante los estadios tempranos del proceso. En los neutrófilos de pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR se evidenció un aumento de la actividad de caspasa -3 respecto a controles sanos y a pacientes con infección por VIH tratados (Figura 16).

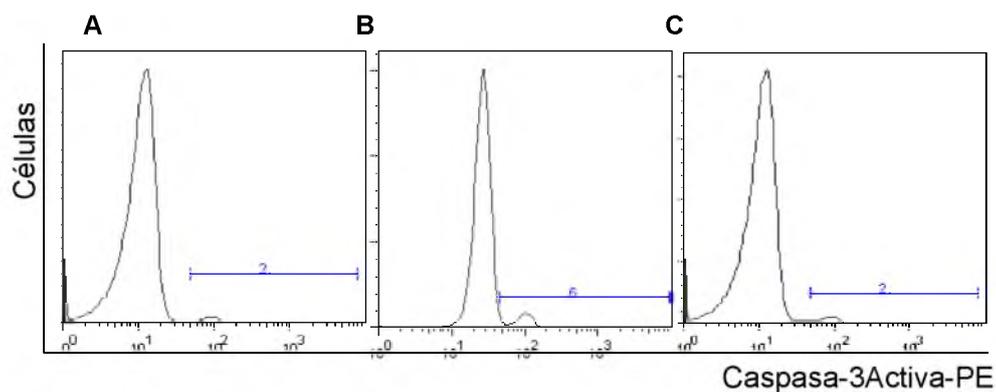


Figura 16. Actividad de Caspasa -3. Los parámetros se representan en escala lineal para el número de células y escala logarítmica para Caspasa -3 Activa-PE. Se señala la población de neutrófilos con marcación positiva para Caspasa-3-Activa en los tres grupos: Control sano (A), pacientes VIH sin TAR (B), pacientes VIH con TAR (C).

El porcentaje de neutrófilos con caspasa -3 activa fue significativamente mayor en pacientes sin TAR ($6,00 \pm 3,16$ %) respecto a pacientes con TAR ($2,00 \pm 1,33$ %) e individuos sanos ($0,57 \pm 0,85$ %) (Figura 17).

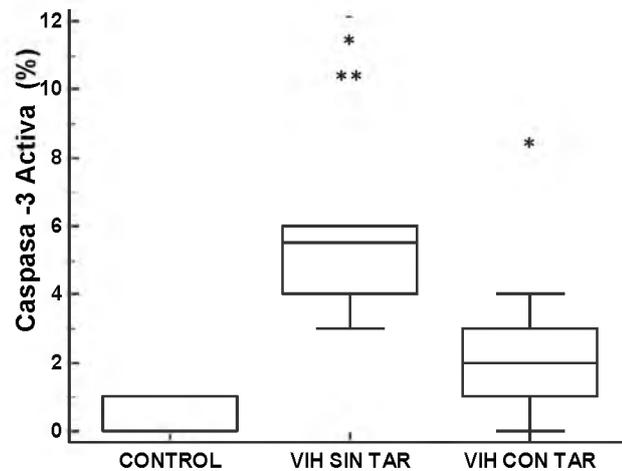


Figura 17. Nivel de Caspasa -3 activa en pacientes infectados por VIH y controles sanos. Las cajas representan los valores de mediana, percentilos 25 y 75 (RIC), valores mínimos y máximos del porcentaje de neutrófilos que expresan Caspasa -3 activa, en controles sanos, pacientes VIH sin TAR y pacientes VIH con TAR. * $p < 0,05$ respecto a controles sanos, ** $p < 0,05$ respecto a pacientes con TAR obtenidas con la prueba *t* de Student.

A la vista de estos resultados, se concluye que la muerte de neutrófilos implica la activación de caspasa -3.

En forma paralela, en este Trabajo de Tesis se analizaron las modificaciones en la expresión de antígenos de superficie de los neutrófilos asociadas con la apoptosis. Los neutrófilos expresan sobre su superficie un número de receptores de adhesión que interactúan con ligandos extracelulares y así actúan como sensores del medio externo.

21. Expresión de moléculas en la superficie de neutrófilos

El nivel de expresión de las moléculas de superficie CD62L, CD16 y CD11b en neutrófilos se evaluó en los distintos grupos de individuos y se analizó el impacto de la apoptosis sobre la expresión de estos antígenos.

El porcentaje de neutrófilos que expresaron CD62L, CD16 y CD11b se muestran en la Figura 18. Solo en los pacientes sin TAR se encontró una disminución

significativa de la expresión de CD62L y CD16 ($94,55\% \pm 3.74\%$ y $90.0\% \pm 8.37\%$, respectivamente) respecto a sujetos sanos ($97,88 \pm 1.76\%$ y $96,1 \pm 3.76\%$, $p < 0,05$, respectivamente). La expresión de CD11b fue similar en pacientes sin TAR, con TAR y controles sanos ($98,80 \pm 0.84\%$; $98,10 \pm 1.06\%$ y $99,20 \pm 0.83\%$, respectivamente).

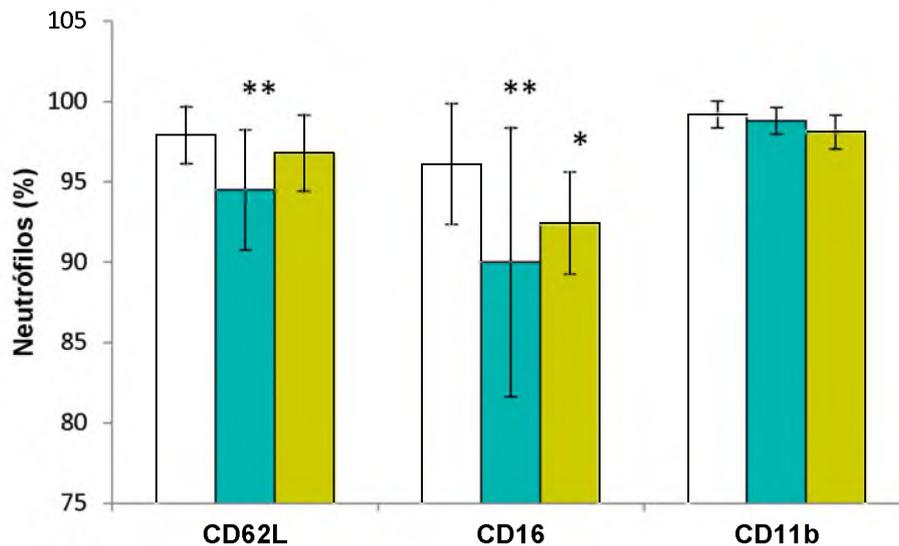


Figura 18. Expresión de CD62L, CD16 y CD11b en neutrófilos de sangre periférica. Las barras representan: controles sanos (blancas), pacientes VIH sin TAR (celestes) y pacientes VIH con TAR (verdes). Las barras de error indican el valor correspondiente a la desviación estándar (DS). Los dos grupos de pacientes infectados fueron comparados con el grupo control para determinar las diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, obtenido con el Test de comparaciones múltiples de Turkey-Kramer.

Si bien no hubo diferencias significativas respecto a la expresión de CD11b entre las dos categorías inmunológicas de los pacientes sin TAR, un hallazgo interesante fue que en los pacientes con LT-CD4+ entre 200-499/ μ L (etapa 2) se diferenciaron dos subpoblaciones de neutrófilos con distintos niveles de expresión de CD11b (R1, IMF \pm DS= $854,8 \pm 286,9$; R2, IMF \pm DS= $526,5 \pm 299,6$; $p < 0,05$) (Figura 19). La presencia de estas subpoblaciones de neutrófilos, sugiere que la instauración de un mayor compromiso inmune afectaría la expresión de esta molécula de superficie.

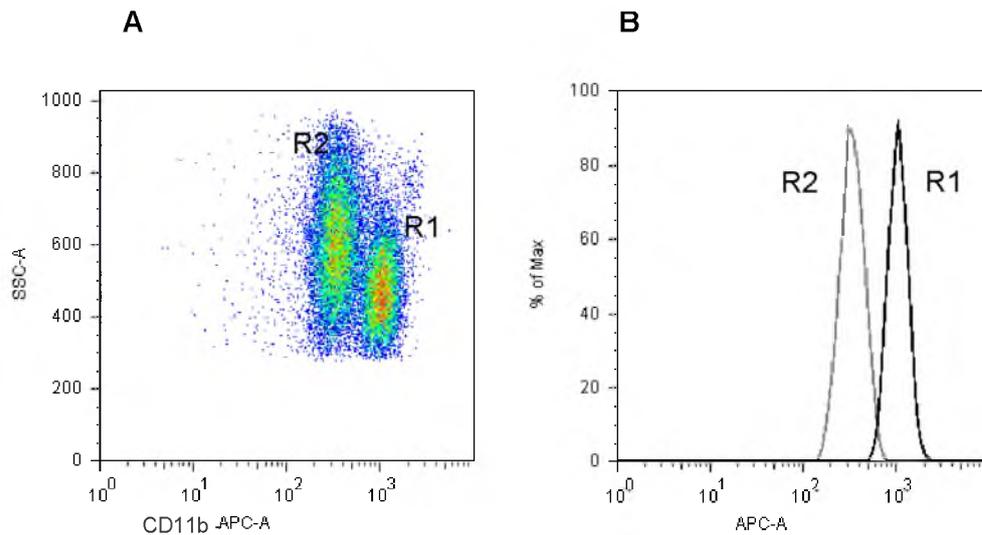


Figura 19. Expresión de CD11b en pacientes VIH seropositivos sin TAR con LT-CD4⁺ entre 200-499/μL. Los diagramas representan: A) Diagrama de punto de la expresión de CD11b (APC) vs SSC y B) Intensidad media de fluorescencia de CD11b en R1 y R2.

Al determinar la cantidad de moléculas de superficie expresadas en neutrófilos (IMF), solamente se encontró disminución significativa en la expresión de CD62L en pacientes con infección asintomática por VIH sin TAR con respecto a controles sanos (IMF \pm DS= 76,80 \pm 24,56 vs 95,47 \pm 25.73, respectivamente, $p < 0.05$) (Tabla V)

Tabla V. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD62L, CD16 y CD11b en neutrófilos de pacientes VIH seropositivos y controles sanos.

Antígeno	Control sano	VIH sin TAR	VIH con TAR
CD62L	95,47 \pm 25,73	76,80 \pm 24,56 *	96,90 \pm 23,27
CD16	991,12 \pm 401,20	758,2 \pm 133,46	937,68 \pm 257,54
CD11b	1138,06 \pm 538,58	1095,80 \pm 304,37	929,60 \pm 314,50

Valores expresados en media \pm DS. * $p < 0.05$ respecto a controles sanos, determinado por test no apareado con corrección de Welch.

Cuando se realizó un análisis de correlación entre la expresión de CD62L, CD16 y CD11b en neutrófilos de pacientes VIH sin TAR con el compromiso inmunológico, se observó una correlación positiva entre niveles de LT-CD4⁺ y expresión de CD62L ($r=0,75$, $p < 0.05$) y de CD16 ($r=0,72$, $p < 0.05$), es decir, a mayor compromiso inmunológico disminuyó la expresión de CD62L y de CD16. No hubo correlación con la expresión de CD11b. En base a estos resultados, al evaluar la expresión de CD62L y CD16 según el estadio de la clasificación del CDC, en neutrófilos de pacientes con LT-CD4⁺ entre 200-499 cél/μL se encontraron niveles de expresión (Figura 20) y número de moléculas de CD62L por neutrófilo (Figura 21)

significativamente más bajos que en los pacientes con $\text{LT-CD4}^+ \geq 500 \text{ cél}/\mu\text{L}$. En relación a la carga viral, no hubo correlación con la expresión de CD62L, CD16 y CD11b. En pacientes VIH con TAR, no hubo correlación entre la expresión de las moléculas de superficie y valores absolutos de LT-CD4^+ .

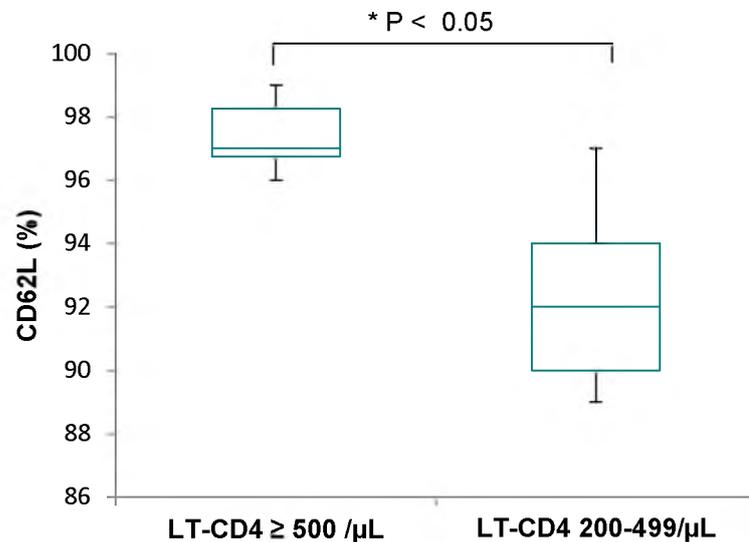


Figura 20. Porcentaje de expresión de CD62L en neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR según el nivel de LT-CD4^+ . Las cajas representan los percentiles 25, 50 y 75. Se representan también los valores mínimos y máximos y la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) obtenida con el test de Mann-Whitney.

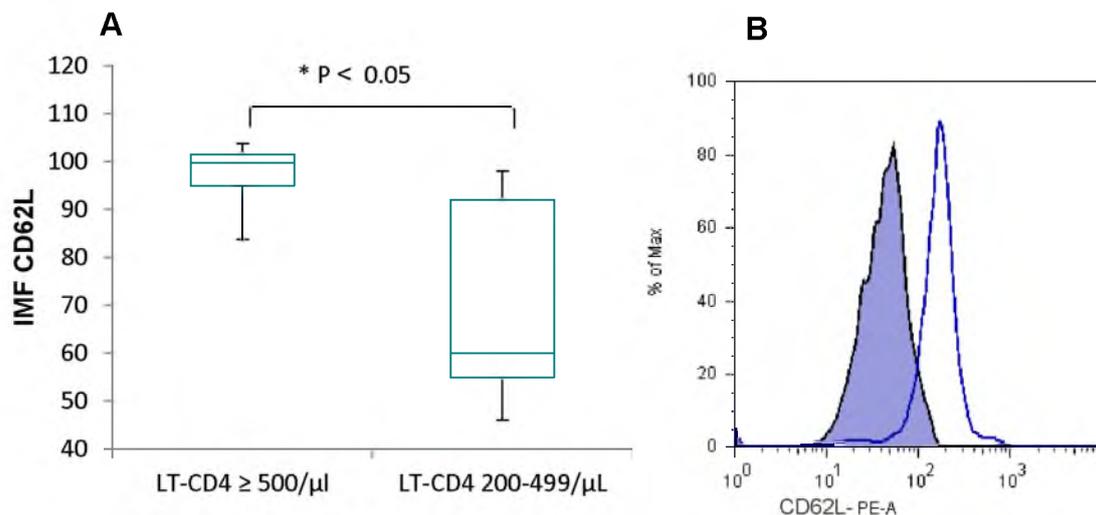


Figura 21. Intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD62L en neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR según el nivel de LT-CD4^+ . A) Las cajas representan los percentiles 25, 50 y 75. Se representan también los valores mínimos y máximos y se indica la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$, determinado con el test de Mann-Whitney). B) Histogramas que muestran la IMF de CD62L en neutrófilos de pacientes VIH sin TAR con $\geq 500 \text{ LT-CD4}^+/\mu\text{L}$ (sin relleno) y con $200-499 \text{ LT-CD4}^+/\mu\text{L}$ (sombreado).

