



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

**PAPEL DE LA ESTIMULACIÓN POR TLRs EN EL
ESTABLECIMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE CITOTÓXICA
EN LA INFECCIÓN POR VIH-1**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**PRESENTA:
LETICIA KURI CERVANTES**

**TUTOR PRINCIPAL:
DR. GUSTAVO REYES TERÁN
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR:
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*"The process of scientific discovery is, in effect,
a continual flight from wonder."*

Albert Einstein

*"Shoot for the moon. Even if you miss,
you'll land among the stars."*

Norman Vincent Peale

Agradecimientos

Dr. Gustavo Reyes Terán... Gracias por darme la oportunidad de volver y el orgullo de formar parte de tu grupo de trabajo. Gracias por tu apoyo y confianza siempre... que este sea el inicio de muchos éxitos en conjunto.

Dr. Santiago Ávila y Biol. Gonzalo Salgado... Santi y Gonz, muchísimas gracias por su apoyo, crítica, discusión, orientación, corrección, conocimiento y, sobre todo, confianza. Esto no se podría haber hecho (y deshecho) sin ustedes.

A los médicos del CIENI, en particular al Dr. Akio Murakami, Dr. Paul Flores, Dr. Fernando Silva, Dra. María Gómez-Palacio, Dra. Karla Romero y Dra. Yetlanezi Vargas, por su apoyo en el reclutamiento de pacientes. A la Dra. Perla del Río por el manejo de los individuos controladores estudiados en este trabajo.

A todo el departamento de diagnóstico virológico, recepción y personal administrativo por su apoyo en el manejo del Protocolo, toma y procesamiento de muestras, compras e innumerables trámites que solo pudieron realizarse con su ayuda. En especial, mil gracias Zeidy, Sandra Zamora y Lalo.

A Christopher Ormsby, Candela Iglesias y Joel Vázquez por su apoyo, crítica, discusión y revisión de mi trabajo.

A los estudiantes y técnicos del CIENI –mis amigos- por su increíble ayuda en procesamiento de muestras, seminarios e incontables horas de compañía y apoyo.

Al Dr. Enrique Ortega Soto y Dr. Eduardo García Zepeda por su asesoría académica como parte de mi comité tutorial. Dr. Enrique, gracias en especial por su apoyo a lo largo de tanto tiempo.

A los miembros del jurado por su revisión, comentarios y discusión de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas por su apoyo en la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias donde se realizó este trabajo.

A CONACyT por su apoyo económico (Becario #221564).

A todas las personas que voluntariamente decidieron formar parte de esta investigación. Este trabajo es para ustedes.

Este trabajo fue financiado por CONACyT, Fundación México Vivo, ICyTDF (PIRIVE09-18) y la Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados.

Abreviaturas Útiles

APC, aloficoeritrina

ACTB, β -actina

CD, clúster de diferenciación

CV, carga viral

DC, célula dendrítica

DNA, ácido desoxirribonucleico

FITC, fluorescein isotiocianato

GALT, tejido linfoide asociado a mucosa intestinal

HLA, antígeno leucocitario humano

HPRT, hipoxantina-guanin fosforribosiltransferasa

IFN, interferón

IL, interleucina

IP-10, proteína inducida por interferón

LPS, lipopolisacárido

NCR, receptores de citotoxicidad natural

NK, (células) asesinas naturales

PAMP, patrón molecular asociado a patógenos

PBMCs, células mononucleares de sangre periférica

PE, ficoeritrina

RNA, ácido ribonucleico

mRNA, ácido ribonucleico mensajero

qRT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa

sCD14, CD14 soluble

SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIV, virus de inmunodeficiencia de simios

TAR, tratamiento antirretroviral

TGF, factor de crecimiento tumoral

TLR, receptor tipo Toll

TNF, factor de necrosis tumoral

VIH, virus de la inmunodeficiencia humana

Índice

- Índice de Figuras	iv
- Índice de Tablas	vi
- Resumen	vii
1 Introducción	
1.1 Infección por VIH y SIDA	
1.1.1 Impacto global	1
1.1.2 VIH-1: Ciclo de replicación	1
1.1.3 Historia natural y respuesta inmunológica	4
1.2 Activación inmunológica	7
1.3 Receptores tipo Toll y su papel en la infección por VIH-1/SIDA	8
1.4 Células NK	
1.4.1 Generalidades	11
1.4.2 Papel de las células NK en la infección por VIH-1	13
1.4.3 Cambios en las células NK durante la infección por VIH-1	15
2 Planteamiento del problema	17
3 Hipótesis	18
4 Objetivos	18
4.1 Objetivo General	
4.2 Objetivos Particulares	
5 Metodología	19
6 Resultados	
6.1 Características de la cohorte estudiada	24
6.2 Frecuencias de subpoblaciones leucocitarias: inmunofenotipificación	26
6.3 Expresión de TLRs	
6.3.1 Cuantificación de mRNA en PBMC totales	34
6.3.2 Expresión en subpoblaciones leucocitarias: inmunofenotipificación	35
6.4 Caracterización del estado inflamatorio	
6.4.1 Expresión de marcadores de activación en subpoblaciones leucocitarias: inmunofenotipificación	47
6.4.2 Cuantificación de biomarcadores de inflamación y translocación bacteriana	60
6.4.3 Cuantificación de citocinas	63
6.4.4 Asociación entre la expresión de TLRs, activación inmunológica e inflamación	69
6.4.5 Perfiles inflamatorios y progresión a SIDA	75
7 Discusión	
7.1 La infección por VIH-1 afecta la frecuencia de poblaciones leucocitarias	81
7.2 Expresión diferencial de TLRs en poblaciones leucocitarias	82

7.3	Activación inmunológica	95
7.4	Caracterización del estado inflamatorio en la infección por VIH-1: desregulación inmunológica	104
8	Conclusiones	112
9	Perspectivas	117
10	Referencias	119
11	Apéndices	
11.1	Resultados detallados de análisis multivariado	138
11.2	Resultados detallados de la cuantificación de citocinas	141
11.3	Publicación: Kuri-Cervantes, L. Salgado Montes-de Oca, G., Ávila-Ríos, S., Hernández-Juan, R., Reyes-Terán, G. 2014. NK cell activation is associated with HIV-1 disease progression. <i>J Leukoc Biol.</i> 2014 Jan 7. [Epub ahead of print]	143

Índice de Figuras

#	Descripción	Pag.
1.1	Prevalencia de adultos que viven con VIH a nivel mundial	1
1.2	Genoma del VIH-1	2
1.3	Esquema de la estructura de VIH-1	2
1.4	Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH-1	3
1.5	Historia natural de la infección por VIH-1	6
6.1	Características clínicas de los individuos con VIH-1 analizados. A) Distribución de valores de CV. B) A) Cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ . C) Correlación de CV y cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ . D) Correlación de meses en TAR con cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ en el grupo de individuos TAR ⁺ .	25
6.2	Distribución de DC convencionales y plasmacitodes en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Estrategia de análisis de citometría de flujo. B) Frecuencia de DC convecionales y C) plasmacitoides.	27
6.3	Distribución de células NK en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Estrategia de análisis de citometría de flujo. B) Frecuencia de células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ . C) Frecuencia de células NK CD56 ^{bright} CD16 ⁻ . D) Frecuencia de células NK CD56 ⁻ CD16 ⁺ .	29
6.4	Distribución de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Estrategia de análisis de citometría de flujo. B) Porcentaje de linfocitos T CD4 ⁺ . C) Porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ .	31
6.5	Distribución de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	32
6.6	Expresión relativa de mRNA de TLRs en PBMC totales de individuos infectados con VIH-1 vs. donadores sin VIH-1.	34
6.7	Expresión de TLRs en DC en con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	36
6.8	Expresión de TLRs en células NK CD56^{dim} CD16⁺ en con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	38
6.9	Expresión de TLRs en células NK CD56^{bright} CD16⁻ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	39
6.10	Expresión de TLRs en células NK CD56⁻ CD16⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	40
6.11	Expresión de TLRs en linfocitos T CD4⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	43
6.12	Expresión de TLRs en linfocitos T CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	44
6.13	Asociación de células TLR3⁺ y meses de TAR en células citotóxicas.	47
6.14	Expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	48
6.15	Expresión de marcadores de activación en subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	50
6.16	Expresión de marcadores de activación en DC convencionales y plasmacitodes en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	52
6.17	Expresión de marcadores de activación en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Ejemplos representativos de la expresión de CD86 en DC convencionales (A), y CD80 (B) y CD86 en DC plasmacitoides (C).	53
6.18	Expresión de marcadores de activación en células NK en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de células NK CD38 ⁺ (A), CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ (B), HLA-DR ⁺ (C) y CD69 ⁺ (D).	56

6.19	Expresión de CD38 en subpoblaciones de células NK en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Porcentaje de células NK CD38 ⁺ en subpoblaciones. (B) Ejemplos representativos de la expresión de CD38 en diferentes subpoblaciones de células NK.	58
6.20	Marcadores de inflamación y activación inmunológica innata en individuos infectados con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Niveles de proteína C reactiva. B) Niveles de fibrinógeno. C) Niveles de sCD14.	61
6.21	Asociación entre sCD14 y marcadores de progresión a SIDA en individuos con VIH-1 sin TAR. Correlaciones de Spearman entre la cantidad de sCD14 en plasma y cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ (A) o CV (B).	62
6.22	Cambio en los niveles de citocinas en plasma de individuos infectados con VIH-1 vs. donadores sin VIH-1.	68
6.23	Asociación entre marcadores de activación en DC plasmacitoides y células NK CD56^{dim} CD16⁺ con marcadores de progresión a SIDA y translocación bacteriana en individuos con VIH-1 sin TAR. A-C) Correlaciones de Spearman entre porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ , DC plasmacitoides CD80 ⁺ y células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ con cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ , CV y sCD14. D y E) Correlaciones de Spearman d entre porcentaje de DC plasmacitoides CD80 ⁺ y células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ con linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ . F) Correlación de Spearman entre el porcentaje DC plasmacitoides CD80 ⁺ y células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ .	73
6.24	Asociación entre cantidad circulante de IP-10 y marcadores clínicos de progresión a SIDA, activación inmunológica, translocación bacteriana y citocinas proinflamatorias en individuos con VIH-1 sin TAR. Correlaciones de Spearman entre la cantidad de IP-10 y con cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ , (A), CV (B), sCD14 (C), porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ (D), células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ (E) y DC plasmacitoides CD80 ⁺ (F), y cantidad en plasma de IL-1α (G), IL-6 (H) y TNF-α (I).	76
6.25	Asociación entre cantidad circulante de IL-10 y marcadores clínicos de progresión a SIDA, activación inmunológica, translocación bacteriana y citocinas proinflamatorias en individuos con VIH-1 sin TAR. Correlaciones de Spearman entre la cantidad de IP-10 y con cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ , (A), CV (B), sCD14 (C), porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ (D), células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ (E) y DC plasmacitoides CD80 ⁺ (F), y cantidad en plasma de IL-1α (G), IL-6 (H) y TNF-α (I).	77
6.26	Figura 6.26. Heatmap de los marcadores de activación en leucocitos y de inflamación en personas con VIH-1 y donadores sin VIH-1.	79
8.1	Modelo global de la infección por VIH-1 el efecto del TAR	114
8.2	Papel de IP-10 e IL-10 como indicadores de desregulación inmunológica en la inmunopatogénesis de la infección por VIH-1.	115
8.3	Marcadores asociados al control o progresión de la infección por VIH-1	116
A1.	Niveles de citocinas en plasma de individuos infectados con VIH vs. donadores sin VIH-1.	