21.1. Coexpresión de moléculas de superficie en neutrófilos

En la población de neutrófilos CD11b⁺, se analizó la expresión de CD16 y de CD62L. Se determinó que el porcentaje de neutrófilos que coexpresaban CD11b y CD16 (CD11b⁺/CD16⁺) fue significativamente menor en pacientes VIH sin TAR comparado con controles sanos y pacientes VIH con TAR. En relación a la coexpresión de CD11b y CD62L, se comprobó que el porcentaje de neutrófilos que coexpresaban esos antígenos (CD11b⁺/CD62L⁺) estaba disminuido significativamente en los pacientes infectados con VIH, con y sin TAR, respecto a controles sanos. Los valores se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI. Coexpresión de CD11b/CD16 y CD11b/CD62L en neutrófilos

	Control sano	Pacientes VIH sin TAR	Pacientes VIH con TAR
CD11b ⁺ /CD16 ⁺	98,37 ± 1,42	96,20 ± 0,45 *	98,10 ± 1,07 **
CD11b ⁺ /CD62L ⁺	98,06 ± 0,83	92,30 ± 4,27 *	94,00 ± 5,42 *

Valores expresados como media ± DS del porcentaje de neutrófilos CD11b⁺/CD16⁺ y CD11b⁺/CD62L⁺ en controles sanos, pacientes VIH sin TAR y pacientes VIH con TAR. *p<0,01 respecto a controles sanos; **p<0,01 respecto a pacientes VIH sin TAR. En las poblaciones CD11b⁺/CD16⁺, los valores de p fueron determinados por Test de comparación múltiple de Turkey-Kramer y para CD11b⁺/CD62L⁺ por el de Dunn (Test no paramétrico de Kruskal-Wallis).

Por otro lado, en pacientes infectados con VIH se observaron neutrófilos que expresaban CD11b, pero no expresaban CD16 o CD62L. El porcentaje de la subpoblación de neutrófilos CD11b⁺/CD16⁻ fue significativamente superior en los pacientes VIH sin TAR, respecto a controles sanos y pacientes VIH con TAR (Tabla VII).

Tabla VII. Poblaciones de neutrófilos CD11b⁺/CD16⁻ y CD11b⁺/CD62L⁻

	Control sano	Pacientes VIH sin TAR	Pacientes VIH con TAR
CD11b ⁺ /CD16 ⁻	0,95 ± 1,18	3,80 ± 0,45 *	1,90 ± 1,07 */**
CD11b ⁺ /CD62L ⁻	1,17 ± 0,81	3,80 ± 3,27	3,00 ± 3,46

Valores expresados como media ± DS del porcentaje de neutrófilos CD11b⁺/CD16⁻ y CD11b⁺/CD62L⁻ en controles sanos, pacientes VIH sin TAR y pacientes VIH con TAR. *p<0,01 respecto a controles sanos; **p<0,01 respecto a pacientes VIH sin TAR; valores de p obtenidos mediante Test de comparación múltiple de Turkey-Kramer.

Además, se observó que CD11b se expresaba con distintos niveles de intensidad. La subpoblación que expresaba CD11b con alta intensidad también expresaba CD16 con alta intensidad ($CD11^{alto}CD16^{alto}$) (Figura 22-A), mientras que la subpoblación con menor IMF de CD11b no expresaba CD16 y por lo tanto, esta población fue designada $CD11b^{intermedio}CD16^{-}$ (Figura 22-B). Este fue otro hallazgo interesante que indica que la infección por VIH condiciona la aparición de distintas subpoblaciones de neutrófilos.

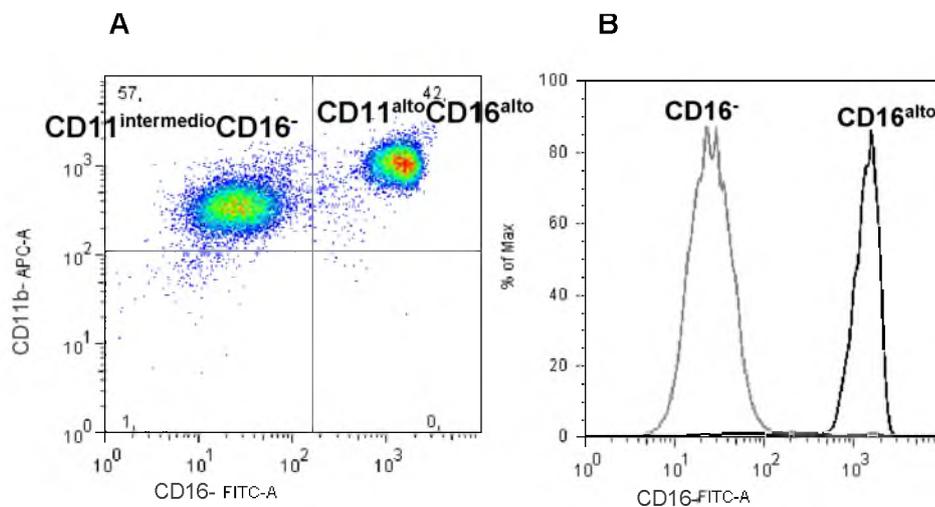


Figura 22. Subpoblaciones de neutrófilos $CD11^{alto}CD16^{alto}$ y $CD11b^{intermedio}CD16^{-}$ en un paciente VIH seropositivo sin TAR. A) Diagrama de punto de la expresión de CD16-FITC versus CD11b-APC. B) Histogramas de Intensidad media de fluorescencia de CD16-FITC en neutrófilos $CD11b^{+}$.

21.2. Moléculas de superficie y su asociación con la apoptosis de neutrófilos

Para conocer la relación entre la apoptosis de neutrófilos de pacientes VIH sin TAR y la expresión de CD62L, CD16 y CD11b, se determinó la IMF en los estadios de apoptosis temprana (EA) y apoptosis tardía (LA), según marcación con Anexina V-PE/7-AAD. La intensidad de expresión de CD16 fue disminuyendo progresivamente a lo largo de la evolución de la apoptosis en neutrófilos de pacientes VIH sin TAR, desde el estadio de células viables ($IMF \pm DS = 1284,67 \pm 128,34$) a células en apoptosis temprana ($IMF \pm DS = 887,11 \pm 344,97$) y a células en apoptosis tardía ($IMF \pm DS =$

324,11 ± 146,50), evidenciando que la alteración en la expresión de esta molécula de adhesión está asociada con la apoptosis (Figura 23 A y B).

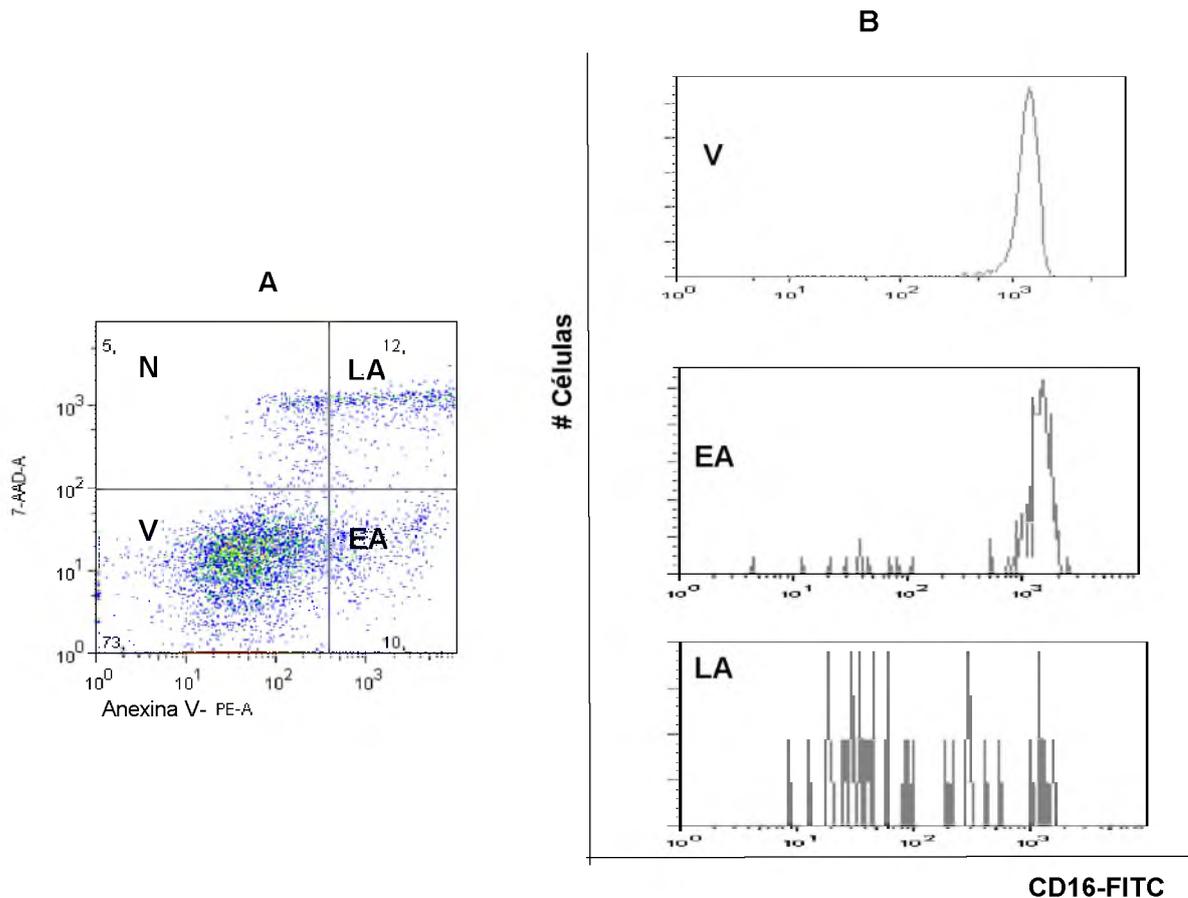


Figura 23 A. Apoptosis y expresión de CD16 en neutrófilos de sangre entera de pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR. A) Diagrama de puntos de AnexinaV-PE/7AAD representativo de neutrófilos de paciente VIH sin TAR, discriminados en: viables (V), apoptosis temprana (EA), apoptosis tardía (LA) y necrosis (N). En B) se muestran tres histogramas de intensidad de fluorescencia (IMF) de CD16-FITC correspondientes a los estadios V, EA y LA (de arriba abajo).

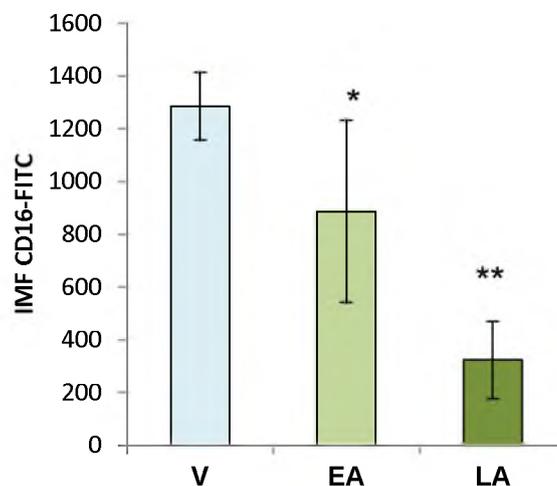


Figura 23 B. Apoptosis y expresión de CD16 en neutrófilos de sangre entera de pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR. Las barras representan los valores

de media \pm DS de la IMF de CD16-FITC en los estadios V, EA y LA. Se indican las diferencias estadísticamente significativas obtenidas con el Test de comparación múltiple de Turkey-Kramer: * $p < 0,05$ respecto a neutrófilos viables; ** $p < 0,01$ respecto a neutrófilos viables y en apoptosis temprana.

Al comparar la expresión de CD11b en neutrófilos viables y apoptóticos, se observó un aumento no significativo de la intensidad media de fluorescencia en células en apoptosis temprana respecto a células viables ($1468,20 \pm 280,82$ vs $1223,00 \pm 239,35$; $p > 0,05$) (Figura 24).

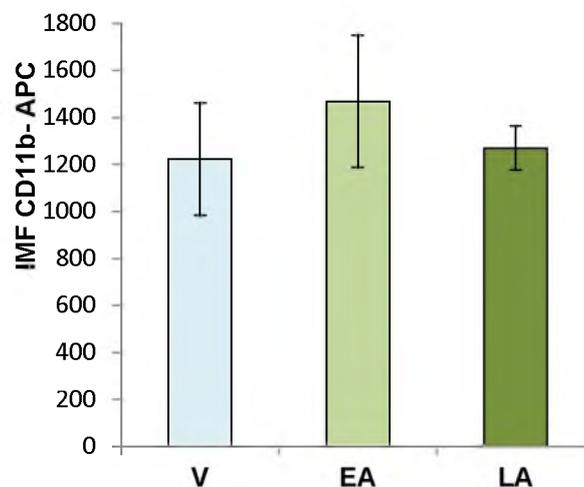


Figura 24. Apoptosis y expresión de CD11b en neutrófilos de sangre entera de pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR. Las barras representan los valores de media \pm DS de la IMF de CD11b-APC en neutrófilos viables (V), en apoptosis temprana (EA) y tardía (LA).

Teniendo en cuenta los hallazgos realizados respecto al incremento de la apoptosis temprana y las modificaciones en la expresión de antígenos de superficie de los neutrófilos de pacientes VIH seropositivos sin TAR, se evaluó la participación de receptores y mediadores de inflamación que intervienen en la regulación de la muerte celular por apoptosis.

22. Expresión de los receptores de superficie TLR2 y CD95

Con el fin de evaluar la participación de los receptores TLR2 y CD95, como posibles inhibidor o inductor, respectivamente, de la apoptosis de neutrófilos, se

analizó el nivel de su expresión en pacientes VIH seropositivos respecto a controles sanos. En pacientes con infección por VIH sin TAR se detectó un aumento significativo del porcentaje medio de neutrófilos que expresan TLR2 respecto a controles sanos (media \pm DS = $96,80 \pm 1,81$ vs $92,90 \pm 1,81$; $p < 0.05$). Los porcentajes medios de neutrófilos que expresaron este receptor fueron similares en pacientes sin y con TAR ($95,90 \pm 2,75$) (Figura 25-A). Por otro lado, cuando se evaluó el número de moléculas de TLR2 en los neutrófilos se detectó en pacientes VIH sin TAR, una mayor intensidad media de fluorescencia TLR2-Alexa Flour® 488 (IMF \pm DS = $10,89 \pm 1,17$) que los controles sanos (IMF \pm DS = $10,89 \pm 2,75$) y menor que los pacientes VIH con TAR (IMF \pm DS = $14,81 \pm 8,03$), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 25-B).

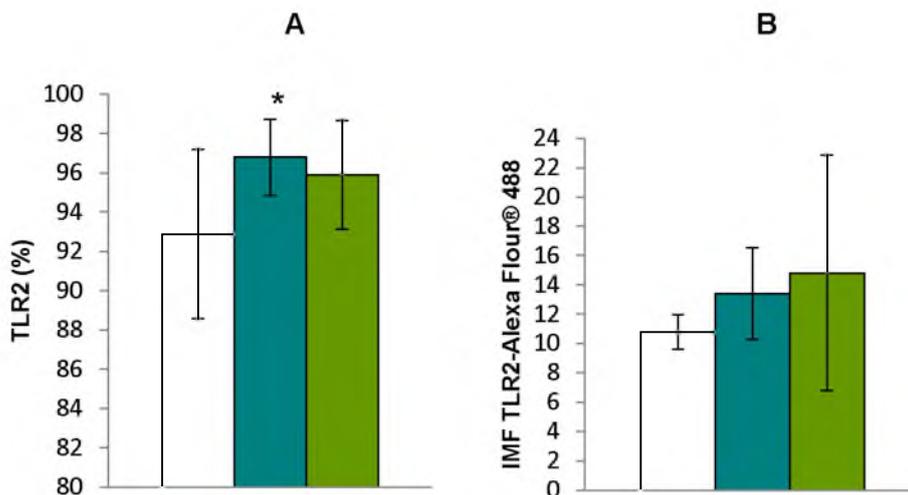


Figura 25. Niveles de expresión de TLR2 en neutrófilos de sangre periférica de pacientes VIH seropositivos sin TAR. A) Porcentaje de neutrófilos que expresan TLR2. B) Intensidad Media de Fluorescencia de TLR2- Alexa Flour® 488 en neutrófilos. Las barras representan: controles sanos (blancas), pacientes VIH sin TAR (celestes) y pacientes VIH con TAR (verdes). Valores expresados como media \pm DS. * $p < 0.05$ obtenida con el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis (prueba de comparación múltiple de Dunn).

Con respecto a la expresión de CD95, en pacientes VIH sin TAR, el porcentaje de neutrófilos que expresaron este antígeno (media \pm DS = $98,6\% \pm 1,1$) y la cantidad de moléculas (IMF \pm DS = $10,6 \pm 2,2$) fueron similares a los de los controles (media \pm DS = $98,8\% \pm 0,4$; IMF \pm DS = $10,8 \pm 1,9$) y superiores a los niveles expresados en pacientes VIH con TAR (media \pm DS = $95,9\% \pm 4,5$; IMF \pm DS = $8,75 \pm 2,3$), pero en ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas (Figura 26).

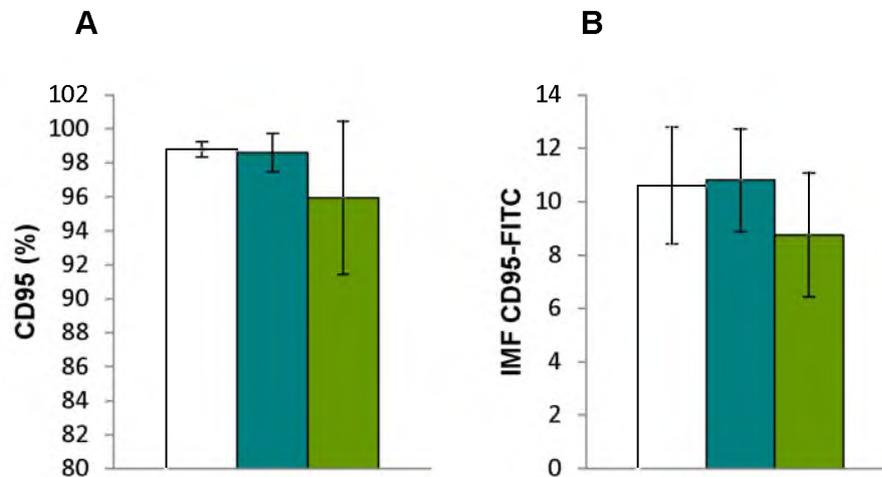


Figura 26. Niveles de expresión de CD95 en neutrófilos de sangre periférica de pacientes con infección por VIH sin TAR. A) Porcentaje de neutrófilos que expresan CD95. B) Intensidad Media de Fluorescencia de CD95-FITC en neutrófilos. Las barras representan: controles sanos (blancas), pacientes VIH sin TAR (celestes) y pacientes VIH con TAR (verdes). Valores expresados como media \pm DS.

Cuando se evaluaron la relación entre expresión de estos receptores y el estado inmunológico y virológico de los pacientes sin TAR no se encontraron correlaciones.

23. Mediadores solubles inflamatorios

23.1. Niveles circulantes de PCR-as, IL-6 y de TNF

En primer lugar, se analizaron los niveles circulantes de PCR-as, IL-6 y TNF en pacientes y controles sanos mediante análisis univariados. Los niveles circulantes de estos mediadores solubles fueron mayores en pacientes respecto a sujetos sanos (Tabla VIII). Sin embargo, solo hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IL-6 y TNF de los pacientes sin y con TAR respecto a sujetos sanos. Entre pacientes tratados y no tratados, los niveles de estos mediadores no evidenciaron diferencias significativas.

Tabla VIII. Niveles séricos de PCR-as, IL-6 y TNF en pacientes con infección por VIH y sujetos sanos.

Parámetro	Controles Sanos	Pacientes VIH sin TAR	Pacientes VIH con TAR
PCR (mg/L)	1,25 (0,55-2,20)	1,80 (0,60-4,20)	1,85 (0,90-3,52)
IL-6 (pg/mL)	4,70 (4,50-4,70)	120 (24,75-165,00)*	190,00 (88,75-300,00)*
TNF (pg/mL)	7,80 (7,30-7,80)	135,00 (103,50-202,50)*	195,00 (161,25-225,00)*

Valores expresados como mediana (rango intercuartilo). * $p < 0,001$ respecto a controles sanos determinada con el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis (Test de comparación múltiple de Dunn).

En los pacientes VIH seropositivos no hubo diferencias significativas en los niveles séricos de los mediadores solubles evaluados con respecto al tiempo de detección ni al sexo.

Posteriormente, se evaluó la relación entre los niveles de mediadores solubles y marcadores inmunológicos y virológicos en pacientes VIH seropositivos sin TAR, debido a que este grupo de pacientes es el objeto de estudio principal de este Trabajo. Para ello, los pacientes fueron categorizados en dos grupos de acuerdo a los niveles absolutos de linfocitos T-CD4⁺ (200-499 CD4⁺/μL y ≥500CD4⁺/μL) y en tres grupos en función de los niveles de carga viral (<5.000, 5.000-20.000 y >20.000 copias/mL).

Cuando se compararon los niveles de mediadores solubles en relación al estado inmunológico, hubo un aumento significativo de los niveles séricos de PCR-as e IL-6 en pacientes con 200-499 LT-CD4⁺/μL respecto a pacientes con ≥500 LT-CD4⁺/μL (Tabla IX).

Tabla IX. Niveles séricos de PCR-as, IL-6 y TNF en pacientes VIH seropositivos asintomáticos sin TAR según compromiso inmunológico

	LT- CD4 ⁺ 200-499/μL	LT- CD4 ⁺ ≥ 500/μL
Linfocitos TCD4 ⁺ /μL	371,00 (331,50-440,50)	593,00 (557,00-760,00)
Carga viral		
- Copias/mL	17.315 (10.533-88.938)	11.348 (3.297,25-32.951,25)
- Log ₁₀ RNA-VIH-1	4,23 (4,00-4,95)	4,05 (3,50-4,52)
PCR (mg/L)	4,30 (0,90-10,22) *	0,90 (0,55-2,60)
IL-6 (pg/mL)	150,00 (123,00-300,00) *	26,50 (6,27-120,00)
TNF (pg/mL)	120,00 (80,00-180,00)	90,00 (39,00-200,00)

Valores expresados en mediana (percentilo 25-percentilo 75). * $p < 0,05$ respecto a pacientes con LT-CD4⁺ entre 200-499/μL y obtenida con la prueba de Mann-Whitney.

Debido a este hallazgo, se evaluó la relación entre los valores de LT-CD4+%, LT-CD4+/ μ l, LT-CD8+%, LT-CD8+/ μ l, relación CD4/CD8 y carga viral en pacientes con niveles de PCR-as <3,5 mg/L y pacientes con PCR-as \geq 3,5 mg/L. Este valor de corte fue elegido por ser el valor máximo de PCR-as en controles sanos. En pacientes con valores de PCR-as \geq 3,5 mg/L se evidenció que los niveles absolutos de linfocitos T CD4+ y la relación CD4/CD8, fueron significativamente menores que en los pacientes con PCR-as <3,5 mg/mL (Tabla X), indicando que los mayores niveles de PCR-as se asocian a un mayor compromiso inmunológico (<500 LT-CD4+/ μ l).

Tabla X. Marcadores inmunológicos y virológicos según niveles séricos de PCR-as, en pacientes con infección por VIH sin TAR.

Variable	PCR < 3.5 mg/L	PCR \geq 3.5 mg/L
Linfocitos T CD4+ (%)	27,0 (21,5-31,0)	17,5 (14,5-24,5)
Linfocitos T CD4+ (μ l)	563,5 (488,5-717,0)	430,5 (348,5-538,5)*
Linfocitos CD8+ (%)	48 (39-55)	54(45-60)
Linfocitos CD8+ (μ l)	1.102,5 (839,5-1448,0)	1161,5 (700,5-1498,5)
CD4+/CD8+	0,58 (0,42-0,73)	0,29 (0,25-0,49)*

Valores expresados en mediana (percentilo 25-percentilo 75). * p<0.05 respecto a PCR < 3.5 mg/L obtenida con la prueba *t* de Student.

Cuando se evaluaron los niveles séricos de los mediadores solubles en relación a la carga viral, hubo una disminución no significativa de TNF y un aumento significativo de IL-6 a carga viral mayor a 20.000 copias/mL, respecto a carga viral <5.000 copias/mL (Tabla XI). Estos resultados evidenciaron una correlación positiva significativa entre los niveles séricos de IL-6 y la carga viral en copias/mL ($r=0,63$, $p=0,0017$).

Tabla XI. Niveles séricos de PCR-as, IL-6 y TNF en pacientes VIH seropositivos asintomáticos sin TAR, según carga viral.

Carga viral (copias/mL)	PCR-as	IL-6	TNF
< 5000	2,60 (0,60-5,00)	23,00 (17,50-123,00)	120,00 (85,50-220,00)
5000-20000	2,10 (0,65-4,05)	90,00 (4,70-170,00)	99,00 (31,90-220,00)
>20000	1,80 (0,55-5,05)	140,00 * (54,00-300,00)	95,00 (39,00-165,00)

Valores expresados en mediana (percentilo 25- percentilo 75). * p<0,05 respecto a carga viral < 5000 copias/mL. Prueba de Mann-Whitney

Finalmente, se realizó un análisis de regresión lineal múltiple para medir el potencial de marcadores inmunológicos y virológicos sobre los mediadores solubles. La única variable que influyó sobre los niveles séricos de IL-6 fue la carga viral (R^2 0,23; $p=0,0151$), mientras que los niveles de PCR-as fueron influenciados solo por parámetros inmunológicos (R^2 0,74): LT-CD4+/uL $p=0,0770$, LT-CD8+ % $p=0,0003$, LT-CD8+/uL $p=0,0039$, LT-CD4+ % $p=0,0003$ y relación CD4/CD8 $p=0,0039$. En conjunto, estos resultados indican que el aumento del nivel de PCR-as se asocia con el deterioro inmunológico, pero no con la carga viral, mientras que el aumento de los niveles de IL-6 se asocian con el aumento de la carga viral, pero no con los niveles de célulasT CD4+.

23.2. Mediadores solubles y su relación con la apoptosis de neutrófilos en pacientes VIH asintomáticos sin tratamiento

Al evaluar la influencia de los niveles de PCR-as, IL-6 y TNF sobre la apoptosis de los neutrófilos de los pacientes VIH sin TAR, mediante el test de correlación de Pearson, se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa ($r=-0,9988$; $p=0,0314$) entre los niveles séricos de IL-6 y apoptosis de neutrófilos. No hubo correlación entre apoptosis de neutrófilos y niveles de PCR-as ni de TNF.

V. DISCUSSION

En los últimos años, nuestra comprensión sobre la capacidad de los microorganismos para manipular el desempeño de los neutrófilos ha aumentado considerablemente. En general, estos efectos corresponden a tres categorías. Algunos patógenos retrasan la muerte de los neutrófilos para mantener la viabilidad de su nicho replicativo, otros aceleran la apoptosis o desencadenan la lisis de éstas células para evadir la muerte intracelular y hay microorganismos que utilizan a los neutrófilos como caballos de Troya para infectar a los macrófagos.

Numerosas líneas de evidencia sugieren un papel clave de los neutrófilos en el control de virus, tales como, el adenovirus, el virus de la gripe y el virus herpes simple (1,2). Por otro lado, los neutrófilos pueden atraer y estimular a otras células inmunes a través de la liberación de quimiocinas y citocinas proinflamatorias (3) y pueden interactuar directamente con células inmunes como son las células dendríticas (4), lo que implica que los neutrófilos tienen el potencial de orquestar las respuestas inmunes adaptativas y desempeñar un papel clave durante las infecciones virales. Por lo tanto, la modulación de la supervivencia de los neutrófilos durante las infecciones virales puede tener consecuencias importantes en la evolución de la enfermedad.

El VIH, agente causal del SIDA, tiene especial tropismo por células que expresan en su superficie el receptor CD4, tales como los LT, monocitos, macrófagos, células dendríticas y también los neutrófilos (5). El deterioro progresivo de la respuesta inmune causado por el VIH es debido fundamentalmente a la pérdida gradual numérica y funcional de los LT-CD4⁺, lo que conlleva al desarrollo del SIDA y a la instauración de infecciones oportunistas y distintos tipos de neoplasias (6). Aunque los LT-CD4⁺ constituyen el principal blanco del VIH, en la actualidad existe gran interés por el estudio de otros elementos celulares. En este sentido, la investigación sobre la infección por VIH ha puesto foco en la respuesta inmune innata y cada vez hay más evidencias que sugieren su rol determinante en el control de la infección debido a su intervención desde las primeras etapas (6). Actualmente se sabe que la relación entre los neutrófilos y el VIH es compleja y que durante la historia natural de la infección, la participación de los neutrófilos puede tener consecuencias beneficiosas, pero también, perjudiciales para el huésped.

Numerosas alteraciones funcionales de los neutrófilos han sido informadas desde estadios iniciales de la infección, que se profundizan con el curso de la enfermedad y contribuyen al deterioro del paciente. El VIH puede producir defectos en la quimiotaxis, en la fagocitosis, estallido respiratorio oxidativo y en la muerte de microorganismos, alteraciones que dependen del estadio y severidad de la infección

(7-9). Sin embargo, algunos estudios han sido contradictorios debido a que han informado, por ejemplo, una producción de anión superóxido disminuido, normal o aumentado (9,10).