Índice de Tablas

#	Descripción	Pag.
1.1	Descripción de TLRs humanos.	9
2.1	Páneles utilizados para la inmunofenotipificación.	21
6.1	Población de estudio.	24
6.2	Correlaciones entre la activación en DC y marcadores de progresión a SIDA en individuos con VIH-1 sin TAR.	54
6.3	Correlaciones entre la activación en subpoblaciones de células NK y marcadores de progresión a SIDA en individuos con VIH-1 sin TAR.	59
6.4	Asociaciones entre la expresión de citocinas y marcadores de progresión, inflamación, activación y TLRs en individuos con VIH-1 sin TAR.	66
A1.	Análisis multivariado considerando el porcentaje de DC plasmacitoides TLR9 ⁺ como variable dependiente y el porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ , porcentaje células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ , porcentaje células NK CD56 ⁻ CD16 ⁺ CD38 ⁺ , cantidad de IL-10 y cantidad de IFN- α como variables independientes en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.	138
A2.	Análisis multivariado considerando el porcentaje de células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ como variable dependiente y como variables dependientes a la CV, cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ , cantidad de sCD14, porcentaje de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ , IL-1 α , IP-10, TNF- α , IL-12, IL-15 y MCP-1 en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.	138
A3.	Análisis multivariado considerando la cantidad de IP-10 (pg/ml) como variable dependiente y la CV, cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ , cantidad de sCD14, cantidad de PCR, porcentaje DC plasmacitoides CD80 ⁺ , porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ y porcentaje células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ como variables independientes en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.	139
A4.	Análisis multivariado considerando la cantidad de IL-10 (pg/ml) como variable dependiente y la CV, cuentas de linfocitos T CD4 ⁺ , cantidad de sCD14, porcentaje de linfocitos T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺ y porcentaje células NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺ como variables independientes en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.	140

RESUMEN

Antecedentes. Una de las características principales de la infección por VIH-1 es la activación inmunológica crónica (principalmente en linfocitos T CD8⁺). Entre las posibles causas de este fenómeno, además del efecto directo de la viremia, se encuentran la translocación de productos bacterianos que podría inducir la activación de diferentes poblaciones celulares a través de la estimulación por receptores innatos como los TLRs y el ambiente inflamatorio exacerbado (caracterizado por la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y biomarcadores inflamatorios). El efecto de la señalización por TLRs en el establecimiento de la respuesta inmunológica citotóxica y sus consecuencias en la activación inmunológica, entorno inflamatorio y progresión de la infección por VIH-1 han sido poco estudiados.

Métodos. En este trabajo se analizó la expresión de TLRs y marcadores de activación en diferentes subpoblaciones leucocitarias por qRT-PCR y citometría de flujo multiparamétrica, y se estudió el entorno inflamatorio de personas que viven con VIH-1 que controlan la viremia (controladores virémicos y controladores elite), progresores crónicos y personas con SIDA, en comparación con un grupo control. Además, se estudió efecto del tratamiento antirretroviral en la expresión de estos marcadores e indicadores inflamatorios. Se realizaron análisis multivariados para identificar patrones específicos a los diferentes grupos de progresión y asociación entre la expresión de TLRs, activación e inflamación.

Resultados. Se encontró que la expresión de TLRs es particular a cada grupo de estudio y dependiente de la subpoblación leucocitaria analizada. No se encontraron patrones generales en la expresión de TLRs asociados a la progresión de la infección por VIH-1. Sin embargo, se observó que la activación inmunológica afecta de manera importante a células NK CD56^{dim} CD16⁺ y DC plasmacitoides, asociadas a la carga viral, cuentas de linfocitos T CD4⁺ y activación de linfocitos T CD8⁺. Además, se identificó a la expresión de CD38 en células NK CD56^{dim} CD16⁺ como un nuevo marcador de progresión de la infección por VIH-1. Paralelamente, se encontró un incremento en la cantidad circulante de citocinas proinflamatorias (en particular TNF- α , IL-1 α IP-10) y de la citocina antiinflamatoria IL-10 en personas que progresan a SIDA pero no en controladores, que correlacionan con marcadores clínicos de progresión.

Conclusiones. Estos datos sugieren una relación importante entre la activación inmunológica crónica observada en progresores, asociada con la translocación bacteriana y el entorno inflamatorio, pero no con la expresión de TLRs. Además, los resultados observados sugieren el uso de nuevos marcadores inmunológicos como indicadores de progresión y han permitido identificar factores inflamatorios que pueden estar asociados con la disfuncionalidad del sistema inmunológico, la activación inmunológica crónica y la progresión de la enfermedad por VIH-1.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Infección por VIH

1.1.1 Impacto Global

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus que infecta a las células CD4⁺ mediante su receptor CD4 y los co-receptores de quimiocinas CXCR4 en células T y CCR5 en macrófagos y células T. La infección por VIH-1 resulta en un estado de activación crónica, que causa la disfuncionalidad del sistema inmunológico y resulta en la progresión hacia el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [1]. Las principales rutas de transmisión del virus son la vía sexual, por transfusión sanguínea y de madre a hijo. El más reciente reporte de ONUSIDA mostró que aproximadamente 33.3 millones [31.4-35.3 millones] de personas viven infectadas a nivel mundial (Figura 1.1), y que en 2007 hubo 2 millones [1.8-2.3 millones] de muertes a causa del SIDA (UNAIDS, 2014). El reporte de CENSIDA en 2013 mostró que había 170 000 personas infectadas con VIH-1 y aproximadamente 5 000 defunciones por SIDA en México en 2012 (CENSIDA, 2013).

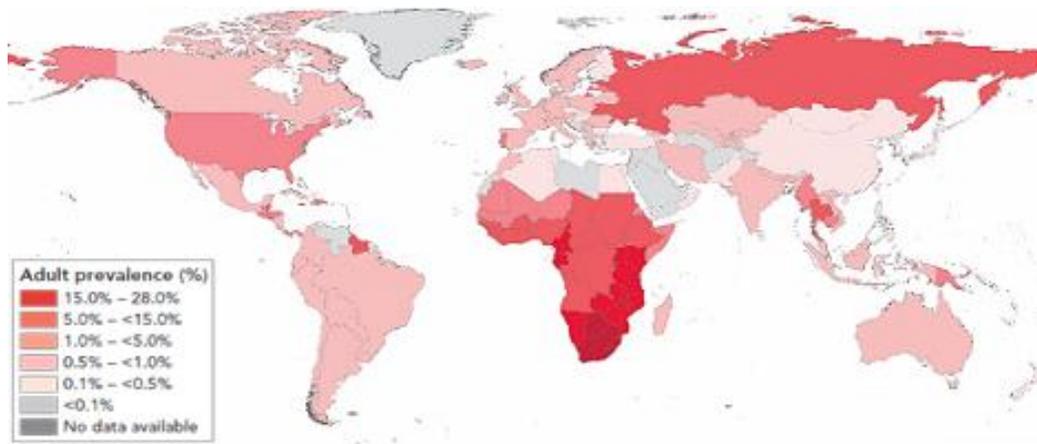


Figura 1.1. Prevalencia de adultos que viven con VIH a nivel mundial. Se consideran adultos a personas que de entre 15-49 años de edad.

1.1.2 VIH-1: Ciclo de replicación

Se han identificado dos tipos de VIH, el VIH-1 y el VIH-2, siendo el VIH-1 (principalmente grupo M) el más prevalente [2]. El VIH-2 es considerado menos virulento que el VIH-1 ya que está asociado a menor replicación viral y baja activación inmunológica [3]. El genoma del VIH-1 está formado por dos cadenas de ácido ribonucleico (RNA)

positivo de 9 749 nucleótidos de longitud. Contiene nueve genes (*env*, *gag*, *pol*, *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) que codifican para 15 proteínas (Figuras 1.2 y 1.3) [4, 5].