En modelos de infección con SIV (del inglés, *Simian immunodeficiency viruses*) en RMs (del inglés, *Rhesus macaques*) se evaluó la apoptosis de los neutrófilos en la fase aguda de la infección y se determinó un aumento de la muerte de estas células que coincide con el pico de la replicación viral (11). Estos modelos permiten la investigación secuencial de los eventos de la infección, tales como, dinámica viral, respuesta inmune y cambios en el pool de LT-CD4⁺. Si bien, los estudios de apoptosis de neutrófilos que han sido realizados en individuos infectados con VIH han informado un aumento de este tipo de muerte celular (12-15) la mayoría han incluido un escaso número de individuos, principalmente en estadios avanzados de la infección, con un sistema inmunológico muy comprometido, con cargas virales muy disímiles. Por estos motivos, en esta Tesis se decidió abordar el estudio de la apoptosis de neutrófilos en pacientes que se encontraban en los primeros estadios de la infección y que cumplimentaban los siguientes criterios de inclusión: infección asintomática, sin previas manifestaciones clínicas o eventos asociados a SIDA, sin coinfección con otros agentes virales, sin TAR al momento de la evaluación y sin compromiso inmunológico o con un compromiso moderado.

24. Evaluación del nivel de apoptosis en neutrófilos

El Comité de Nomenclatura sobre la Muerte Celular (16), ha propuesto que la clasificación y caracterización de los distintos tipos de muerte celular, deberían basarse únicamente en criterios morfológicos porque no siempre existe una correspondencia clara entre los cambios ultraestructurales y las características bioquímicas de la muerte celular (17). Considerando estos conceptos, en esta Tesis se eligieron técnicas complementarias, basadas tanto en las características morfológicas como en las bioquímicas, ya que ninguna puede hacerlo por sí sola (18). Además, las muestras fueron procesadas inmediatamente luego de su obtención, ya que la demora en el procesamiento o el uso de técnicas que insumen mucho tiempo, pueden afectar los resultados y conducir a una mala interpretación en la evaluación de la funcionalidad de los neutrófilos (13). Por ello, no se realizaron experimentos *ex vivo*.

En esta Tesis, se demostró un aumento significativo de la apoptosis total de neutrófilos de pacientes con infección asintomática por VIH sin TAR, respecto a controles sanos y pacientes VIH seropositivos con TAR y evaluada con la marcación de anexina V para determinar la exposición de la PS. Mediante la marcación con Anexina V-PE/7AAD se determinó que el mayor nivel de apoptosis ocurría durante la etapa temprana de este proceso. La apoptosis fue evaluada, además, a través de los cambios citomorfológicos y bioquímicos característicos de este tipo de muerte celular.

Para confirmar las características citomorfológicas de la apoptosis en los neutrófilos se utilizaron las tinciones de May Grünwald-Giemsa y Naranja de Acridina-Ioduro de Propidio. Mediante la tinción con May Grünwald-Giemsa se observaron cambios morfológicos característicos del proceso de muerte celular por apoptosis, tales como la presencia de núcleo condensado y pérdida simultánea del aspecto polisegmentado (18). Aunque se considera que consume mucho tiempo y depende del operador, es una técnica de microscopía óptica clásica para la identificación de los parámetros tempranos relacionados a la muerte celular, como es la condensación de la cromatina. Sin embargo, algunos autores creen que podría llegar a subestimar el porcentaje de apoptosis debido a que en las etapas tempranas del proceso no se suelen identificar cambios morfológicos severos (13). Por esta causa, se decidió relacionar los resultados de la coloración de May Grünwald-Giemsa con el uso de la tinción de exclusión con Azul Tripán que, al ser un colorante que tiñe selectivamente a las células muertas, permite limitar la subestimación ya que se pueden diferenciar las células muertas de las células vivas.

La tinción de Naranja de Acridina-Ioduro de Propidio se eligió porque la microscopía de fluorescencia permite una evaluación morfológica diferente a la que permite la tinción de May Grünwald-Giemsa ya que detecta cambios morfológicos más tardíos relacionados con la permeabilidad de la membrana plasmática. Además, debido a las características de estos colorantes de fluorescencia (Naranja de Acridina es un colorante permeable a la membrana plasmática que se une a los ácidos nucleicos de células viables; Ioduro de Propidio es un colorante impermeable para la membrana plasmática, por lo que solamente penetra en células no viables) (19), cuando son usados simultáneamente permiten diferenciar células vivas, apoptóticas y necróticas en simultáneo. A su vez, a pesar de que es dependiente de un operador y necesita experiencia para la distinción de las células, es un método rápido, simple y con una relación señal/ruido alta (18). Por lo tanto, la combinación de la tinción de May Grünwald-Giemsa, que permite observar los cambios morfológicos del núcleo

especialmente, y de la tinción de Naranja de Acridina-Ioduro de Propidio, que permite evaluar la integridad de la membrana plasmática y la viabilidad de la célula, es una forma de evaluación citomorfológica completa y complementaria a la evaluación bioquímica de la apoptosis.

Para evaluar los cambios bioquímicos que experimentan las células apoptóticas, se utilizó además la técnica de electroforesis en gel de agarosa para visualizar e identificar los fragmentos de ADN (20). Si bien los cambios bioquímicos pueden explicar en parte algunos de los cambios morfológicos que ocurren en la apoptosis, Anita *et al.*, han reportado que este tipo de muerte celular puede ocurrir sin la fragmentación oligosomal del ADN (17), lo que explicaría que en este Trabajo, no se hayan observado bandas correspondientes a los fragmentos de ADN de células apoptóticas. Estos resultados podrían deberse también a que en los pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR se detectó un aumento de apoptosis temprana y la fragmentación de ADN es un evento tardío en el proceso de apoptosis (21).

Los resultados obtenidos en este Trabajo concuerdan con lo informado por Elbim *et al.* (22) quienes trabajaron con el modelo de primates RMs infectados con SIV y en el que demostraron una exacerbación de la apoptosis temprana de neutrófilos en la fase aguda de la infección, coincidente con el pico de replicación viral; estos autores postularon que la muerte temprana incrementada puede tener relación con la disminución de neutrófilos circulantes que ocurre en la etapa inicial de la infección por SIV, lo que tendría importantes implicancias en la replicación viral y en la progresión de la enfermedad. En individuos infectados con VIH, Pitrak *et al.* (12) determinaron un aumento de la apoptosis de neutrófilos de pacientes con SIDA (<200 LT-CD4⁺/μL), siendo éste un defecto intrínseco y no un efecto de factores séricos endógenos (12). Resultados similares fueron informados por Mastroiani *et al.* (15) en pacientes con SIDA antes de iniciar el TAR con inhibidores de la proteasa y por Salmen *et al.*, en pacientes con infección asintomática pero con recuentos ≥ 200 LT-CD4⁺/μL (46).

El aumento de la apoptosis de los neutrófilos de los pacientes con infección por VIH asintomática sin TAR, podría justificar el valor absoluto disminuido de neutrófilos hallados en este trabajo, respecto a controles sanos y pacientes VIH seropositivos con TAR. La relación entre aumento de apoptosis y neutropenia ha sido documentada por varios autores, entre ellos, Kuritzke (24), Baldelli *et al.* (13), Salmen *et al.* (14) quienes han reportado que el aumento de la apoptosis de neutrófilos podría explicar, en parte, la neutropenia observada cuando los pacientes son diagnosticados con SIDA (24). Sin embargo, en esta Tesis se demostró una disminución del número absoluto de

neutrófilos desde los estadios iniciales de la infección, o sea desde la etapa asintomática, y que podrían condicionar la instauración de infecciones oportunistas y ser responsable de alguna de las manifestaciones clínicas iniciales.

En este Trabajo, seguidamente se decidió evaluar la participación de las caspasas en la muerte por apoptosis de neutrófilos evidenciándose un aumento significativo de la actividad de caspasa -3 en los pacientes VIH asintomáticos sin TAR, respecto a controles sanos y pacientes VIH con TAR. Sin embargo, no se encontró activación de caspasa -8 (caspasa iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis) ni de la caspasa -9 (iniciadora de la vía intrínseca). Estos resultados indican que la apoptosis de los neutrófilos de pacientes con infección asintomática por VIH y con un corto tiempo de seroconversión (12 meses), podría no ser dependiente de la activación de la vía extrínseca o intrínseca, lo que debería ser confirmado con metodologías adicionales. La apoptosis de neutrófilos aumentada que se demostró en este trabajo, sin activación de caspasas -8 y -9, sugiere otros mecanismos de inducción de esta muerte celular que podrían activarse durante el curso de la infección. Estos resultados coinciden en parte con lo demostrado por Salmen *et al.* (23) quienes reportaron que en la infección crónica por VIH, con un tiempo medio de seroconversión de 67,9 meses, la apoptosis espontánea de neutrófilos es dependiente de caspasa -3, pero independiente de caspasa -8, lo que sugiere que la vía intrínseca estaría involucrada en esta muerte celular. Estos autores, demostraron que la apoptosis espontánea aumentada es consecuencia del aumento basal de la producción de ROS. Es sabido que ROS afectan la vía intrínseca de apoptosis, pero también pueden inducir apoptosis interfiriendo en la activación de mecanismos de supervivencia mediados por NF- κ B y MAPKs (del inglés, *Mitogen activated protein kinase*) (23). La inhibición de las MAPKs (ERK y p38) aumenta la muerte constitutiva de los neutrófilos en los pacientes. Se ha descrito que ERK (14), regula la supervivencia a través de la inactivación de las caspasas -9 y -3 y que p38 (23) lo haría inactivando las caspasas -8 y -3. Por su parte, Anita *et al.* afirman que la apoptosis puede ser caspasa independiente (17). Si bien se ha demostrado que la activación de caspasas es esencial en la apoptosis inducida por ligandos, aún no está claro si lo es en la apoptosis espontánea de neutrófilos. Existen discrepancias en los resultados obtenidos en la evaluación de caspasas y en los niveles de apoptosis, debido quizás a las diferentes muestras de donde se obtienen los neutrófilos, a los métodos utilizados para purificarlos, a las técnicas empleadas para medir apoptosis, al tiempo transcurrido en el procesamiento de las muestras y/o a la fuente de obtención y a la

concentración de inhibidores de caspasas utilizados en los ensayos para inhibir la apoptosis (25).

Entre otros mecanismos propuestos acerca de la apoptosis de neutrófilos en pacientes VIH sin TAR, Lichtner *et al.* (26) demostraron que la apoptosis de neutrófilos de pacientes con SIDA está mediada por calpainas. Por lo expuesto, aún no han sido totalmente dilucidados los mecanismos involucrados en la apoptosis de neutrófilos en pacientes con infección por VIH. Por lo tanto, los hallazgos realizados en esta Tesis permiten delinear futuros estudios para evaluar vías de activación de la apoptosis en neutrófilos en etapas tempranas de la infección por VIH.

Si bien, en este Trabajo no se encontraron correlaciones entre apoptosis y niveles de LT-CD4⁺ y carga viral, el hecho que en los pacientes VIH seropositivos con TAR los niveles de neutrófilos muertos por apoptosis temprana desciendan significativamente, podría indicar que el aumento de apoptosis en los pacientes sin TAR estaría relacionado con la replicación viral. Esta observación está en consonancia con el trabajo de Elbim *et al.* (11) realizado en RMs donde demostraron que el aumento temprano de muerte de los neutrófilos, en la fase aguda de la infección por SIV, coincide con el pico de la replicación viral y que el nivel de neutrófilos muertos fue mayor en RMs que progresaron más rápido a la etapa SIDA, coincidiendo con la neutropenia. Por otro lado, Pitrak *et al.* (12) y Salmen *et al.* (14,27) demostraron que en la infección por VIH, la mayor muerte espontánea de los neutrófilos no se correlaciona con los niveles de carga viral ni el número de LT-CD4⁺.

Los defectos funcionales de los neutrófilos en la infección por VIH podrían deberse, al menos en parte, al aumento de la apoptosis constitutiva como consecuencia de la infección (12). Un aumento de la apoptosis de los neutrófilos en la infección por VIH puede desempeñar un papel clave en la replicación viral temprana y la diseminación dentro del huésped (28). Los neutrófilos pueden controlar la replicación de VIH y eliminar el virus. El control de la replicación viral y de la transmisión del virus los pueden llevar a cabo a través de las α -defensinas liberadas desde los gránulos azurófilos. Zhang *et al.* (29) fueron los primeros en describir la actividad de las α -defensinas en la defensa contra el VIH. Wu *et al.* reportaron que las α -defensinas 1-4 producidas por los neutrófilos pueden inhibir la replicación de VIH *in vitro*, bloqueando principalmente la entrada del virus en las células blanco, ya sea impidiendo la fusión de la glicoproteína gp 120 de la envoltura del virus a CD4 y a los correceptores, como así también, disminuyendo la expresión de CD4 y de CXCR4 en las células blanco. Por otro lado, se ha reportado que las α -defensinas inhiben

distintas etapas de la transcripción e integración del ciclo viral (30,31). Seidel *et al.* (31) demostraron la participación de las β -defensinas, aisladas en seres humanos, y de θ - defensinas, aún no aisladas en seres humanos, en el control de del virus. Por otro lado, las altas concentraciones de α -defensinas encontradas en mujeres infectadas con VIH, especialmente en la leche materna, podrían prevenir la transmisión de la infección (32). Además de la acción directa contra el virus, las α y β defensinas pueden modular la respuesta inmune adaptativa, reclutando células T vírgenes y células dendríticas al sitio de infección, mejorando las funciones antígeno-específicas de células T, induciendo proliferación de linfocitos T y B (33) y aumentando la producción de IFN- γ y perforina por LT-CD4⁺ y LT-CD8⁺, respectivamente (34).

Los neutrófilos también pueden ejercer efectos inhibitorios sobre el virus mediante la liberación de péptidos antimicrobianos contenidos en sus gránulos, como lactoferrina e indolicidina (35). Recientemente, Saitoh *et al.* (36) demostraron que los neutrófilos activados, pueden promover la eliminación del virus mediante la formación de NETs como consecuencia de la generación de ROS y también mediante la acción de α -defensinas y MPO. Previamente, Klebanoff *et al.* (37) reportaron que, bajo condiciones experimentales, la liberación de MPO y H₂O₂ por neutrófilos activados puede generar agentes tóxicos para el VIH.

Por otro lado, se ha demostrado que el VIH o proteínas liberadas por él, alteran las funciones de los neutrófilos produciendo disminución de la quimiotaxis, de la fagocitosis de bacterias extracelulares, de la producción de péptidos antimicrobianos, de la producción de ROS, de la polimerización de actina y de la producción de citocinas (28). El virus o sus componentes también modifican la expresión de moléculas de adhesión y producen un aumento de la activación basal de los neutrófilos en reposo (38).

2. Expresión de moléculas en la superficie de neutrófilos

La respuesta alterada de los neutrófilos asociada con la apoptosis se acompaña de una alteración en la expresión y función de las moléculas de adhesión de superficie y receptores involucrados en la activación de estas células. En este Trabajo, se evaluó el nivel de expresión de CD62L, CD16 y CD11b en neutrófilos de pacientes infectados con VIH y en controles sanos.

La L-selectina (CD62L) es una molécula expresada en la superficie de leucocitos con funciones de adhesión y señalización (39), que dirige el tráfico de los neutrófilos hacia los sitios de activación endotelial participando, de esta manera, en las etapas iniciales de la respuesta inflamatoria. Después de la activación de los neutrófilos, la CD62L es clivada por una metaloproteinasa liberándose de la superficie celular (40). En este Trabajo se determinó una disminución del porcentaje de neutrófilos que expresan CD62L, así como de la cantidad de moléculas de CD62L por neutrófilo, en pacientes con infección asintomática por VIH sin TAR. Esta disminución se correlacionó positivamente con los niveles de LT-CD4⁺, es decir, que a mayor compromiso inmunológico hay menor expresión de CD62L en los neutrófilos. En pacientes con niveles de LT-CD4⁺ inferiores a 500 células/ μ L, se encontraron niveles de expresión de CD62L significativamente más bajos.

Estos resultados concuerdan con lo informado por Elbim *et al.* (38) quienes mostraron que la expresión de CD62L en neutrófilos no estimulados estaba significativamente disminuida en pacientes con infección asintomática por VIH, pero no en pacientes en estado avanzado de la enfermedad, comparado con controles no infectados. Resultados similares fueron reportados por Meddows-Taylor *et al.* (41), quienes observaron que la IMF de CD62L en neutrófilos estaba significativamente disminuida en niños infectados por VIH con compromiso inmunológico leve respecto a controles no infectados, pero no en niños con enfermedad severa. Sin embargo, los resultados de este Trabajo contrastan con lo reportado por Hayes *et al.* (42), quienes informaron una disminución significativa de la expresión de CD62L en neutrófilos de pacientes con infección por VIH pero al comienzo de la etapa SIDA. La menor expresión de CD62L en los pacientes con mayor compromiso inmunológico, que podría deberse en parte a una mayor activación del sistema inmune, sugieren una migración leucocitaria anormal, contribuyendo al progresivo deterioro inmune (40).

Estudios realizados en ratones deficientes en L-selectina muestran una migración alterada de neutrófilos, linfocitos y monocitos a los sitios de inflamación (43). Teniendo en cuenta la participación de la CD62L en el rodamiento y tráfico de los neutrófilos, la disminución de su expresión en individuos con infección por VIH, podría sugerir una migración leucocitaria anormal *in vivo* alterando la composición celular en los sitios de inflamación, lo que sumado a otros defectos inmunes, podría contribuir al progresivo deterioro inmune (40) aumentando de esta manera la susceptibilidad a desarrollar infecciones microbianas (41).

En relación a los niveles de expresión de CD16, en este Trabajo se encontró una disminución significativa en el porcentaje de neutrófilos que expresaron esta molécula en pacientes VIH sin TAR, respecto a controles sanos, mientras que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la expresión, medida como IMF, entre neutrófilos de pacientes infectados con VIH y controles sanos. Además, se determinó una correlación positiva significativa entre la expresión de CD16 y los niveles de LT-CD4⁺, lo que indica que a mayor compromiso inmunológico hay menor expresión de CD16. Además, se comprobó que la intensidad de expresión de CD16 disminuyó progresivamente con el avance de la muerte por apoptosis de los neutrófilos de pacientes VIH sin TAR, demostrando de esta manera, que la expresión de esta molécula de adhesión está asociada a la apoptosis.

Previamente, Homburg *et al.* (44), en estudios realizados en neutrófilos de individuos sanos activados a 37°C durante 15 minutos y posteriormente cultivados a 37°C durante 24 horas, demostraron que la pérdida de expresión de CD16 no era debida a la activación de las células sino a su muerte por apoptosis. Describieron que la reducción de la expresión de CD16 se asociaba a la apoptosis de los neutrófilos, evidenciada por los cambios morfológicos característicos y por la unión de Anexina V, y que podía revertirse con el agregado de GM-CSF, que retarda la apoptosis de los neutrófilos. Estos autores informaron la presencia de una población de neutrófilos con expresión de CD16^{bajo} y otra con CD16^{alto}; los neutrófilos apoptóticos fueron los que expresaban CD16^{bajo}. La relación con la apoptosis no fue observada con otras moléculas de superficie. Resultados similares fueron informados por Dransfield *et al.* (45) quienes al evaluar la expresión de moléculas de adhesión, luego de la apoptosis de neutrófilos en cultivo, concluyeron que la expresión de CD16 podría ser considerada para distinguir neutrófilos no apoptóticos (CD16^{alto}) de neutrófilos apoptóticos (CD16^{bajo}), ambos presentes en el cultivo. Más aún, consideraron que esos hallazgos podían indicar que, además de la alteración de la expresión de receptores provocada por la activación de los neutrófilos, la alteración específica de receptores de superficie podría deberse al proceso de muerte por apoptosis.

En pacientes infectados con VIH y *Mycobacterium tuberculosis*, Meddows-Taylor *et al.*, (46) encontraron una disminución significativa en el porcentaje de neutrófilos y en la IMF de expresión de CD16. La falta de correlación con los niveles de LT-CD4⁺ sugirió que la disminución de CD16 era independiente al estadio de la infección por VIH y que, más bien, era exacerbada por la presencia de *Mycobacterium*. También encontraron una población de neutrófilos CD16-negativos (CD16⁻) con

expresión normal de otros receptores de la misma familia, lo que indicaba que la pérdida de CD16 era un defecto específico y no una pérdida generalizada de receptores.

En este Trabajo de Tesis, también se encontró una población de neutrófilos con expresión de CD11b^{intermedio}CD16⁻ significativamente aumentada en pacientes VIH seropositivos sin TAR respecto a pacientes VIH seropositivos con TAR y a controles sanos. En los pacientes VIH con TAR, esta población también estuvo significativamente aumentada respecto a controles sanos. Estos hallazgos indican que el VIH o sus componentes condicionan la aparición de esta población de neutrófilos que no expresan CD16, o lo expresan disminuido, y que se correspondería con la de neutrófilos muertos por apoptosis por acción directa del virus o sus componentes.

Bangani *et al.* (47) investigaron la opsonofagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis*, mediada por receptores para el complemento y para la IgG, en neutrófilos de pacientes con infección por VIH asintomática con < 350 LT-CD4⁺/μL, y la influencia del suero de los pacientes en este proceso. Utilizando suero inactivado por calor, demostraron que disminuía la internalización del bacilo. A pesar de la importancia de receptores del complemento en la fagocitosis de *Mycobacterium*, observaron que la mayor reducción de la fagocitosis se producía al bloquear CD16. Esto demostró que en pacientes con infección por VIH, disminuye la capacidad fagocítica mediada por receptores de la IgG, pudiendo deberse en parte, a la disminución de la expresión de CD16 en los neutrófilos de los pacientes infectados. Por otro lado, en relación a defectos en la capacidad fagocítica de los neutrófilos, se ha observado que el VIH inhibe la formación de fagosoma a través de la proteína Nef, al alterar las membranas de los endosomas (48).

En relación a la expresión de CD11b, en este Trabajo de Tesis, se encontró que el porcentaje de neutrófilos que expresaban CD11b y la IMF fue similar en pacientes VIH sin TAR, con TAR y en controles sanos.

Existen controversias en la información publicada por distintos autores sobre la funcionalidad de los neutrófilos en la infección por VIH. Se han reportado resultados contradictorios en cuanto a la quimiotaxis, fagocitosis, estallido respiratorio y expresión de receptores de superficie de neutrófilos (38). Algunos autores, como Nielsen *et al.* (49) y Palmer *et al.* (50), encontraron que los neutrófilos de pacientes infectados presentaban respuestas normales o aún aumentadas, mientras que otros, encontraron que tanto los neutrófilos en reposo como los estimulados tenían alteradas sus funciones (28,51). Probablemente estas diferencias tengan que ver con el estadio

de la infección o con la manipulación de los neutrófilos en los ensayos, que podrían alterar la expresión de los receptores (52). Elbim *et al.* (38) en ensayos realizados en neutrófilos de sangre entera de pacientes infectados con VIH en distintos estadios de la enfermedad, encontraron que en todos los pacientes los neutrófilos estaban activados, estado reflejado por el aumento de la expresión de CD11b/CD18, disminución de la expresión de CD26L, aumento de la polimerización de actina y aumento de la producción de ROS. En neutrófilos no estimulados, mostraron que la expresión de CD11b aumentaba en los pacientes infectados, respecto a controles sanos y que ese aumento era mayor incubando los neutrófilos con PBS a 37°C. No encontraron diferencia significativa de expresión de CD11b/CD18 entre los neutrófilos de pacientes con distintos niveles de compromiso inmunológico. Cloke *et al.* reportaron los mismos resultados (53) .

La discrepancia con los resultados presentados en este Trabajo de Tesis, podría deberse a las diferentes condiciones en que se realizaron los ensayos, ya que fueron obtenidos a partir de la marcación de los neutrófilos en muestras de sangre entera, sin previa incubación a diferentes temperaturas que podrían interferir en la expresión de las moléculas de superficie.

Por otro lado, si bien en este Trabajo tampoco se encontraron diferencias significativas en la expresión de CD11b en los neutrófilos entre los pacientes VIH sin TAR en etapa 1 y en etapa 2 de la infección, según clasificación del CDC (54), un hallazgo interesante fue que en los pacientes con LT-CD4⁺ entre 200 y 499/ μ L, se diferenciaron dos poblaciones de neutrófilos con distintos niveles de IMF de expresión: una CD11b^{alto} y la otra CD11b^{bajo} . La presencia de estas subpoblaciones de neutrófilos, sugiere que la instauración de un mayor compromiso inmune afectaría la expresión de esta molécula de superficie.

Además, en la población de neutrófilos CD11b⁺, se analizó la expresión de CD16 y de CD62L. Se determinó que el porcentaje de neutrófilos que coexpresaban CD11b y CD16 (CD11b⁺/CD16⁺) fue significativamente menor en pacientes VIH sin TAR comparado con controles sanos y pacientes VIH con TAR. En relación a la expresión de CD11b y CD62L, se comprobó que el porcentaje de neutrófilos que coexpresaban esos antígenos (CD11b⁺/CD62L⁺) disminuyó significativamente en los pacientes infectados con VIH con y sin TAR, respecto a controles sanos.

Por otro lado, en pacientes infectados con VIH se observaron neutrófilos que expresaban CD11b, pero no expresaban CD16 o CD62L. Los porcentajes de neutrófilos CD11b⁺/CD16⁻ fueron significativamente superiores en los pacientes VIH

sin TAR, respecto a controles sanos y pacientes VIH con TAR. La población de neutrófilos que expresaba CD11b^{alto} también expresaba CD16 con alta intensidad (CD11^{alto}CD16^{alto}), mientras que la población CD11b^{intermedio} no expresaba CD16 y por lo tanto, esta población fue designada CD11b^{intermedio}CD16⁻. Este fue otro hallazgo interesante que sugiere que la infección por VIH condiciona la aparición de estas subpoblaciones de neutrófilos pero el TAR modularía la coexpresión de estas moléculas de superficie en neutrófilos.

Las subpoblaciones de neutrófilos caracterizadas en esta Tesis son similares a la de los neutrófilos con alteraciones fenotípicas encontradas en sangre periférica de pacientes con infección por VIH y reportadas y por Cloke *et al.* (53). Las subpoblaciones encontradas en este Trabajo muestran los fenotipos de neutrófilos inmaduros hallados por Fujimoto *et al.* (55) en estudios realizados en neutrófilos de muestras de sangre entera de pacientes con afecciones inflamatorias o infecciosas. En individuos sanos, normalmente estas células inmaduras se encuentran en médula ósea, pero no en sangre periférica. En individuos sanos, todos los neutrófilos expresaron CD11b y CD16, mientras que en los pacientes encontraron tres poblaciones de neutrófilos: CD11b⁻/CD16⁻ (inmaduros grado 1), CD11b⁺/CD16⁻ (inmaduros grado 2) y CD11b⁺/CD16⁺ (maduros).

Si bien, como se mencionó anteriormente, en este Trabajo no se encontró una expresión aumentada de CD11b en los neutrófilos de los pacientes VIH sin TAR, al comparar la expresión de CD11b en neutrófilos viables y apoptóticos, se observó un aumento de la IMF en células en apoptosis temprana respecto a células viables, lo que podría interpretarse como una mayor activación.

En relación a la carga viral, no hubo correlación con la expresión de CD62L, CD16 y CD11b en pacientes con infección por VIH sin TAR. Gaddi *et al.* (40) determinaron que los niveles de expresión de CD62L en neutrófilos de niños con infección por VIH sin TAR, sería reflejo de cambios en los patrones de secreción de citocinas observados en estadios de mayor compromiso inmunológico. Estos autores, no encontraron correlación entre los niveles de expresión de CD62L y los valores de carga viral.

En la infección por VIH ha sido identificada la expansión de una población de neutrófilos inmunosupresores (56) y denominados como células granulocíticas supresoras derivadas de las mieloides (G-MDSC, del inglés *granulocytes myeloid-derived suppressor cells*). Aunque el origen de estas células continúa en debate, está bien establecido que la heterogeneidad morfológica, fenotípica y funcional es un sello

de esta población. Las MDSC se caracterizan por su origen mieloide y por su potente capacidad para suprimir diferentes aspectos de la respuesta inmune, especialmente la proliferación de células T y la producción de citocinas. La expansión de MDSCs representa un mecanismo de retroalimentación negativa del sistema inmunológico que previene el daño potencial causado por la inflamación crónica.

Estudios sobre las MDSC han encontrado que algunas de estas células están presentes en la fracción de células mononucleares obtenidas mediante un gradiente de sedimentación con Ficoll y han reportado que los marcadores de superficie de estas células son similares a los de granulocitos. Esto sugiere que las G-MDSC son un subconjunto de neutrófilos activados con un fenotipo de neutrófilos de baja densidad (LDN, del inglés *low-density neutrophil*) y que también copurifican dentro de la fracción de células mononucleares en un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (57,58). En la actualidad no está claro si los LDN/G-MDSC se originan por granulopoyesis a partir de progenitores supresores en la médula ósea o si representan un subconjunto funcional de neutrófilos que adquirieron el fenotipo inmunosupresor en respuesta a señales específicas en la periferia (59). Si los LDNs y las G-MDSC representan poblaciones celulares únicas o neutrófilos convencionales polarizados por su microambiente, permanece bajo intenso debate.

En sujetos sanos se ha identificado una población de neutrófilos inmunosupresores CD16⁺ CD62L^{bajo} después de la inyección de una dosis baja de LPS y que inhibe la función de células T por liberación local de H₂O₂ en la sinapsis inmunológica entre el neutrófilo y las células T (60). Por otro lado, estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento con estímulos proinflamatorios incluyendo GM-CSF, IL-6, IFN- γ , TNF, LPS o medios condicionados de tumor promueven la activación y el aumento de la frecuencia de las G-MDSC (61,62).

Bowers *et al.* (63) demostraron una población de LDN supresores en sujetos infectados con VIH en un estadio avanzado de la infección. La población supresora fue identificada como neutrófilos de baja densidad que expresan el fenotipo de G-MDSC (SSC^{alto} CD15⁺ CD33^{+/intermedio} CD11b⁺ CD16⁺ CD66b⁺ HLA-DR^{-/bajo}). Por otro lado, Vollbrecht *et al.* (56) demostraron una expansión de G-MDSC CD15⁺ CD33^{+/intermedio} CD11b⁺ en la infección por VIH.