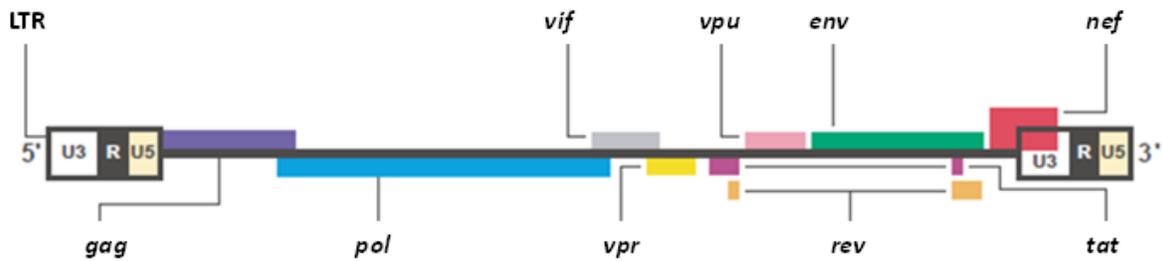


Figura 1.2. Genoma del VIH-1. LTR: long terminal repeat, necesario para el inicio de la transcripción. *env*: proteína de envoltura (gp160), se disocia en gp120 (SU: superficie) y gp41 (TM: transmembranal). *gag*: poliproteína procesada por proteasa para formar la proteína de matriz (p17), proteína de la cápside (p24), proteína de la nucleocápside (p7) y p6. *pol*: polimerasa, poliproteína que codifica para enzimas virales proteasa (p10), retrotranscriptasa y RNAsa H (p66/51) e integrasa (p32). *tat*: activador transcripcional (p14). *rev*: regulador de la expresión de genes virales (p19). *nef*: efector negativo (p27). *vif*: factor de infectividad viral (p23). *vpr*: proteína viral R (p15). *vpu*: proteína viral U. Adaptado de Greene & Peterlin, 2002 [6].

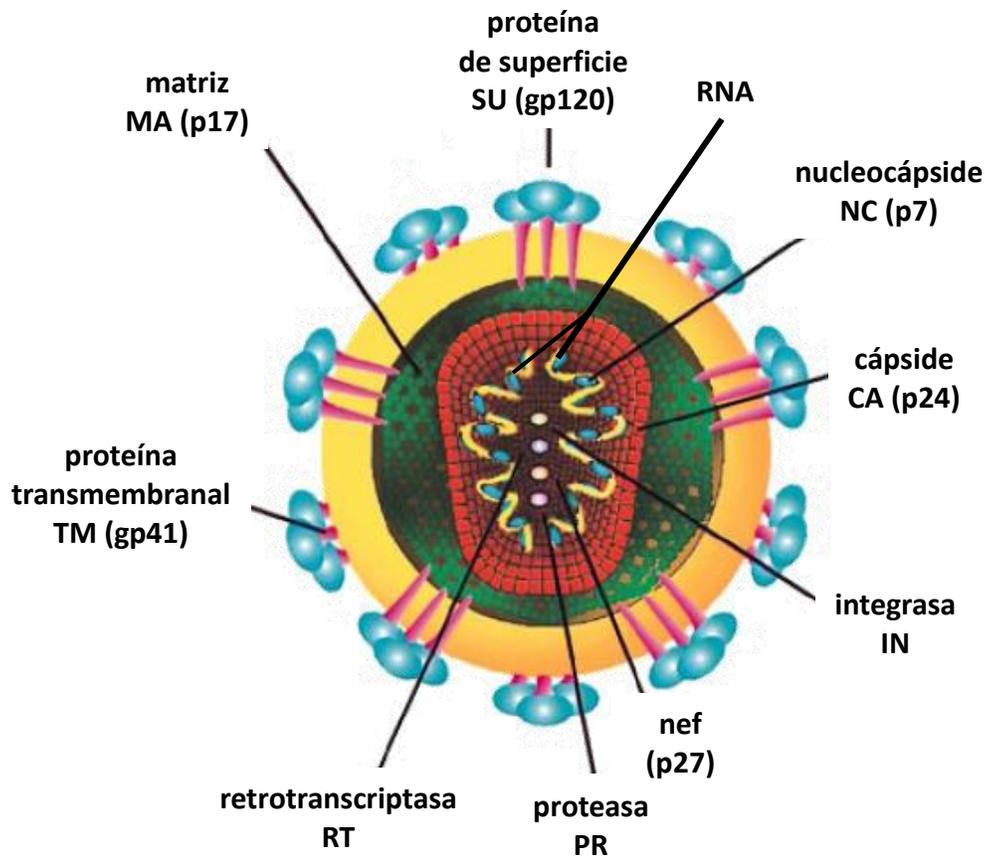


Figura 1.3. Esquema de la estructura del VIH-1 y localización de proteínas importantes. Adaptado de Turner & Summers, 1999 [7].

Durante el proceso de entrada, la proteína de envoltura gp160 reconoce al receptor CD4 en la célula blanco. Gp160 se compone de dos proteínas, gp120 y gp41, que se ensamblan en trímeros en la membrana del virus. Gp120 se asocia con CD4 induciendo cambios conformacionales que permiten su unión al receptor de quimiocinas. Posteriormente, ocurren cambios en gp41 que exponen una región hidrofóbica que contiene al péptido fusiogénico. Éste se inserta en la membrana celular y permite la fusión con la membrana viral [7-9]. Por otra parte, las células dendríticas (DC) de la mucosa expresan un receptor tipo lectina C llamado DC-SIGN que tiene gran afinidad por gp120 [10]. La interacción entre estas moléculas no permite la fusión pero facilita la endocitosis del virus hacia el interior de la DC [6, 10-12]. Después de la fusión de las membranas (o endocitosis en DC de mucosa), el RNA viral es desenvuelto y posteriormente se transcribe a ácido nucleico complementario (cDNA) mediante la retrotranscriptasa viral, llamado provirus [6, 13, 14]. El cDNA proviral se integra al genoma de la célula y ésta sintetiza las poliproteínas virales, que se procesan y ensamblan en el virión inmaduro [15, 16]. La poliproteína Gag-Pol es cortada por la proteasa viral generando viriones maduros infecciosos [4, 17]. La Figura 1.4 muestra una representación esquemática del ciclo de replicación del VIH-1.

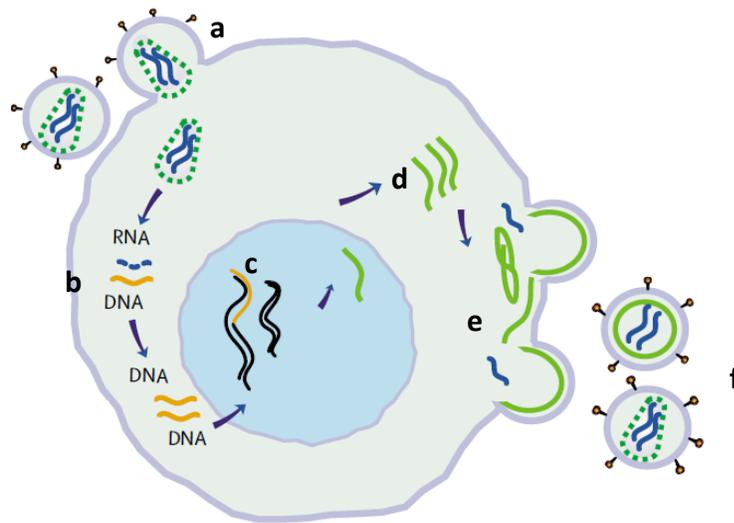


Figura 1.4. Representación esquemática del ciclo de replicación del VIH-1. a) Unión y fusión del virus a la membrana celular mediante la interacción de la proteína de envoltura gp160 con el receptor CD4 y co-receptor de quimiocinas CCR5/CXCR4. b) Transcripción reversa del RNA viral a cDNA mediante la retrotranscriptasa viral. c) Integración del cDNA proviral al genoma celular. d) Síntesis de proteínas virales en el citoplasma celular. e) Ensamblaje y exocitosis del virión inmaduro. f) Corte de la poliproteína mediado por la proteasa viral y maduración del virión. Adaptado de Simon *et al*, 2006 [17].

1.1.3 Historia Natural de la Infección por VIH-1 y Respuesta inmunológica

La infección por el VIH-1 consta de tres fases: aguda, crónica y SIDA [17-19] (Figura 1.5). La etapa inicial de la infección está caracterizada por niveles altos de replicación viral en las células CD4⁺ (linfocitos T, macrófagos y DC) en sangre periférica y en la lámina propia de las superficies mucosas, por la interacción con células que expresan el co-receptor CCR5 [18-22]. Una vez establecidas en los tejidos linfoides, las células infectadas migran a nódulos linfoides secundarios, afectando principalmente el tejido linfoide asociado a mucosa intestinal (GALT), lo que resulta en una pérdida preferencial de linfocitos T CD4⁺ de memoria efectora [19, 20, 23-25]. La mayoría de las células T efectoras en los tejidos linfoides expresan CCR5, por lo que son blanco importante del virus durante la infección aguda [26]. Solamente el ~15% de las células T de memoria efectora en sangre y nódulos linfoides son CCR5⁺, por lo que la disminución masiva de células T CD4⁺ en mucosas no se ve reflejada en las cuentas de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica [27]. A pesar de la administración de tratamiento antirretroviral (TAR), la pérdida preferencial de células T CD4⁺ en el GALT permanece, a diferencia de las células T CD4⁺ de sangre periférica que se recuperan parcialmente [19]. La infección a través de CXCR4 es más frecuente en etapas tardías de la infección. Los virus CXCR4-trópicos se han asociado con mayor virulencia y progresión más rápida de la enfermedad [28, 29].

Durante la fase aguda, una proporción importante de DC de la mucosa genital son blanco del VIH-1 por su expresión de CD4 y/o DC-SIGN [30]. Estas células migran a tejidos linfoides induciendo una respuesta inmunológica eficiente mediante la presentación antigénica y producción de citocinas, pero a la vez mediando la transmisión del virus a las células T [31, 32].

El establecimiento de una respuesta inmunológica eficiente disminuye la carga viral (CV) y recupera parcialmente el número de linfocitos T CD4⁺ en circulación. La respuesta innata representa la primera línea de defensa contra el VIH-1 mediante la lisis del virus, el bloqueo de la fusión del virus mediante competencia por el co-receptor CCR5 por la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)-1 α (CCL-3), MIP-1 β (CCL-4) y RANTES (CCL-5), activación de células asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés) por

interferones (IFN) tipo I, interleucina (IL)-2, IL-12, IL-15 e IL-18, producción de citocinas proinflamatorias e IFN- γ y polarización de la respuesta inmunológica hacia una respuesta antiviral [31, 33-36]. Las lectinas de unión a manosa y el complemento pueden lisar directamente al VIH-1 así como inducir la fagocitosis de células infectadas. La producción de citocinas por las DC polariza la respuesta adaptativa hacia Th1/Th2, y recluta y activa a otras células. El factor de necrosis tumoral (TNF)- α y los IFNs afectan la replicación del VIH-1 en células infectadas [37]. Los IFNs tipo I inducen la activación de células NK, aumentan la producción de IFN- γ de los linfocitos T CD4⁺ y promueven la respuesta Th1. Las células NK son las primeras células citotóxicas que responden durante la infección aguda y su activación resulta en la reducción inicial de los niveles de viremia en plasma [35, 38]. Dentro de las primeras tres a cuatro semanas post-infección se establece la respuesta específica de los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y la producción de anticuerpos anti-VIH-1, lo que resulta en la disminución de la CV y la recuperación parcial de linfocitos T CD4⁺ en sangre periférica [18, 21, 38, 39]. Sin embargo, estas respuestas no son capaces de eliminar al virus, que permanece latente durante la fase crónica de la infección [19].

La fase crónica de la infección dura aproximadamente entre 8-10 años y se caracteriza por el equilibrio entre la CV y la respuesta inmunológica [40]. Durante la infección por VIH-1, el sistema inmunológico se activa crónicamente [18, 19, 21, 40, 41]. La activación crónica resulta en la disfuncionalidad del sistema inmunológico y culmina en la progresión de la enfermedad hacia el SIDA. La etapa crónica de la infección causa altas tasas de apoptosis y muerte de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺, aumento de los linfocitos T que expresan marcadores de activación y fenotipo de memoria o senescente, pérdida de linfocitos T, células NK y otras células accesorias (mediada principalmente por la vía de Fas-Fas ligando), disminución en la población de DC plasmacitoides, pérdida de funcionalidad de células citotóxicas (tanto NK como T CD8⁺) y en un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias [19, 41-51].

Durante la etapa de SIDA existe un estado de inmunodeficiencia severa por la acción directa del virus y la activación inmunológica crónica que permite la co-infección con microorganismos oportunistas, y puede culminar en la muerte de un individuo en ausencia

de TAR [41], [52]. De acuerdo con la duración de la fase crónica de la infección por VIH, se han definido tres historias naturales: progresión lenta (individuos controladores), progresión intermedia o típica y progresión rápida hacia SIDA [53]. Un porcentaje pequeño de la población de personas que viven con VIH tiene la capacidad de mantener CV muy bajas en ausencia de tratamiento (controladores virémicos, <5%) o indetectables (controladores avirémicos, <1%) [54]. Estos individuos, además, pueden tener fases crónicas mayores a 10 años sin progresar a SIDA [53-55].

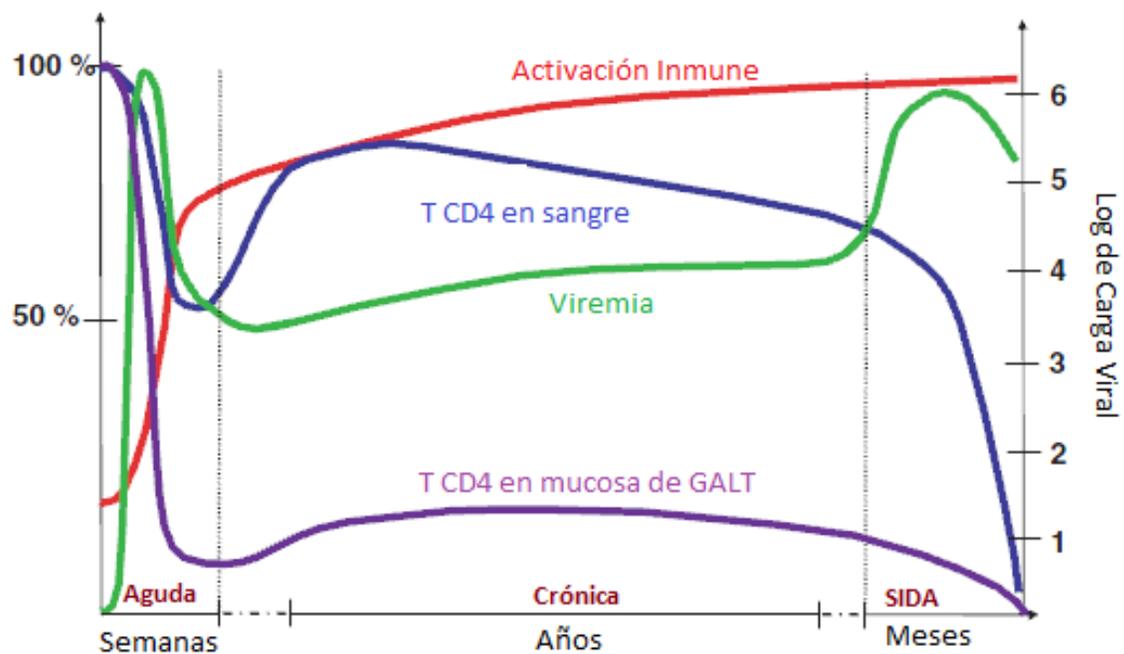


Figura 1.5. Historia natural de la infección por VIH. GALT, tejido linfóide asociado a mucosa gastrointestinal. Adaptado de Grossman *et al*, 2006 [19].

La variabilidad en la progresión de la enfermedad depende de diversos factores como la patogenicidad intrínseca del virus, factores genéticos propios del hospedero y la eficiencia en la respuesta inmunológica contra el VIH-1 [56]. Es cada vez más evidente que la calidad de la respuesta inmunológica contra la infección juega un papel importante en la historia natural de la infección [34, 35, 38, 39, 56-58]. En particular, la respuesta de células citotóxicas como NK y los linfocitos T CD8⁺ ha mostrado tener un papel central en el control de la infección [34, 35, 38, 39, 56-58]. Existen múltiples evidencias de la centralidad del polimorfismo de los genes del antígeno leucocitario humano (HLA) de clase I en el caso de las células T CD8⁺ y de los genes KIR en las NK que conducen a una

progresión más rápida o lenta de la enfermedad, demostrando la importancia de la eficacia de la respuesta inmunológica –en particular citotóxica- para la progresión hacia SIDA [56, 59, 60].

1.2 Activación Inmunológica

La activación inmunológica crónica es una de las características más particulares de la infección por VIH-1 [52]. Es uno de los mejores parámetros para predecir la progresión hacia SIDA, está asociada a la baja reconstitución inmunológica en pacientes con TAR y es un factor crítico que distingue la infección patogénica y no patogénica por virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) en primates no humanos [41, 61-67]. Los monos mangabey ahumado (“sooty mangabey” *Cercocebus atys*), hospederos naturales del SIVsm, no progresan a SIDA y no presentan activación inmunológica, a pesar de mostrar altos niveles de replicación viral [68]. Sin embargo, los macacos rhesus (*Macaca mulatta*) SIV⁺ que presentan una pérdida progresiva de células T CD4⁺ y progresan a SIDA de manera similar a los humanos infectados con VIH-1 están caracterizados por una fuerte activación de los linfocitos T [63, 68]. Por otra parte, los individuos infectados con VIH-2, un virus menos patogénico y asociado a progresión lenta de la enfermedad, presentan menor replicación viral, respuesta inmunológica más eficiente, así como niveles de activación inmunológica significativamente menores a los observados en individuos infectados con VIH-1 [41, 69, 70].

Algunas de las manifestaciones de la activación inmunológica incluyen la activación policlonal de linfocitos B, el aumento de recambio (*turnover*) de células T, aumento en la frecuencia de células T con fenotipo activado e incremento en los niveles de citocinas y quimiocinas proinflamatorias en suero [71-74].

Una consecuencia benéfica de la activación inmunológica es la restauración de las células T CD4⁺ de memoria en tejidos por inducción de la proliferación [75]. Sin embargo, son más los efectos negativos asociados a la activación inmunológica crónica en individuos con VIH-1 [52]. El alto recambio de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ afecta los mecanismos de

homeostasis de estas células, lo que resulta en una disminución en su vida media y en agotamiento clonal [46, 72, 76, 77]. También se han observado cambios en la arquitectura de los nódulos linfoides por fibrosis mediada por el factor de crecimiento tumoral (TGF)- β a causa de la inflamación [78-80]. De manera importante, la activación inmunológica resulta en la generación de células T activadas, blancos para la infección directa del virus permitiendo la replicación viral [20, 23, 81]. Por lo anterior, el VIH-1 es un virus que induce la proliferación de sus células hospederas a través de la activación inmunológica [82].

1.3 Receptores Tipo Toll y su Papel en la Infección por VIH-1/SIDA

Una de las formas más importantes de la respuesta ante la infección por VIH-1 está dada por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), la cual se da mediante receptores de reconocimiento de patrones como los receptores tipo Toll (TLR) expresados en células inmunes [83, 84]. La exposición de estas células a ligandos de TLRs induce rápidamente la expresión de genes involucrados en la inflamación y el establecimiento de la respuesta inmunológica [85]. Las células presentadoras de antígeno y fagocitos, así como las células citotóxicas NK y T CD8⁺, expresan de manera heterogénea diversos TLRs que reconocen PAMPs asociados al VIH-1 [83, 86, 87].

Hasta ahora se han identificado 11 genes para TLR en humanos (Tabla 1.1) [88]. Los TLRs que se han asociado más recientemente en la respuesta a estimulación durante infecciones virales son los TLRs 7 y 8, que comparten un alto grado de similitud estructural. Se encuentran en la membrana de los endosomas y reconocen RNA viral de cadena sencilla, como es el caso del genoma del VIH-1 [89, 90].

La inmunopatogénesis de la infección por VIH-1 resulta en la liberación a la sangre de PAMPs de origen bacteriano provenientes de la flora intestinal [91]. La replicación del virus en el GALT y la pérdida de linfocitos T CD4⁺ de la mucosa intestinal resulta en la pérdida de la inmunidad celular local y en la alteración de la barrera epitelial [82, 91]. Lo anterior genera un aumento en la permeabilidad intestinal y la translocación de productos

bacterianos hacia la circulación sistémica, principalmente lipopolisacárido (LPS), que pueden funcionar como ligandos de TLRs y contribuir a la activación inmunológica [19, 38, 41, 54, 86, 91-95].