Las G-MDSC tienen una notable capacidad para suprimir las respuestas inmunes mediadas por células T mediante múltiples mecanismos incluyendo la producción de arginasa-1, lo que resulta en un agotamiento de la arginina y una

regulación de la cadena ζ del receptor de células T, producción de ROS y de citocinas regulatorias e inducción de las células T reguladoras (59,64).

Desde estadios iniciales de la infección por VIH se produce un daño extenso de la barrera de la mucosa intestinal y la translocación de productos bacterianos en la circulación sistémica (65) y es posible que esta translocación y las citocinas proinflamatorias asociadas promuevan la inducción de G-MDSC/LDNs en estadios avanzados de la enfermedad y que contribuyen a la desregulación inmune asociada con el SIDA. En los pacientes infectados por VIH, la progresión de la enfermedad influye en el fenotipo de neutrófilos: en la etapa inicial, fenotipo de neutrófilos proinflamatorios y a medida que avanza la infección cambia a un fenotipo de neutrófilos inmunosupresores. Este nuevo mecanismo de supresión inmune mediada por neutrófilos puede alterar nuestra comprensión de la patogénesis del VIH y dar lugar a un diseño de nuevas terapias dirigidas a la pérdida de la función inmune en los individuos infectados con VIH.

25. Expresión de los receptores de superficie TLR2 y CD95

Los neutrófilos constituyen la primera línea de defensa contra patógenos, reconociendo su presencia a través de PRR en los sitios de inflamación. En la infección por VIH el rol de los PRR, incluyendo los TLRs, aún no ha sido aclarada; poco se sabe acerca de la expresión y funcionamiento de los TLR en la respuesta mediada por neutrófilos expuestos al VIH (66). Entre los TLR, TLR3, TLR7/TLR8 y TLR9 reconocen componentes virales como ARN de simple y doble cadena y nucleótidos CpG (citosina, fosfato, guanina) del ADN, respectivamente (67), desempeñando un rol muy importante en las infecciones por influenza, VHC, VHB, herpes simplex 2, West Nile y Dengue (68,69). Los neutrófilos se activan al reconocer el VIH-1, o sus productos a través de TLR7/8, aumentando la liberación de ROS y secretando citocinas proinflamatorias, que favorecen la replicación viral (36).

El reciente trabajo publicado por Giraldo *et al.* (66), quizás sea el primero en demostrar *in vitro* la expresión y funcionamiento de los TLR de neutrófilos expuestos al VIH, sugiriendo una posible interacción neutrófilo/ VIH a través de TLR. Poco después, Hernández *et al.* (70) publicaron los resultados de sus investigaciones sobre el nivel de expresión génica de PRR y la producción de citocinas luego de la activación de neutrófilos de pacientes VIH seropositivos, individuos seronegativos expuestos al VIH y controles sanos.

En individuos sanos, se ha documentado que los neutrófilos expresan todos los TLR, excepto TLR3 (71), siendo importantes reguladores de la activación y sobrevivencia de estas células. TLR2 y TLR4 son los principales TLR que participan, aunque de distintas maneras, en la regulación de la supervivencia de los neutrófilos (72). En base a estos antecedentes, uno de los objetivos de esta Tesis fue evaluar en neutrófilos de pacientes con infección por VIH, el nivel de expresión y funcionamiento de TLR2 y su relación con la apoptosis. En los pacientes con infección por VIH, el porcentaje medio de neutrófilos que expresaron TLR2 en su superficie fue mayor que en controles sanos, siendo este aumento estadísticamente significativo en los pacientes VIH sin TAR respecto a los controles sanos. Por otro lado, cuando se evaluó el número de moléculas de TLR2 en los neutrófilos, la IMF fue mayor en pacientes VIH sin TAR que la de los controles sanos y menor que la de pacientes VIH con TAR, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados, contrastan con los reportados por Hernández *et al.* (70), quienes hallaron una disminución significativa de la IMF de expresión de TLR2 en la superficie de neutrófilos de pacientes infectados con VIH, respecto a controles sanos pero no informaron la expresión en porcentaje de neutrófilos. Si bien la metodología para medir la expresión de TLR2 utilizada por estos autores fue la misma, ellos trabajaron con neutrófilos aislados de 9 pacientes infectados (4 pacientes sin TAR y 5 pacientes con TAR) pero sin evaluar por separado a los pacientes tratados y no tratados, mientras que los resultados informados en esta tesis se obtuvieron incluyendo a 38 pacientes VIH sin TAR y 40 con TAR, analizados por separado. A nuestro conocimiento, este trabajo de Tesis sería el primer estudio en medir la expresión de TLR2 en la superficie de los neutrófilos de sangre entera con un número significativamente mayor de pacientes infectados sin TAR y con TAR.

Giraldo *et al.* (66) reportaron una disminución de la expresión génica de TLR2 en neutrófilos de individuos sanos estimulados con VIH *in vitro*. Probablemente, la discrepancia con los resultados de este trabajo, sea debida, al menos en parte, a las diferentes metodologías utilizadas; ellos trabajaron estimulando neutrófilos aislados de individuos sanos con VIH y midieron la expresión génica de TLR.

La estimulación de TLR2 y TLR4 en neutrófilos de individuos sanos produce activación y modificaciones en la expresión de moléculas de adhesión e induce la liberación de citocinas y la producción de ROS. TLR4 es el principal regulador de la sobrevivencia de los neutrófilos, siendo mayor este efecto en presencia de monocitos (73).

TLR2 también previene la apoptosis constitutiva a corto plazo pero a diferencia de TLR4, la presencia de monocitos no inhibe la apoptosis tardía de los neutrófilos (72).

En este Trabajo se analizó el funcionamiento de TLR2 de neutrófilos de pacientes infectados con VIH en relación a la expresión de las moléculas de adhesión CD11b, CD16 y CD62L. En los pacientes infectados con VIH, los neutrófilos presentaron un fenotipo de célula activada, con disminución de la expresión de CD62L y de CD16, respecto a controles sanos, aunque no hubo diferencia en la expresión de CD11b entre pacientes infectados y controles sanos. Estos resultados concuerdan con lo informado por Hernández *et al.* (70), quienes encontraron una disminución significativa de la expresión basal de CD62L en neutrófilos de pacientes infectados respecto a controles, mientras que no encontraron diferencias en los niveles de expresión basal de CD11b entre neutrófilos de pacientes y controles. Al estimular TLR2, TLR4 y TLR7/8 con los respectivos agonistas en presencia o ausencia de VIH determinaron niveles de CD62L significativamente disminuidos respecto a controles, en respuesta a la estimulación de TLR2 y TLR7/8 con los agonistas solos y con la estimulación simultánea con VIH y agonistas. En relación a CD11b, observaron una tendencia de aumento de expresión tras la estimulación de los tres TLR con sus agonistas, pero sin significancia estadística; solamente hubo un aumento significativo de la IMF de expresión de CD11b en los pacientes, respecto a controles, cuando los neutrófilos fueron estimulados simultáneamente con VIH y agonista de TLR2 (74).

Por su parte, Giraldo *et al.* (66), luego de estimular neutrófilos de individuos sanos con VIH y/o con agonistas de TLR2, TLR4 y TLR7/8, demostraron que la estimulación con agonistas de TLR específicos en presencia de VIH, conduce a la activación de los neutrófilos (evidenciado por la disminución de los niveles de expresión de CD62L y aumento de CD11b), a la secreción de citocinas pro inflamatorias (como IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-8) y al aumento de la producción de ROS.

Todos estos resultados muestran claramente que el VIH puede modular la expresión de TLR en los neutrófilos.

En la infección crónica por VIH se ha reportado un aumento en la expresión de TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7 y también de ARNm de TLR8 (75) en células mononucleares de sangre periférica, que se correlaciona con la carga viral. Este aumento de expresión de TLR2 concuerda con lo hallado en este Trabajo de Tesis, en neutrófilos de pacientes asintomáticos sin TAR. Estos hallazgos, sugieren que el VIH puede desarrollar estrategias para evadir la respuesta inmune innata dependiente de TLR o regular la expresión de TLR para aumentar la diseminación viral, como se

ha observado con otros virus (76). Además, el VIH es capaz de provocar un desbalance en la producción de citocinas pro inflamatorias, generando un ambiente que contribuye a la patogénesis (77,78) y un aumento de la producción de ROS, que median uno de los principales mecanismos de supresión de células T por parte de los neutrófilos (79).

Respecto a la relación entre TLR y sobrevivencia o muerte de los neutrófilos, Sabroe *et al.* (72) reportaron que TLR2 y TLR4 serían los principales reguladores. Confirmaron que la estimulación de TLR4 con bajas dosis de LPS, prolonga la vida de los neutrófilos, inhibiendo la apoptosis temprana. Por el contrario, la estimulación de TLR2 (73) con un agonista específico (Pam₃CSK₄) tiene más efecto en la modificación de la expresión de CD62L y CD11b, que en prevenir la apoptosis. Esto también ha sido observado en la infección con peptidoglicano de *S. aureus*, con mínimos efectos en la sobrevivencia de los neutrófilos, mientras que peptidoglicano de *B. subtilis* ejerce un efecto antiapoptótico solo a altas concentraciones (80,81). A tiempos más largos de estimulación, los TLR de neutrófilos purificados no tenían efecto en la regulación de la sobrevivencia. Con el agregado de monocitos al cultivo, se recuperó la capacidad de prevenir muerte a largo plazo con LPS, que estimula TLR4, pero no con el agonista de TLR2 (72).

Los resultados de este Trabajo de Tesis son consistentes con lo informado por Sabroe *et al.* (72) en neutrófilos de individuos sanos activados con agonista de TLR2, quienes determinaron que esta activación no inhibe la apoptosis y que condiciona alteración de la expresión de moléculas de superficie. En los neutrófilos de pacientes con infección VIH sin TAR, sin ningún otro estímulo, se observó aumento de expresión de TLR2, alteración de la expresión de moléculas de adhesión y aumento de la apoptosis temprana, lo que estaría indicando que en estos pacientes, el VIH estaría no solo regulando la expresión de TLR2, sino también, su función induciendo el fenotipo activado de los neutrófilos y ejerciendo un efecto muy bajo o nulo para evitar la apoptosis temprana.

Las funciones alteradas de los neutrófilos en la infección por VIH, incluyendo la apoptosis espontánea acelerada, contribuyen a la progresión de la enfermedad y al desarrollo de SIDA (14). Los neutrófilos, luego de cumplir su función en los sitios de inflamación, deben ser removidos para evitar producir daño en los tejidos por su gran actividad oxidativa y proteolítica y por eso entran en el proceso de muerte celular programada de apoptosis. La apoptosis de neutrófilos, espontánea o inducida, es un mecanismo muy complejo en el que están implicadas distintas vías de activación y en

el que muchos factores intervienen para regular el balance de la relación sobrevivencia/muerte (82). Los neutrófilos de individuos sanos, expresan constitutivamente el receptor CD95/Fas/Apo1 que al activarse es capaz de mediar la apoptosis de varias células. Dado que la apoptosis de neutrófilos puede ser inducida mediante la activación de CD95 por entrecruzamiento con anticuerpos anti-Fas o mediante la interacción con FasL, éste fue uno de los mecanismos originariamente propuesto para explicar la apoptosis constitutiva de los neutrófilos (14).

En este Trabajo de Tesis, se evaluó la expresión de CD95 en neutrófilos de pacientes infectados y en controles sanos, con el fin de analizar si la apoptosis significativamente aumentada de neutrófilos, observada en los pacientes VIH sin TAR, tenía relación con este mecanismo. En pacientes VIH sin TAR se encontraron niveles de CD95, en porcentaje de neutrófilos e IMF, similares al de los controles y superiores a los niveles expresados en pacientes VIH con TAR, pero en ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas. El nivel de expresión de CD95 en neutrófilos de pacientes VIH sin TAR no tuvo correlación con la carga viral ni con los valores de LT-CD4⁺.

En coincidencia con estos resultados, Salmen *et al.* (14) encontraron niveles basales altos de expresión constitutiva de CD95 en neutrófilos de pacientes con infección por VIH asintomática y en controles sanos. Posteriormente estimularon los neutrófilos con PMA y a los 15 minutos de incubación, los niveles de CD95 disminuyeron tanto en controles como en pacientes, recuperándose parcialmente a los 60 minutos de incubación. No encontraron diferencias de expresión de CD95, en porcentaje y en densidad, entre pacientes VIH asintomáticos y controles sanos. Al igual que otros autores (83), en neutrófilos no estimulados de controles y pacientes, observaron que FasL se expresaba a bajas concentraciones. La estimulación con PMA, provocó un aumento significativo de la expresión de FasL en neutrófilos de pacientes infectados, respecto a controles sanos. En base a esos resultados y teniendo en cuenta el estado de activación inmune que presentan los pacientes infectados con VIH, sugieren que la coexpresión de Fas/FasL en la superficie de los neutrófilos, podría iniciar un proceso de muerte autócrino acelerado. En los neutrófilos de pacientes infectados, evidenciaron que el nivel significativamente aumentado de apoptosis espontánea no tenía correlación con la carga viral, pero, cuando activaron CD95 con anti-Fas IgM (CH-11), el aumento significativo de apoptosis en los pacientes se correlacionó con la carga viral y con la coexpresión Fas/FasL.

La importancia biológica del sistema Fas/FasL (84) ha sido ampliamente documentado en la apoptosis de linfocitos T, interviniendo en la eliminación de células autorreactivas y activando el suicidio inducido. Los linfocitos T maduros no expresan constitutivamente FasL, pero pueden hacerlo al activarse e iniciar el proceso que lleva al suicidio autócrino de las células T mediado por la unión de Fas con FasL. Los linfocitos T citotóxicos activados pueden inducir la muerte mediante FasL al activar Fas de las células blanco. La activación de células T también puede generar la secreción de una forma activa de FasL soluble que puede contribuir a la injuria sistémica de tejidos durante la inflamación. El aumento en la expresión de FasL en las células T y de FasL soluble están asociados con un aumento de la carga viral y con la progresión a SIDA (6).

Las células T de pacientes infectados con VIH, expresan niveles de Fas aumentados y presentan una mayor susceptibilidad a morir vía Fas, probablemente no inducida directamente por el virus, sino por algunos de sus componentes o por otros mecanismos (85).

En la infección por VIH, no han sido totalmente definidos los mecanismos intracelulares que conducen a la muerte de neutrófilos por apoptosis espontánea o inducida por Fas/FasL. Si bien parecen ser diferentes, no puede descartarse la posibilidad de que ambas ocurran simultáneamente, contribuyendo a la neutropenia y al desarrollo de infecciones secundarias con la evolución de la enfermedad (86).

27. Mediadores solubles inflamatorios

Las citocinas desempeñan un papel fundamental en el control de la homeostasis del sistema inmune y la infección por VIH produce una profunda disrupción del sistema de citocinas (78). Los pacientes que evolucionan hacia el SIDA presentan un perfil dominante Th2, es decir, disminución de la producción de IL-2 e IFN- γ y aumento de IL-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 (87,88). Este perfil puede facilitar la replicación viral y suprimir la respuesta celular del sistema inmune.