Tabla 1.1. Descripción de TLRs humanos. Adaptada de Kumar *et al*, 2009 [96].

TLR	Localización	PAMPS reconocidos por el TLR	Citocinas efectoras inducidas
TLR1/2	Membrana celular (superficie)	Triacil lipopéptidos (bacterias y micobacterias)	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc.
TLR2	Membrana celular (superficie)	Peptidoglicano (bacterias gram-positivas), lipoarabinomanano (micobacterias), hemaglutinina, fosfolipomanana, glicosilfosfatidil inositol mucina	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc.
TLR3	Endosoma	RNA viral de cadena sencilla, RNA de cadena doble, virus sincicial respiratorio, citomegalovirus murino	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc. Interferones tipo I
TLR4	Membrana celular (superficie)	Lipopolisacárido (bacterias gram-negativas), manana, glicosilfosfatidil inositol fosfolípidos, proteínas de membrana virales	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc. Interferones tipo I
TLR5	Membrana celular (superficie)	Flagelina (bacterias)	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc.
TLR6/2	Membrana celular (superficie)	Diacil lipopéptidos, ácido lipoteicoico	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc.
TLR7	Endosoma	RNA viral de cadena sencilla	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc. Interferones tipo I
TLR8	Endosoma	RNA viral de cadena sencilla	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc. Interferones tipo I
TLR9	Endosoma	DNA viral de doble cadena, motivos CpG de bacterias y virus	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc. Interferones tipo I
TLR10	Membrana celular (superficie)	¿?	
TLR11	Membrana celular (superficie)	Bacterias uropatógenicas, moléculas tipo profilina	Citocinas inflamatorias: TNF- α , IL-6, etc.

Estudios recientes han mostrado el aumento en la expresión de RNA mensajero de TLRs 6, 7 y 8 en PBMC totales durante la fase crónica de la infección por VIH-1, y de los TLRs 2, 3, 4, 6, 7, y 8 en la etapa de SIDA [87]. Además, se ha reportado que la estimulación de PBMC totales con RNA de cadena sencilla del VIH-1 así como con LPS (ambos ligandos

frecuentes en la infección por VIH-1) aumenta la capacidad de respuesta y producción de TNF- α [87]. En el caso particular de las DC plasmacitoides, el RNA viral induce la expresión de moléculas de HLA, marcadores de maduración, producción de IFNs tipo I y TNF- α mediante la estimulación de TLR7 [86]. La estimulación de PBMC con ligandos de TLR7/8 promueve la actividad anti-VIH-1 mediada específicamente por las células citotóxicas NK y T CD8⁺ [38, 97, 98]. La activación y respuesta de las células NK y T CD8⁺ es dependiente de la estimulación de las DC por sus TLRs a través de la producción de citocinas como IFNs tipo I, TNF- α , IL-2, IL-15 e IL-18 y de la presentación antigénica [38, 98]. Además, el uso de ligandos de TLRs 7 y 8 como adyuvantes para en macacos rhesus inmunizados con VIH-gag potencia la respuesta de linfocitos T CD8⁺ de memoria.

Por otra parte, se ha observado que la señalización y respuesta por TLRs está asociada con cambios en la progresión a la enfermedad. Las DC plasmacitoides de primates no humanos que no presentan activación inmunológica y que no progresan a SIDA (mangabeys ahumados) producen IFN- α en respuesta al SIV y a otros ligandos de los TLR7 y 9 en menor cantidad que los macacos rhesus y los humanos que sí progresan a SIDA [93]. Por ello, una baja producción de factores proinflamatorios en respuesta a la infección viral podría estar contribuyendo a la falta de activación inmunológica crónica y progresión a SIDA. Además, estudios inmunogenéticos han demostrado que polimorfismos en los TLRs 7 y 8, implicados en el reconocimiento del RNA viral de cadena sencilla, así como en TLR9, implicado en el reconocimiento de motivos de DNA no metilado de virus y bacterias, están asociados con cambios en la progresión hacia SIDA. Se ha identificado que los polimorfismo de TLR8 A1G (rs3764880) y de TLR9 1635A/G confieren protección [99, 100], mientras que la presencia del polimorfismo del TLR7 Gln11Leu, uno de los más frecuentes en población africana, se asocia con altas cargas virales y progresión rápida hacia SIDA [101]. Las PBMC positivas para este polimorfismo secretan significativamente menor cantidad de IFN- α en respuesta al estímulo por TLR7, pero su producción de IL-6 no se encuentra afectada. Polimorfismos en TLR9 (1635A/G y +1174G/A) también se han asociado con progresión rápida hacia SIDA [102]. Estos estudios sugieren un papel importante de la estimulación por TLRs en la respuesta inmunológica contra el VIH-1 y en la progresión de la enfermedad.

1.4 Células Asesinas Naturales (NK)

1.4.1 Generalidades

Las células NK son linfocitos granulares derivados de médula ósea, originalmente caracterizadas por su papel en respuestas anti-tumorales que no requieren inmunización previa [103]. Las células NK representan aproximadamente entre el 10-15% de los leucocitos circulantes y difieren de los linfocitos B y T por a la falta de expresión de receptores de antígeno específicos, como el receptor de células T (TCR) y las inmunoglobulinas de superficie, así como de otros marcadores linfocitarios (*e.g.* CD4¹, CD3γδε) [103, 104]. Las células NK son un componente importante de la respuesta inmunológica innata, ya que representan la primera línea de defensa contra las infecciones virales [33, 105-107].

El principal marcador que identifica a las células NK es CD56 en humanos [108] y su análogo NK1.1 en ratones [109]. Se han caracterizado dos subpoblaciones de NK en sangre con base en la expresión de CD56 y CD16 en su superficie [110, 111]. Aproximadamente el 90% de las células NK en sangre periférica son CD56^{dim} CD16⁺ y se caracterizan por una alta capacidad citotóxica, baja producción de IFN-γ, alta expresión de receptores inhibidores y tienen un importante papel efector por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. A esta subpoblación se le ha llamado células NK “citotóxicas”². Las células NK CD56^{dim} CD16⁺ también expresan los receptores de quimiocinas CXCR1 y CX3CR1 exclusivamente y migran predominantemente hacia fractalina e IL-8 [112].

La población de células NK “inmunomoduladoras” representa el 10% de las NK de sangre periférica y se caracteriza por ser CD56⁺CD16^{dim/-}. Las NK inmunomoduladoras son productoras eficientes de citocinas, principalmente IFN-γ, expresan el receptor de IL-2 de alta afinidad y tienen baja capacidad citotóxica. Estas células expresan el receptor de quimiocinas CCR7 exclusivamente y L-selectina (CD62L), por lo que migran hacia MIP-3β y nódulos linfoides secundarios [112]. Su migración está dirigida preferencialmente a

¹ Se ha reportado la existencia de una población de células NK CD4⁺. Esta subpoblación se encuentra principalmente en ganglios linfáticos y es menor al ~1% de las NK (Campbell *et al*, 2001; Valentin *et al* 2002)

² Las poblaciones funcionales de células NK citotóxicas e inmunomoduladoras se han nombrado de manera análoga a las poblaciones de linfocitos T CD8⁺ citotóxicos y T CD4⁺ inmunomoduladores.

zonas de células T en los nódulos linfoides secundarios, donde reciben factores derivados de los linfocitos T (*e.g.* IL-2) que inducen su maduración [113] y donde contribuyen al reclutamiento de la respuesta inmunológica adaptativa [114, 115]. Recientemente se ha caracterizado una tercera subpoblación CD56⁻ CD16⁺ en individuos infectados con VIH-1 [42, 116].

La respuesta de las células NK es reclutada principalmente por la producción de IFN- α/β en DC y otras citocinas proinflamatorias inducida por infecciones virales. Al ser activadas, las células NK tienen dos funciones efectoras principales en la respuesta inmunológica: lisis de células blanco, ya sea de manera directa o dependiente de anticuerpos, y la liberación de citocinas, principalmente IFN- γ [117]. Tienen la capacidad de eliminar células blanco mediante la liberación de gránulos de perforina y granzima, o por la inducción de apoptosis utilizando FAS ligando, TNF o el ligando inductor de apoptosis asociado a TNF (TRAIL) [114]. Además, las células NK son capaces de producir IFN- γ , TNF- α , IL-3, factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), MIP-1 α (CCL-3), MIP-1 β (CCL-4), RANTES (CCL-5), IL-8 (CXCR-8) [33, 103, 115, 117]. Además de tener funciones antivirales directamente, la producción de factores solubles juega un papel importante en el reclutamiento y regulación de la respuesta inmunológica adaptativa. Adicionalmente, pueden participar como inmunomoduladoras por su capacidad de co-estimulación dependiente de contacto con las células T debido su expresión de moléculas co-estimuladoras como CD40 ligando y OX40 ligando [115]. Las deficiencias en células NK están asociadas a un incremento en la susceptibilidad a infecciones virales [117, 118].

Las células NK expresan una amplia diversidad de receptores reguladores [119]. La función de las células NK está regulada por un balance de señales inhibitoras y activadoras. Se han caracterizados tres grupos principales de receptores de células NK capaces de reconocer moléculas clásicas y no clásicas de HLA clase I: receptores de citotoxicidad natural (NCR), receptores de muerte tipo inmunoglobulina (KIR) y los receptores tipo lectina C [119-122]. Los NCR conforman un grupo de receptores activadores compuesto por NKp30, NKp40 y NKp44. Sus ligandos aún no han sido caracterizados, sin embargo se ha visto que reconocen hemaglutinina viral [115, 123]. En humanos, los KIR reconocen el HLA clase I -

A, -B y -C. En ratones, *Ly49* reconoce H-2D/K [122, 124]. Los receptores tipo lectina C, principalmente la familia NKG2/CD94, reconocen HLA-E y HLA-G en humanos, y Qa1^b en ratones [122, 125-127]. La pérdida de expresión de moléculas de HLA clase I causada por infecciones virales o transformación en células tumorales resulta en la inducción de la actividad citotóxica y/o la liberación de citocinas en las células NK a través de la señalización por receptores inhibidores [128-130].

Adicionalmente, las células NK expresan CD16 (FcγRIII), un receptor de baja afinidad para la porción Fc de la inmunoglobulina G (IgG). CD16 les permite identificar células infectadas recubiertas con anticuerpos y complejos inmunes induciendo la producción de citocinas, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la inducción de apoptosis vía Fas-Fas ligando [110, 119, 131]. La expresión de CD16 en la superficie de las células NK correlaciona con su actividad citotóxica inducida por anticuerpos [132].

1.4.2 Papel de las Células NK en la Infección por VIH-1

Existen diversas evidencias que sugieren un papel importante de las células NK en la protección contra el VIH-1. Las poblaciones de células NK tienen cambios tanto en número como en fenotipo y funcionalidad durante la infección por VIH-1 [43]. Se ha reportado una disminución en el número de células NK durante la infección aguda [38]. Sin embargo, su actividad se ve incrementada significativamente en presencia de niveles altos de viremia y disminuyen cuando se establece la respuesta VIH-específica de los linfocitos T CD8⁺ resultando en la reducción de la viremia [38, 39, 133]. Ambas poblaciones citotóxicas cooperan durante la fase crónica de la infección [38]. Además, se ha reportado que la habilidad de las células NK para controlar la infección por VIH-1 es igualmente potente que la de los linfocitos T CD8⁺ [134].

Las células NK producen una gran cantidad de citocinas y quimiocinas que tienen efectos antivirales directos sobre células infectadas por VIH-1 y que participan en el reclutamiento y potenciación de la respuesta inmunológica innata [117]. Las células NK secretan activamente niveles altos de IFN-γ y TNF-α durante la infección con VIH-1 [133]. MIP-1α

(CCL-3), MIP-1 β (CCL-4) y RANTES (CCL-5), quimiocinas liberadas por las células NK, bloquean la entrada y fusión del VIH-1 por inhibición competitiva por el co-receptor CCR-5 [34, 135]. Se ha demostrado que los efectos supresores de las células NK en la replicación viral están mediados predominantemente por la secreción de estas quimiocinas, sin embargo, otros factores aún no identificados podrían estar contribuyendo [134, 136].

Además de la producción de citocinas y quimiocinas, las células NK son una fuente importante de α -defensinas, péptidos antimicrobianos que tienen un importante papel antiviral [137]. Sin embargo, reportes recientes han mostrado que algunas defensinas contribuyen a la infección de células CD4⁺ en el tracto genitourinario mediante interacción directa con el virus en presencia de otras infecciones oportunistas [138, 139]. Por lo anterior, la producción de defensinas mediada por NK y otras células del sistema inmunológico puede estar contribuyendo tanto a la protección como a la patogenia del VIH-1.

La infección de células T CD4⁺ se caracteriza tanto por la disminución en la expresión del receptor CD4 como en la pérdida de expresión de moléculas HLA-A y HLA-B mediada por Nef, como un mecanismo de evasión de la respuesta específica de linfocitos T CD8⁺ [128, 140, 141] Esta pérdida de expresión de moléculas de HLA clase I hace que las células infectadas se vuelvan susceptibles a la citotoxicidad mediada por células NK inducida por los KIR. Sin embargo, Nef no tiene ningún efecto sobre las moléculas de HLA-C ni HLA-E, reconocidas por otros receptores como NKG2/CD94, LIR1/ILT2 y KIR2DL1/2 [128]. Por lo anterior, las células NK tienen una capacidad limitada de eliminar células infectadas, dependiente principalmente de su expresión de las moléculas HLA-C y -E [105, 142, 143].

Existen factores genéticos que confieren protección mediada por células NK contra el VIH-1. Se ha encontrado una asociación entre la expresión específica de algunos KIR con alelos de HLA-I. La combinación de la expresión de *KIR3DS1* y *HLA-B* conteniendo el motivo serológico *Bw4* con una isoleucina en la posición 80, favorece la activación de las NK y se ha relacionado con progresión retardada hacia SIDA y enfermedades oportunistas relacionadas con SIDA [59, 144, 145]. Se ha reportado que la expresión específica de

alotipos de KIR3DS1 también juega un papel importante en el reconocimiento y eliminación de células infectadas con VIH-1 mediante la interacción con Bw4 [38, 144].

El agotamiento inmune causado por la infección crónica con VIH-1 está asociado con una disminución significativa de células NK en la sangre. Aunque la razón de esta pérdida celular se desconoce, se han propuesto diversas posibilidades. A) las personas con VIH-1 tienen niveles significativamente menores de IL-15 e IL-12 en plasma, citocinas esenciales para el desarrollo y proliferación de las células NK, en comparación con individuos sanos [146-148]. B) Las células NK son más susceptibles a entrar en apoptosis como un efecto *bystander* inducido por los linfocitos T CD4⁺ [149]. C) Una población pequeña de células NK que expresa CD4, CCR-5 y CXCR-4 pueden ser infectadas directamente por el virus [150-152]. D) La activación inmunológica induce la regulación positiva de la expresión del co-receptor CCR5 en las células NK, lo que causa que éstas se redistribuyan hacia sitios de replicación viral activa y, por lo tanto, la disminución del porcentaje de estas células en sangre periférica [134]. E) La exposición de las células NK a las proteínas de envoltura del VIH-1 resulta en la disminución en su proliferación y en la inducción de apoptosis mediada por FAS (CD95) [45, 153]. Los puntos A) y B) son un efecto indirecto de la infección por VIH-1, mientras que C), D) y E) son resultado directo de la infección viral.

1.4.3 Cambios en las Células NK Durante la Infección por VIH-1

Las poblaciones de células NK se ven afectadas en número, fenotipo y funcionalidad durante la infección por VIH-1 [43]. Se ha observado que las células NK de pacientes infectados con VIH-1 tienen menor cantidad de perforina intracelular, lo que genera una baja eficiencia para la eliminación de células infectadas o un agotamiento temprano en su capacidad citolítica [154, 155]. Además, se han observado cambios importantes en la expresión de los receptores de las células NK asociados a la pérdida de funcionalidad de esta población [42, 44, 116, 134, 156-160]. Particularmente, se ha visto un incremento en la expresión de receptores inhibidores directamente relacionada con la viremia [44, 134]. Por otra parte, la expresión de NCRs se encuentra disminuida significativamente en las NK de sangre periférica de individuos con VIH-1 virémicos, en particular NKp30 y NKp46 [157].

La expresión de Nkp30 en células NK correlaciona positivamente con la citotoxicidad y negativamente con la CV en personas con VIH-1 [159].

Se han caracterizado dos subpoblaciones de células NK dependiendo de su expresión en membrana de CD56 y CD16: la población citotóxica $CD56^{dim} CD16^{+}$ y la población inmunomoduladora $CD56^{+}CD16^{dim/-}$ [110, 111]. En los individuos VIH-1 se ha descrito una tercera población altamente disfuncional con un fenotipo $CD56^{-} CD16^{+}$ [42, 116]. Esta subpoblación se encuentra sobrerrepresentada en los individuos con VIH-1 virémicos y presenta actividad citotóxica reducida así como baja capacidad de producción de citocinas [42]. Estos defectos en funciones efectoras se han asociado a altos niveles de expresión de receptores inhibidores y baja expresión de receptores activadores [105, 142, 153, 156, 161].

El TAR activo logra recuperar los números de las células NK y su función citotóxica. En los individuos con VIH-1 con TAR también se recuperan los niveles normales de receptores inhibidores y activadores de las células NK. Sin embargo, la producción de IFN- γ producida por IL-12 se mantiene suprimida en personas con VIH-1 aún en presencia de TAR [137, 162, 163].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El impacto de la señalización por TLR en el establecimiento de respuestas de NK y linfocitos T CD8⁺ ha sido poco caracterizado. Sin embargo, se ha identificado variabilidad en la efectividad de las respuestas de células NK para controlar al VIH, dependiendo de interacciones KIR/HLA específicas, resultando en una progresión lenta o rápida hacia la enfermedad [59]. De manera análoga, se ha reportado que las respuestas de linfocitos T CD8⁺ restringidas por alelos HLA específicos y dirigidas hacia diferentes epítomos virales presentan diferente capacidad para controlar la replicación viral [60], pero aún no se ha explorado si la respuesta a través de estimulación por TLR, pudiera tener un papel en la efectividad de respuestas de linfocitos T CD8⁺.

Se ha reportado que la estimulación por TLRs 7 y 8 que detectan PAMPs virales, mediada por células presentadoras de antígeno como las DC, culmina en respuestas anti-VIH mediadas por células NK y T CD8⁺ [98], y que los agonistas de TLR pueden influenciar la magnitud y calidad de las respuestas de células T [164]. Reportes recientes han mostrado que determinados polimorfismos en TLR7 y en TLR8 están asociados con cambios en la progresión de la enfermedad, acelerando o restringiendo la progresión, respectivamente [99, 101]. En el contexto de la infección por VIH-1, se ha propuesto la activación inmunológica provocada por ligandos de TLR (PAMPs virales y bacterianos) como un mecanismo central en la inmunopatogénesis de la infección [92, 165, 166]. Ante esta disyuntiva, es importante aclarar el papel de la estimulación por TLR que detectan PAMPs virales o bacterianos en el establecimiento y efectividad de respuestas citotóxicas por células T CD8⁺ o NK. Por lo tanto, en este proyecto se propone investigar si las diferentes respuestas de células T CD8⁺ y NK, debidas a las diferencias en la capacidad de estimulación por TLR, pueden influenciar la velocidad de progresión hacia SIDA.

3. HIPÓTESIS

La expresión de TLRs en poblaciones leucocitarias será mayor en individuos con VIH-1 en comparación con donadores sanos e individuos que controlan la infección y estará asociada con marcadores de progresión, activación e inflamación.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Determinar las asociaciones de la expresión de TLRs y marcadores de activación con marcadores inflamatorios y de progresión de la infección por VIH-1.