En este trabajo de Tesis, se detectaron niveles de IL-6 y de TNF significativamente aumentados en pacientes VIH seropositivos sin TAR, comparados con los de los controles sanos, hallazgo que indica un estado inflamatorio desde las etapas iniciales de la infección. También se determinó un aumento de los valores de PCR-as en dichos pacientes, pero la diferencia con los controles sanos no fue

significativa. Además, se determinaron correlaciones entre los niveles de IL-6 y de PCR-as con la carga viral y el estado inmunológico, respectivamente, pero no hubo asociación entre estos parámetros y los niveles de TNF.

Niveles séricos elevados de IL-6 y de PCR-as han sido reportados en diferentes estadios de la infección por VIH en pacientes sin TAR. En el estudio de Baker *et al.* (89), los niveles de IL-6, pero no los de PCR-as, estuvieron significativamente aumentados en individuos infectados con funciones inmunes relativamente conservadas. De manera similar, Ledwaba *et al.* (90) encontraron valores más altos de IL-6, pero no de PCR-as, en individuos con infección temprana por VIH en comparación con individuos no infectados. Sin embargo, en pacientes con enfermedad avanzada se reportaron aumento significativo de los niveles de IL-6 y de PCR-as (90-92). A diferencia de otros trabajos publicados, los resultados que se presentan en este Trabajo de Tesis, corresponden a pacientes VIH asintomáticos sin TAR, sin patologías asociadas a comorbilidad (que podrían influenciar los niveles de los marcadores) y sin manifestaciones clínicas previas de otras enfermedades asociadas. Además, los niveles de los tres marcadores de inflamación se compararon con controles sanos y se analizó la relación con el estado inmunológico y con la carga viral de los pacientes.

La activación persistente del sistema inmune se acompaña de una importante producción de citocinas proinflamatorias desde las etapas iniciales de la infección. Las citocinas asociadas a la inflamación pueden inducir una respuesta de fase aguda a través de un complejo sistema de señalización intercelular (93). Durante este proceso, varias proteínas son reguladas positivamente, incluyendo la PCR que es producida casi exclusivamente por los hepatocitos, siendo la IL-6 el principal estímulo para su producción. Además, otros tipos de células tales como adipocitos (94) y las células del músculo liso de las arterias coronarias (95) también producen PCR. En este Trabajo, a pesar del aumento de ambos marcadores inflamatorios sus niveles circulantes no se correlacionaron. Es posible que los niveles séricos de IL-6 sean más susceptibles a aumentar en respuesta a los estímulos patológicos en comparación con los niveles de PCR, que es probable que sean el resultado de un efecto acumulativo más crónico. Más aún, es sabido que otras citocinas además de la IL-6, tales como TNF, IL-1 y adipocinas, como la resistina, también influyen en la síntesis de PCR (94).

Por otro lado, en este trabajo se determinó una correlación positiva significativa entre los niveles de IL-6 y la carga viral, de manera similar a lo determinado en un grupo de pacientes incluidos en el programa de Estrategias para el Tratamiento de la

Terapia Antirretroviral (SMART) en el que los niveles elevados de IL-6 se asociaron con la viremia y con la mortalidad de los pacientes (96). Además, se determinó una correlación negativa significativa entre los niveles de PCR-as con los valores absolutos de LT-CD4⁺, pero no hubo asociación con los niveles de carga viral. Este hallazgo está en concordancia con un estudio previo en el que se determinó una correlación negativa entre la PCR-as y los recuentos absolutos de LT-CD4⁺ (97,98), mientras que los niveles de ARN del VIH tenían poca asociación con la PCR (99).

En el presente Trabajo, además, se hizo una nueva observación adicional que a nuestro conocimiento no se ha realizado previamente. En este sentido, se determinó una asociación de los niveles de LT-CD8⁺ con los niveles de PCR-as, pero no con IL-6. La infección por VIH determina una expansión de células T CD8⁺ en un contexto de depleción de células T CD4⁺ que podría estar relacionado con fuerzas homeostáticas en la regulación de estas dos poblaciones. La expansión de células T CD8⁺ puede ser impulsada por los niveles de ARN del VIH y el estado de inflamación asociado a la infección (100,101). En conjunto, estos resultados sugieren que en la fase asintomática de la infección por VIH los mecanismos que determinan un aumento de IL-6 y de PCR-as, son diferentes. En este sentido, los aumentos de IL-6 y de PCR no siempre se correlacionan, ya que IL-6 induce la producción de PCR sólo en ausencia de IFN- α (102). Los resultados presentados en este Trabajo, sugieren que el aumento de la IL-6 está asociado a la viremia, mientras que la inmunodeficiencia progresiva, en el contexto de la replicación del VIH no suprimida y de ausencia de manifestaciones clínicas, conduce a una etapa inflamatoria evidenciada por el aumento de la PCR. Posiblemente ésta sea la razón por la que no siempre se detecta un aumento conjunto de ambos biomarcadores de inflamación.

La activación inmune persistente, incluso durante el TAR, puede ser una causa potencial de muchas morbilidades durante la terapia supresora. En cuanto al impacto del TAR en los niveles de IL-6 y PCR, hay resultados contradictorios. Borato *et al.* (103) observaron un nivel significativamente más alto de PCR-as sólo en los pacientes que estaban recibiendo TAR, pero no en pacientes sin TAR. Resultados similares fueron obtenidos por Masiá *et al.* (104) y Guimaraes *et al.* (105). En un estudio (99) de pacientes con infección crónica por VIH se determinó que sólo un nivel de ARN del VIH ≥ 10.000 copias/ml se asociaba con un mayor nivel de IL-6 y que no había asociación con PCR. Otro estudio mostró que a viremias bajas (<50 copias/ml) había una asociación menor con marcadores de activación inmune, lo que implicaba una menor respuesta inflamatoria. En una cohorte del estudio Phidisa II (90) se observó

una disminución significativa de IL-6 y D-dímero, pero no de PCR-as, al sexto mes del inicio de la TAR, mientras que en el estudio SMART (106), los niveles de IL-6 y PCR se mantuvieron elevados incluso después de la supresión del ARN del VIH con TAR. Este ensayo también mostró que la IL-6 estaba fuertemente asociada con la mortalidad incluso en pacientes que alcanzaron la supresión viral. No está completamente determinado por qué algunas personas infectadas por el VIH pueden restaurar los niveles de marcadores de activación inmunológica a valores normales mientras que otros no.

En este Trabajo de Tesis, se trató de minimizar otras variables que pudieran afectar los niveles de IL-6 y de PCR-as, como la presencia de coinfecciones, manifestaciones clínicas y TAR. Una limitación de este estudio sería la falta de seguimiento prospectivo de los pacientes para poder evaluar los cambios en los niveles de IL-6 y de PCR-as durante la progresión de la enfermedad. A pesar de esta limitación, lo más importante es haber explorado las asociaciones entre IL-6 y PCR-as con el estado inmunológico y virológico de los pacientes. En conclusión, los resultados indican que en la fase asintomática o de latencia clínica de la infección por el VIH se instaura una respuesta inflamatoria y que la viremia y la inmunodeficiencia se asocian a un aumento de los niveles circulantes de IL-6 y de PCR, respectivamente.

Los pacientes con infección crónica por VIH manifiestan niveles elevados de TNF (107,108). Estudios *in vitro* han demostrado que el TNF puede contribuir a la replicación aumentada del VIH (109,110) al mantener la viabilidad de LT-CD4⁺ infectados contribuyendo así a la formación de reservorios virales. En este Trabajo, los pacientes con infección por VIH sin y con TAR manifestaron niveles elevados de TNF en relación a controles sanos. En pacientes con mayor compromiso inmunológico (LT-CD4⁺<500/ μ L) se detectaron mayores niveles de TNF. Keating *et al.* (111) informaron niveles elevados de TNF en mujeres en el estadio crónico de la infección y sin TAR cuando se compararon con mujeres no infectadas. El TAR indujo una disminución en los niveles de TNF. Sin embargo, los resultados con respecto al efecto del TAR sobre los niveles de TNF son contradictorios. Pontes-Cardoso *et al.* (112) determinaron un aumento de TNF en pacientes con TAR y lipodistrofia respecto a pacientes con TAR y sin lipodistrofia. Ledru *et al.* (113) demostró que el efecto directo de los inhibidores de la proteasa sobre las proteasas celulares también tiene que ser considerado como un mecanismo que contribuye a la acumulación de células T, productoras de TNF. Por lo tanto, tal polarización de las células T para sintetizar TNF parece favorecer la lipodistrofia al contribuir a los cambios en el metabolismo de los

lípidos. En otro estudio, los mismos autores (114) no observaron un aumento del perfil de citoquinas Th2 en pacientes infectados por el VIH, incluso aquellos bajo tratamiento HAART. En base a los distintos estudios de la bibliografía, los niveles circulantes elevados de TNF de individuos infectados con VIH deben considerarse como un marcador de progresión de la enfermedad.

En relación a la apoptosis, Chen *et al.* (115) evidenciaron que TNF induce apoptosis de neutrófilos humanos por una vía caspasa independiente mediada por la producción de ROS y de la actividad de calpainas. Las infecciones microbianas están acompañadas por una importante respuesta del huésped, incluyendo la liberación de citocinas proinflamatorias, que alteran la apoptosis de los neutrófilos. En general, la mayoría de los mediadores inflamatorios están asociados con el retraso de la apoptosis espontánea de los neutrófilos e incluyen factores, tales como IL-1 β , IL-6, IL-8, GRO- α , PAF, IFN- γ , G-CSF, C5a y GM-CSF. En contraste con otros mediadores proinflamatorios, TNF es la única citocina con efectos pro y antiapoptóticos. La sobrevivencia de los neutrófilos se asocia a niveles bajos de TNF mientras que los efectos apoptóticos se asocian a niveles elevados.

Por lo señalado, tanto en condiciones fisiológicas como en procesos infecciosos, incluyendo al VIH, los neutrófilos están expuestos a factores apoptóticos y no apoptóticos. El efecto final en la sobrevivencia o muerte de los neutrófilos dependerá del balance de la presencia y de la actividad de esos factores.

28. Bibliografía

1. Bastian A, Schäfer H. Human α -defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept.* 2001;101:157-61.
2. Yasin B, Wang W, Pang M, et al. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J Virol.* 2004; 78:5147-56.
3. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, et al. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 2000;177:195-203.
4. Van Gisbergen KP, Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TBH, et al. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation- dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med.* 2005;201:1281-92.
5. Biswas P, Mantelli B, Sica A, et al. Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. *Blood.* 2003; 101:4452-56.
6. Salmen S, Guillermo C, Colmenares M, et al. Papel del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en la apoptosis de leucocitos de pacientes infectados. *Invest Clin.* 2005; 46: 289-305.
7. Pitrak DL. Neutrophil deficiency and dysfunction in HIV-infected patients. *Am J Health Syst Pharm.* 1999; 56: S9-16.
8. Murphy PM, Lane HC, Fauci AS, et al. Impairment of neutrophil bactericidal capacity in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1988 ;158:627-30.
9. Pitrak DL, Bak PM, DeMarais P, et al. Depressed neutrophil superoxide production in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1993; 167:1406-10.
10. Bandres JC, Trial J, Musher DM, et al. Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophils and monocytes of men with stage 1 human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1993;168:75-83.
11. Elbim C, Monceaux V, Mueller YM, et al. Early divergence in neutrophil apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *J Immunol.* 2008; 181:8613-23.
12. Pitrak DL, Tsai HC, Mullane KM, et al. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest.* 1996;98:2714-19.
13. Baldelli F, Preziosi R, Francisci D, et al. Programmed granulocyte neutrophil death in patients at different stages of HIV infection. *AIDS.* 2000;14:1067-69.
14. Salmen S, Teran G, Borges L, et al. Increased Fas-mediated apoptosis in

- polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*. 2004;137:166-72.
15. Mastroianni CM, Mengoni F, Lichtner M, et al. Ex vivo and in vitro effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on neutrophil apoptosis. *J Infect Dis*. 2000;182:1536-39.
 16. Galluzi L, Vitale I, Abrams J, et al. Molecular definitios of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death and Differ*. 2012; 19:107-20.
 17. Anita HP, Paras J, Patnaik A. Apoptosis (programmed dell death)- A review. *World J Pharm Res*. 2014;3:1854-72.
 18. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death and Differ*. 2009;16:1093-107.
 19. Mascotti K, Mcculloug J, Burger SR. HPC viability measurement: trypan blue versus acridine orange and propidium iodide. *Transfusion*. 2000;40:693-96.
 20. Zhivotosky B. Assessment of Apoptosis and Necrosis by DNA Fragmentation and Morphological Criteria. *Curr Protoc Cell Biol*. 2001;18.3.1-18.3.23.
 21. Collins JA, Schandl CA, Young KK, et al. Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 1997;45:923-34.
 22. Elbim C, Katsikis PD, Estaquier J. Neutrophil apoptosis during viral infections. *Open Virol Journal*. 2009;3:52-9.
 23. Salmen S, Montes H, Soyano A, et al. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: Role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathway. *Clin Exp Immunol*. 2007;150:539-45.
 24. Kuritzkes DR. Neutropenia, Neutrophil Dysfunction and Bacterial Infection in Patients with Human Immunodeficiency Virus Disease: The Role of Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Clin Infect Dis*. 2000;30:256-60.
 25. Lou HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms and regulation. *Am J Hematol*. 2008;83:288-95.
 26. Lichtner M, Mengoni F, Mastroianni CM, et al. HIV protease inhibitor therapy reverses neutrophil apoptosis in AIDS patients by direct calpain inhibition. 2006. DOI: 10.1007/s10495-006-5699-5
 27. Salmen S, Berrueta L, Montes H. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. 2007;1:29-44.