4.2 Objetivos Particulares

- Cuantificar la expresión de mRNA de TLRs en PBMC totales.
- Realizar estudios de inmunofenotipificación en subpoblaciones de DC, células NK y linfocitos T para cuantificar:
 - frecuencias de cada población
 - la expresión de TLR2, 3, 4, 6 y 9
 - la expresión de marcadores de activación. DC: CD80 y CD86; células NK: CD38, HLA-DR y CD69; linfocitos T: CD38 y HLA-DR
- Cuantificar marcadores de inflamación: fibrinógeno, proteína C reactiva y citocinas en plasma/suero.
- Cuantificar sCD14 como marcador de activación inmunológica innata e indicador indirecto de translocación de productos bacterianos en plasma.
- Analizar el efecto del TAR en la expresión de TLRs, marcadores de activación, inflamación y translocación bacteriana en individuos con VIH-1.
- Realizar análisis correlativo para identificar asociaciones entre la expresión de TLRs en diferentes subpoblaciones celulares, activación, inflamación y translocación bacteriana asociados con la infección por VIH-1.

5. METODOLOGIA

Uso de laboratorios de Bioseguridad Nivel 3. El proyecto se realizó después de completar el entrenamiento adecuado para trabajar en los laboratorios de Bioseguridad Nivel 3 en el Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER).

Grupos de estudio y Muestras sanguíneas. Se reunió una cohorte de 166 adultos, de los cuales 132 se encontraban infectados por VIH. Los individuos con VIH-1 fueron subdivididos en grupos considerando su CV y cuentas de linfocitos T CD4⁺ y presencia o ausencia de TAR en: a) controladores virémicos (CV 40-2 000 copias/ml, linfocitos T CD4⁺ >350 cels/μl, sin TAR); b) controladores “élite” (CV <40 copias/ml, linfocitos T CD4⁺ >350 cels/μl, sin TAR); c) individuos en fase crónica (CV >10 000 copias/ml, linfocitos T CD4⁺ >200 cels/μl, sin TAR); d) individuos en SIDA (CV >10 000 copias/ml, linfocitos T CD4⁺ <200 cels/μl, sin TAR); e) individuos que reciben TAR (TAR⁺, CV <40 copias/ml). Ninguno de los individuos con VIH-1 se presentó con enfermedades oportunistas aparentes. Se incluyó un grupo de individuos sin VIH-1 libre de enfermedades oportunistas aparentes, hepatitis B-negativos y hepatitis C-negativos como grupo control.

Los controladores virémicos y controladores élite fueron analizados como grupos independientes, de manera que ningún individuo fue incluido en ambos grupos. Los criterios de inclusión para estos grupos han sido publicados previamente [55, 167, 168].

En los análisis de correlación se incluyeron seis individuos bajo TAR con CV de entre 2 000 y 10 000 copias/ml (no considerados en los análisis categóricos), con una mediana de CV de 5 026 copias/ml y de conteo de linfocitos T CD4⁺ de 510 cels/μl.

Todos los experimentos fueron realizados a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas a partir de muestras de sangre de los individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Las muestras fueron procesadas una vez otorgado el consentimiento informado escrito de los participantes de acuerdo con las reglamentaciones del Comité de Ciencia y Bioética del INER. Las muestras de sangre se colectaron en tubos *vacutainer*

con heparina o EDTA (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) y las PBMC fueron obtenidas por separación por gradiente de densidad con Lymphoprep (Axis-Shield, Norton, MA, USA). Se separaron muestras de suero y plasma para cuantificar marcadores de inflamación y citocinas, las cuales fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

Se realizaron pruebas de cuantificación de células T CD4^{+} y CV para todos los individuos con VIH-1. Se cuantificó la CV de citomegalovirus (CMV) y herpes virus humano-8 (HHV-8) en todos los participantes. La CV de VIH-1 y CMV se determinaron mediante PCR en tiempo real (qPCR) automatizado utilizando el sistema m2000 (Abbott, Abbott Park, IL). Las cuentas de células T CD4^{+} fueron obtenidas por citometría de flujo utilizando el kit Trucount en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA). La CV de HHV-8 se determinó por qPCR utilizando el kit Roche LightMix Kit en un termociclador LightCycler (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

Tinción de citometría de flujo para fenotipificación de expresión de TLRs. Las DC, células NK y linfocitos T CD8^{+} y CD4^{+} fueron analizadas a partir de PBMC frescas por citometría de flujo multiparamétrica utilizando tres paneles diferentes, y realizando dos combinaciones de tinción para cada subpoblación (Tabla 2.1). Se utilizó el marcador de viabilidad Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) para excluir células muertas. Los anticuerpos utilizados fueron: CD80 Horizon-V450, CD86 APC, Lineage cocktail-1-FITC, CD11c-PE-Cy5, CD123-PerCP-Cy5.5, HLA-DR-APC Cy7, CD4-FITC, CD4-APC-Cy7, CD8-Alexa Fluor 700, streptavidina-V450, CD3-V450, CD14-Pacific Blue, CD56-FITC, CD16-APC-Cy7, HLA-DR-PE-Cy7, CD38-PerCP-Cy5.5, estreptavidina-PE-Texas Red (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD69-PE-Cy7, TLR2-Alexa Fluor 700, TLR3-PE, TLR4-Alexa Fluor 700, TLR6 biotina y TLR9-PE (eBiosciences, San Diego, CA, USA). Todos los anticuerpos fueron titulados previamente para optimizar la concentración utilizada.

Brevemente, se resuspendieron 10^6 células en buffer PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, St. Louis, MO, USA) para la tinción de viabilidad. Se lavaron y resuspendieron las células con PBA (PBS, 1% albúmina de suero bovino, 0.1% azida de sodio) y se realizó la

tinción extracelular incubando a 4°C durante 15 minutos. Se lavaron y resuspendieron las células con PBA y se realizó la tinción indirecta con estreptavidina durante 15 minutos a 4°C. Se lavaron y resuspendieron las células con Permash 1X ((BD Biosciences) y se incubaron con 250 µl de solución permeabilizadora Cytifix/Cytoperm ((BD Biosciences) durante 20 minutos a 4°C en la oscuridad. Se lavaron y resuspendieron las células con Permash 1X y se tiñó con los anticuerpos intracelulares durante 30 minutos a 4°C. Se lavaron nuevamente las células con Permash 1X y se fijaron con 1% de formaldehído en PBS. Las DC fueron adquiridas en un citómetro FACS Aria (BD Biosciences) dentro de las primeras 24 horas después de la tinción. Las células NK y linfocitos T fueron adquiridos en un citómetro LSR II Fortessa (BD Biosciences) dentro de las primeras 24 horas después de la tinción. El análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo V7.5.2 (Tree Star, San Carlos, CA, USA).

Tabla 2.1. Páneles utilizados para la inmunofenotipificación.

DC		Células NK		Linfocitos T	
1	2	1	2	1	2
LIN-1 FITC	LIN-1 FITC	CD56 FITC	CD56 FITC	CD4 FITC	TLR4 AF488
TLR6 Biot + Spv V450	CD80 V450	CD3 V450	CD3 V450	CD3 V450	CD3 V450
CD11c PE Cy5	CD11c PE Cy5	CD69 PE Cy7	HLA-DR PE Cy7	CD45RA PE Cy5	CD45RA PE Cy5
TLR2 AF700	TLR4 AF700	CD38 PerCP Cy5.5	CD38 PerCP Cy5.5	CCR7 PE Cy7	CCR7 PE Cy7
CD123 PerCP-Cy5.5	CD123 PerCP-Cy5.5	CD16 APC Cy7	CD16 APC Cy7	CD38 PerCP Cy5.5	CD38 PerCP Cy5.5
HLA-DR APC Cy7	HLA-DR APC Cy7	TLR2 APC	TLR4 AF700	HLA-DR APC Cy7	CD4 APC Cy7
CD86 APC	CD86 APC	TLR6 Biot + Spv PE-Tx		TLR2 APC	
TLR3 PE	TLR9 PE	TLR3 PE	TLR9 PE	TLR6 Biot + Spv PE-Tx	
Viabilidad Aqua Blue	Viabilidad Aqua Blue	Viabilidad Aqua Blue	Viabilidad Aqua Blue	TLR3 PE	TLR9 PE
				Viabilidad Aqua Blue	Viabilidad Aqua Blue

Spv, estreptavidina; AF, Alexa Fluor; Biot, biotina; PE-Tx, PE-Texas Red

Tinción de citometría de flujo para fenotipificación de marcadores de activación en células NK y linfocitos T. Las células NK y linfocitos T fueron analizadas a partir de PBMC frescas por citometría de flujo multiparamétrica utilizando dos paneles diferentes. 1) Células NK: CD3-V450, CD14-Pacific Blue, CD56-FITC, CD16-APC-Cy7, HLA-DR-PE-Cy7, CD38-PerCP-Cy5.5, (BD Biosciences), CD69-PE-Cy7 (eBiosciences). 2) Linfocitos T: CD3-V450, CD4-FITC, CD8-Alexa Fluor 700, HLA-DR-APC-Cy7 and CD38-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences). Se utilizó el marcador de viabilidad Live/Dead Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) para excluir células muertas. Todos los anticuerpos fueron titulados previamente para optimizar la concentración utilizada. Brevemente, se resuspendieron 10^6 células en buffer PBS (Phosphate Buffered Saline, Sigma, St. Louis, MO, USA) para la tinción de viabilidad. Se lavaron y resuspendieron las células con PBA y se realizó la tinción extracelular incubando a 4°C durante 30 minutos. Se lavaron y resuspendieron las células con PBA y se fijaron con 1% de formaldehído en PBS. Las células fueron adquiridas en un citómetro LSR II Fortessa (BD Biosciences) dentro de las primeras 24 horas después de la tinción. El análisis de datos se realizó utilizando el software FlowJo V7.5.2 (Tree Star).

qRT-PCR para cuantificación de RNAm de TLRs. Se conservaron 10^7 células en 300 μl de RNAlater (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) a -80°C . La extracción de RNA se realizó con columnas QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La reacción de retrotranscripción (RT) se realizó a partir de 100 ng de RNA con el kit RT² Easy First Strand Kit (SABiosciences, Frederick, MD, USA). El cDNA se diluyó en 91 μl de agua y posteriormente se llevó a cabo una PCR cuantitativa utilizando placas diseñadas con primers específicos para los TLRs 1-10, Custom RT² Profiler PCR Array (SABiosciences) y con la mezcla de reacción RT² SYBR Green ROX qPCR Mastermix (SABiosciences) de acuerdo con las especificaciones del fabricante, en un termociclador AB7500 (Applied Biosystems). Se utilizaron como genes endógenos de referencia β -actina (ACTB, expresión intermedia) e hipoxantina-guanina fosforribosil-transferasa (HPRT, expresión baja). La expresión relativa se calculó utilizando el método comparativo de $\Delta\Delta\text{C}_T$, en donde el primer $\Delta\text{C}_T = \text{Ct gen de interés} - \text{Ct del gen endógeno}$, es decir, $\Delta\text{C}_T = \text{Ct TLR} - \text{Ct}$

HPRT/ACTB. El segundo $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ muestra de interés - ΔC_T calibrador. En este caso, se consideró como calibrador a la mediana del grupo control sin VIH-1. Finalmente, la expresión relativa se calculó como $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Cuantificación de proteína C reactiva y fibrinógeno. En el laboratorio clínico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias se cuantificó proteína C reactiva como marcador de inflamación a partir de suero de los individuos analizados. En el departamento de hematología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición se cuantificó fibrinógeno como marcador de inflamación a partir de plasma de los individuos analizados. Ambos marcadores fueron cuantificados por nefelometría.