28. Casulli S, Elbim C. Interactions between human immunodeficiency virus type 1 and polymorphonuclear neutrophils. *J Innate Immun.* 2014;6:13-20.
29. Zhang L, Yu W, He T, Yu J, et al. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science.* 2002;298:995–1000.
30. Demirkhanyan LH, Marin M, Padilla-Parra S, et al. Multifaceted mechanisms of HIV-1 entry inhibition by human α -defensin. *J Biol Chem.* 2012;287:28821-38.
31. Seidel A, Ye Y, de Armas LR, et al. Cyclic and Acyclic Defensins Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type-1 Replication by Different Mechanisms. *PloSOne.* 2010; 5:e9737.
32. Kuhn L, Trabattoni D, Kankasa C, et al. Alpha-defensins in the prevention of HIV transmission among breastfed infants. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;39:138-42.
33. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science.* 1999;286:525-28.
34. Mohan T, Sharma C, Bhat AA, et al. Modulation of HIV peptide antigen specific cellular immune response by synthetic α - and β -defensin peptides. *Vaccine.* 2013;31:1707-16.
35. Robinson WE, McDougall B, Tran D, et al. Anti-HIV-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J Leukoc Biol.* 1998;63:94-100.
36. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host Microbe.* 2012;12:109-16.
37. Klebanoff SJ, Coombs RW. Viricidal effect of polymorphonuclear leukocytes on human immunodeficiency virus-1: Role of the myeloperoxidase system. *J Clin Invest.* 1992;89:2014-17.
38. Elbim C, Prevot MH, Bouscarat F, et al. Polymorphonuclear Neutrophils from Human Immunodeficiency Virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-Induced L-Selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood.* 1994;84:2759-66.
39. Vassena L, Giuliani E, Koppensteiner H, et al. HIV-1 and Vpu Interfere with L-Selectin (CD62L) cell surface expression to inhibit adhesion and signaling in infected CD4+ T Lymphocytes. *Journal of Virology.* 2015;89:5687-700.
40. Gaddi E, Quiroz E, Balbaryski J, et al. Expresión de L-Selectina en linfocitos T

- y neutrofilos de niños infectados con HIV. *Medicina*. 2005;65:131-37.
41. Meddows-Taylor S, Kuhn L, Meyers TM, et al. Altered expression of L-Selectin (CD62L) on Polymorphonuclear Neutrophils of children vertically infected with Human Immunodeficiency Virus Type 1. 2001;21:286-92.
 42. Hayes PJ, Miao YM, Gotch FM, et al. Alterations in blood leucocyte adhesion molecule profiles in HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*. 1999;117:331-34.
 43. Tedder BTF, Steeber DA, Pizcueta P. L Selectin-deficient mice have Impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med*. 1995;181:2259-64.
 44. Homburg CHE, de Haas M, von dem Borne AEG, et al. Human neutrophils lose their surface FcγRIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*. 1995;85:532-40.
 45. Dransfield I, Stocks S, Haslett C. Regulation of cell-adhesion molecule expression and function-associated with neutrophil apoptosis. *Blood*. 1995;85:3264-73.
 46. Meddows-Taylor S, Martin DJ. Altered Expression of Fc γ RIII (CD16) on Polymorphonuclear Neutrophils from Individuals with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Disease and Pulmonary Tuberculosis. *Microbiology*. 1997;4:789-91.
 47. Bangani N, Nakiwala J, Martineau AR, et al. HIV-1 infection impairs CD16 and CD35 mediated opsonophagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *J Acquir Defic Syndr*. 2016;73:263-67.
 48. Mazzolini J, Herit F, Me Bouchet J, et al. Inhibition of phagocytosis in HIV-1–infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments. *Blood*. 2010;115:4226-36.
 49. Nielsen H, Kharazami A, Faber V. Blood Monocyte and Neutrophil Functions in the Acquired Immune Deficiency Syndrome. *Scand J Immunol*. 2006;24:291-96.
 50. Palmer S, Hamblin AS. Increased CD11/CD18 expression on the peripheral blood leukocytes of patients with HIV disease: relationship to disease severity. *Clin Exp Immunol*. 1993;93:344-49.
 51. Schwartz R, Lu Y, Villines D, Sroussi HY. Effect of human immunodeficiency virus infection on S100A8/A9 inhibition of peripheral neutrophils oxidative metabolism. *Biomed Pharmacother*. 2010;64:572–75.
 52. Elghetany MT, Davis BH. Impact of preanalytical variables on granulocytic surface antigen expression: A review. *Cytom Part B - Clin Cytom*. 2005;65:1-5.

53. Cloke T, Munder M, Bergin P, et al. Phenotypic alteration of neutrophils in the blood of HIV seropositive patients. *PLoS One*. 2013;8:1-7.
54. Selik RM, Mokotoff ED, Branson B, et al. Surveillance Case Definition for HIV Infection. *MMWR Recomm Rep USA*. 2014;63:1-10.
55. Fujimoto H, Sakata T, Hamaguchi Y, et al. Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Commun Clin Cytom*. 2000;42:371-78.
56. Vollbrecht T, Stirner R, Tufman A, et al. Chronic progressive HIV-1 infection is associated with elevated levels of myeloid-derived suppressor cells. *AIDS*. 2012;26:F31-7.
57. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*. 2009;69:1553-60.
58. Schmielau J, Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of T-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*. 2001;61:4756-60.
59. Pillay J, Tak T, Kamp VM, et al. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70:3813-27.
60. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012; 122: 327-36
61. Greifenberg V, Ribechini E, Rößner S, et al. Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN- γ treatment impairs DC development. *Eur J Immunol*. 2009;39:2865-76.
62. Lechner MG, Megiel C, Russell SM, et al. Functional characterization of human CD33+ and CD11b+ myeloid-derived suppressor cell subsets induced from peripheral blood mononuclear cells co-cultured with a diverse set of human tumor cell lines. *J Transl Med*. 2011;9:90.
63. Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RP, et al. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog*. 2014;10: e1003993.
64. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived-suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:162-74.
65. Brenchley JM, Douek DC. Microbial Translocation Across the GI Tract. *Annu*

- Rev Immunol. 2012;30:149-73.
66. Giraldo DM, Hernandez JC, Velilla P, et al. HIV-1–neutrophil interactions trigger neutrophil activation and Toll-like receptor expression. *Immunol Res.* 2016;64:93-103.
 67. Takeuchi O, Akira S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev.* 2009;227:75-86.
 68. Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21:13-25.
 69. Vincent IE, Zannetti C, Lucifora J, et al. Hepatitis B virus impairs TLR9 expression and function in plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One.* 2011;6:1-12.
 70. Hernandez JC, Giraldo DM, Paul S, et al. Involvement of Neutrophil Hyporesponse and the Role of Toll-Like Receptors in Human Immunodeficiency Virus 1 Protection. *PloS One.* 2015;10:e0119844.
 71. Martínez Moreno JA, López JCH, Urcuqui-Inchima S. La estimulación de TLR, receptores tipo NOD y dectina-1 en neutrófilos humanos induce la producción de citocinas proinflamatorias. *Iatreia.* 2014;27:135-46.
 72. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, et al. Selective Roles for Toll-Like Receptor (TLR)2 and TLR4 in the Regulation of Neutrophil Activation and Life Span. *J Immunol.* 2003;170:5268-75.
 73. Sabroe I, Dower SK, Whyte MKB. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation and apoptosis. *Clin Infect Dis.* 2005;41:S421-6.
 74. Köffel RE, Meshcheryakova A, Warszawska J, et al. Monocytic cell differentiation from band-stage neutrophils under inflammatory conditions via MKK6 activation. *Blood.* 2014;124:2713-24.
 75. Lester RT, Yao XD, Ball TB, et al. Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection. *AIDS.* 2008;22:685-94.
 76. Lee RM, White MR, Hartshorn KL. Influenza A viruses upregulate neutrophil Toll-like receptor 2 expression and function. *Scand J Immunol.* 2006;63:81-9.
 77. Roberts L, Passmore JS, Williamson C, al. Plasma cytokine levels during acute HIV-1 infection predict HIV disease progression. *AIDS* 2010;24:819-31.
 78. Kedzierska K, Crowe SM. Cytokines and HIV-1: Interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother.* 2001;12:133-50.

79. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest.* 2012;122:327-36.
80. Iwaki D, Mitsuzawa H, Murakami S, et al. The extracellular Toll-like Receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* 2002;277:24315-320.
81. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, et al. Toll-like Receptor 2 Functions as a Pattern Recognition Receptor. *J Biol Chem.* 1999;274:33419-425.
82. Geerin B, Simon H. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* 2011;18:1457-69.
83. Reed J. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol.* 2000;157:1415-30.
84. Voss M, Lettau M, Paulsen M, et al. Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell Commun Signal.* 2008;6:11.
85. Silvestris F, Nagata S, Cafforio P, et al. Cross-linking of Fas by antibodies to a peculiar domain of gp120 V3 loop can enhance T cell apoptosis in HIV-1-infected patients. *J Exp Med.* 1996;184:2287-300.
86. Yan J, Zapata JC, Pauza CD, et al. Modulation of SIV and HIV DNA vaccine immunity by Fas-FasL signaling. *Viruses.* 2015;7:1429-53.
87. Clerici M, Shearer GM. A TH1--TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today.* 1993;14:107-11.
88. Catalfamo M, Le Saout C, Lane HC. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *Cytokine & Growth Factor Rev.* 2012;23:207-14.
89. Baker J V, Quick H, Russ T. IL-6 and D-dimer levels are associated with vascular dysfunction in patients with untreated HIV infection. *HIV Med.* 2010;11:608-09.
90. Ledwaba L, Tavel JA, Khabo P, et al. Pre-ART levels of inflammation and coagulation markers are strong predictors of death in a south african cohort with advanced HIV disease. *PLoS One.* 2012;7(3):e24243.
91. Boulware DR, Hullsiek KH, Puroton CE, et al. Higher levels of CRP, D-dimer, IL-6 and hyaluronic acid before initiation of antiretroviral therapy (ART) are associated with increased risk of AIDS or death. *J Infect Dis.* 2011;203:1637-46.
92. Dolan SE, Hadigan C, Killilea KM, et al. Increased cardiovascular disease risk indices in HIV-infected women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;39:44-54.
93. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-Reactive Protein as a marker for

- inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2004;10:661-65.
94. Calabro P, Chang DW, Willerson JT, et al. Release of C-Reactive Protein in Response to Inflammatory Cytokines by Human Adipocytes: Linking Obesity to Vascular Inflammation. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:1112-13.
 95. Calabró P, Willerson JT, Yeh ETH. Inflammatory Cytokines Stimulated C-Reactive Protein Production by Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation*. 2003;108:1930-32.
 96. Kuller LH, Tracy R, Bellosso W, et al. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med*. 2008;5:1496-508.
 97. Chaudhary M, Kashyap B, Gautam H, et al. Role of C-Reactive Protein in HIV infection: a pilot study. *Viral Immunol*. 2008;21:263-66.
 98. Lau B, Sharrett AR, Kingsley LA, et al. C-Reactive Protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *Arch Intern Med*. 2006;166:64-70.
 99. Eastburn A, Scherzer R, Zolopa AR, et al. Association of low level viremia with inflammation and mortality in HIV-infected adults. *PLoS One*. 2011;6(11):e26320.
 100. Catalfamo M, Di Mascio M, Hu Z, et al. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:19851-56.
 101. Catalfamo M, Wilhelm C, Tcheung L, et al. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. *J Immunol*. 2011;186:2106-16.
 102. Enocsson H, Sjöwall C, Skogh T, et al. Interferon- α mediates suppression of C-reactive protein explanation for muted C-reactive protein response in lupus flares? *Arthritis Rheum*. 2009;60(12):3755-60.
 103. Borato DCK, Parabocz GC, Ribas SRW, et al. Changes of metabolic and inflammatory markers in HIV infection: Glucose, lipids, serum Hs-CRP and myeloperoxidase. *Metabolism*. 2012;61:1353-60.
 104. Masiá M, Bernal E, Padilla S, et al. The role of C-Reactive Protein as a marker for cardiovascular risk associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *Atherosclerosis*. 2007;195:167-71.
 105. Guimarães MMM, Greco DB, Figueiredo SM, et al. High-sensitivity C-reactive Protein levels in HIV-infected patients treated or not with antiretroviral drugs and their correlation with factors related to cardiovascular risk and HIV infection. *Atherosclerosis*. 2008;201:434-39.

106. Neuhaus J, Baker J V, Calmy A, et al. Markers of inflammation, coagulation and renal function are elevated in Adults with HIV Infection. *J Infect Dis.* 2011;201:1788-95.
107. Zangerle R, Gallati H, Sarcletti M, et al. Tumor necrosis factor alpha and soluble tumor necrosis factor receptors in individuals with human immunodeficiency virus infection. *Immunol Lett.* 1994;41:229-34.
108. Fahey JL, Taylor JM, Manna B, et al. Prognostic significance of plasma markers of immune activation, HIV viral load and CD4 T-cell measurements. *AIDS.* 1998;12:1581-90.
109. Wong GH, Krowka JF, Stites DP, et al. In vitro anti-human immunodeficiency virus activities of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *J Immunol.* 1988;140:120-24.
110. Folks TM, Clouse KA, Justement J, et al. Tumor necrosis factor alpha induces expression of human immunodeficiency virus in a chronically infected T-cell clone. *Proc Natl Acad Sci.* 1989;86:2365-68.
111. Keating SM, Golub ET, Nowicki M, et al. The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of US women. *AIDS.* 2011; 25:1823-32.
112. Pontes-Cardoso LCR, Souza LR, Peraçoli MTS, et al. Cytokine Profile and clinical metabolic alterations in HIV-1 infected individuals with and without lipodistrphy. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2007;13:509-26.
113. Ledru E, Christeff N, Patey O, et al. Alteration of tumor necrosis factor-alpha T-cell homeostasis following potent antiretroviral therapy: contribution to the development of human immunodeficiency virus-associated lipodystrophy syndrome. *Blood.* 2000;95:3191-98.
114. Ledru E, Lecoeur H, Garcia S, et al. Differential susceptibility to activation-induced apoptosis among peripheral Th1 subsets: correlation with Bcl-2 expression and consequences for AIDS pathogenesis. *J Immunol.* 1998;160:3194-206.
115. Chen H, Wang C, Chou C, et al. Tumor Necrosis Factor- α induces caspase-independent cell death in human neutrophils via reactive oxidants and associated with calpain activity. *J Biomed Sci.* 2006;13:621-73.

VI. CONCLUSIONES

Los principales resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, en relación a la apoptosis de neutrófilos en pacientes en estadios iniciales de la infección por VIH sin TAR, indican que:

- Hay un aumento de la apoptosis temprana de neutrófilos, con activación de caspasa -3, que se relaciona con la disminución del número absoluto de neutrófilos, lo que podría condicionar la instauración de infecciones oportunistas y ser responsable de manifestaciones clínicas iniciales.
- Hay una modulación de la expresión de moléculas de superficie en los neutrófilos, evidenciada por una disminución de CD62L y de CD16 que se correlaciona con el estado inmunológico y el nivel de apoptosis de estas células.
- Durante el curso de la infección asintomática con un compromiso inmunológico mayor se pueden caracterizar dos subpoblaciones de neutrófilos en base a la expresión del antígeno de superficie CD11b: una CD11b^{alto} y otra CD11b^{normal}.
- Según la coexpresión de moléculas de superficie, se pueden caracterizar dos subpoblaciones de neutrófilos: una CD11^{alto}CD16^{alto} y una CD11b^{intermedio}CD16^{normal}.
- El nivel de expresión de las moléculas de superficie de los neutrófilos evidencia un estado de activación temprano en la fase asintomática de la infección.
- Hay un aumento de la expresión de TLR2 que, unido a la expresión de moléculas de adhesión y al aumento de la apoptosis temprana, también es indicativo de un fenotipo activado de los neutrófilos.
- Los niveles aumentados de IL-6 y de PCR-as, pero no los de TNF, se correlacionaron con la carga viral y el estado inmunológico, respectivamente.
- El nivel de apoptosis de los neutrófilos se correlacionó inversamente con los niveles séricos de IL-6.

Por último, esta Tesis ha aportado información sobre distintos aspectos relacionados con la apoptosis de los neutrófilos en estadios tempranos de la infección por VIH y por lo tanto contribuye a una mayor comprensión sobre el efecto de este virus sobre componentes de la respuesta inmune innata y sobre el rol de los neutrófilos en la patogénesis de la infección.