Cuantificación de CD14 soluble. Como marcador indirecto de translocación bacteriana y marcador de activación inmunológica innata de monocitos/macrófagos se midió por ELISA la cantidad de sCD14 a partir de muestras de plasma congelado (diluido 1:400) de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Human sCD14 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN).

Cuantificación de citocinas y quimiocinas. Utilizando un panel de Multiplex, se cuantificó un panel de 26 citocinas y quimiocinas a partir de plasma congelado: eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF- α y TNF- β (Milliplex MapKit, Millipore, Billerica, MA) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, utilizando un equipo Luminex200 (Luminex, Austin, TX). Los datos se analizaron con el software Milliplex Analyst (VigeneTech, Carlisle, MA).

Análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó con StatView 5.2.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA) y Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Se utilizaron pruebas no paramétricas U-Mann Whitney, correlaciones de Spearman, pruebas de Kruskal-Wallis corregidas con posttest de Dunnet para corrección por múltiples comparaciones. Los análisis multivariados se realizaron por análisis de regresión múltiple.

6. RESULTADOS

6.1 Características de la Cohorte Estudiada

Se analizaron transversalmente muestras de 166 individuos, 26 donadores sin VIH-1 (VIH- en Figuras) y 140 individuos con VIH-1 divididos en grupos como se especificó en la sección de Metodología con base en su CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺ y presencia o ausencia de TAR en: controladores élite, controladores, progresores crónicos, SIDA y con TAR (TAR+ en Figuras). En los análisis de correlación se incluyeron seis individuos sin TAR con CV de entre 2 000 y 10 000 copias/ml (no considerados en los análisis categóricos), catalogados como progresores crónicos con viremia baja (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Población de estudio.

	<i>n</i>	Género	T CD4 ⁺ (cels/μl)	CV (copias/ml)	Nadir T CD4 ⁺ (cels/μl)	Meses en TAR
VIH-1⁺						
Controladores élite	8	3 H 5 M	1,124 (849-1,285)	40 (40-68) ^a	853 (689-971)	NA
Controladores	14	8 H 6 M	605 (472-822)	495 (124-1,773)	478 (365-589)	NA
Progresores crónicos con viremia baja	6	6 H 0 M	510 (458-549)	5,026 (3,540-7,412)	405 (341-521)	NA
Progresores crónicos	35	35 H 0 M	356 (284-511)	35,568 (18,200-161,135)	331 (255-484)	NA
SIDA	18	15 H 3 M	41 (13-41)	187,278 (59,470-360,098)	33 (12-33)	NA
TAR ⁺	59	52 H 7 M	394 (284-537)	<40	112 (32-229)	22 (9-52)
VIH-1⁻						
Controles VIH-1 ⁻	26	18 H 8 M	-	-	-	NA

H, hombres; M, mujeres; NA, no aplica; TAR, tratamiento anti-retroviral. Los datos de CV, números de células T CD4⁺ y meses de tratamiento se muestran en mediana y 1^{er}-3^{er} cuartiles señalados entre paréntesis.

^aDos individuos presentaron *blips*³ de CV en la fecha de la toma de muestra [169].

En el grupo de individuos que mantienen CV baja o indetectable de manera natural (controladores y controladores élite) se encontró una mayor proporción de mujeres,

³ Se entiende por un *blip* en la CV a un episodio intermitente de bajos niveles de viremia detectable que vuelven espontáneamente a la indetectabilidad sin necesidad de cambios en TAR.

mientras que en los grupos de progresores crónicos y SIDA la población fue mayoritariamente masculina, de acuerdo a lo que se ha reportado en población mexicana. Sin embargo, a pesar de las diferencias de entre los grupos estudiados, no se encontró ninguna asociación entre el género y la expresión de los marcadores analizados en el estudio.

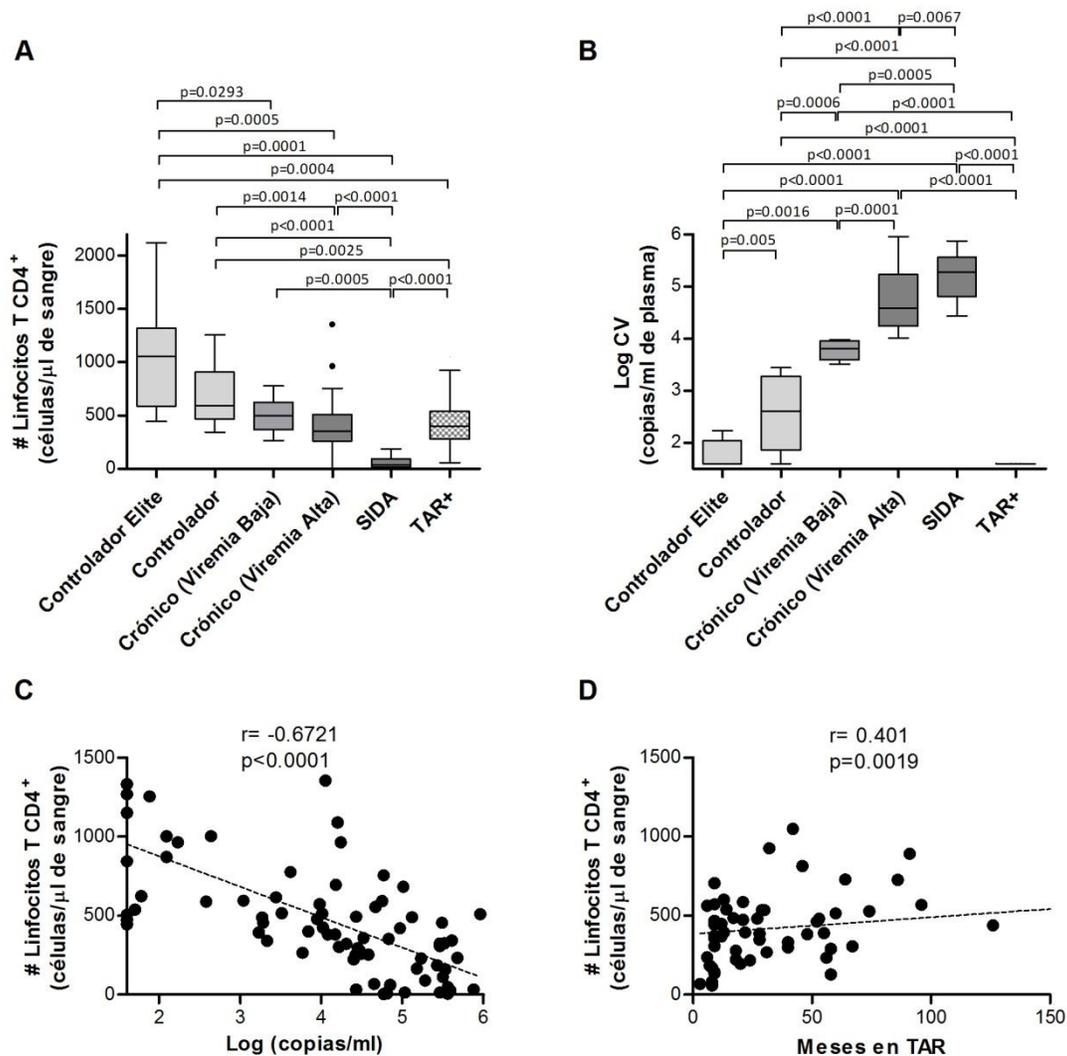


Figura 6.1. Características clínicas de los individuos con VIH-1 analizados. A) Distribución de valores de CV. B) A) Cuentas de linfocitos T CD4⁺. C) Correlación de Spearman de CV y cuentas de linfocitos T CD4⁺. D) Correlación de Spearman de meses en TAR con cuentas de linfocitos T CD4⁺ en el grupo de individuos con TAR. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. Los puntos representan datos fuera del percentil 10-90. La línea indica la mediana del grupo.

En la Figura 6.1, se muestran las diferencias en las distribuciones de cuentas de linfocitos T CD4⁺ y de CV en los individuos con VIH-1 reclutados. Como se esperaba, no se encontraron diferencias entre las cuentas de linfocitos T CD4⁺ de los controladores elite y controladores y éstas fueron menores que los progresores crónicos y en SIDA ($p < 0.01$ en todos los casos, Figura 6.1A). Se observó una recuperación parcial de linfocitos T CD4⁺ con el inicio del TAR, aunque no se alcanzaron niveles similares a otros individuos con viremia indetectable ($p = 0.0004$). Las CV de todos los grupos fueron significativamente diferentes entre sí (Figura 6.1B). Se observó una correlación negativa típica entre la CV y las cuentas de linfocitos T CD4⁺ en los individuos con VIH-1 libres de TAR (Figura 6.1C), mostrando que a menor cantidad de linfocitos T CD4⁺ se encuentra una CV mayor ($r = -0.6721$ $p < 0.0001$). En el grupo con TAR, se observó una correlación positiva entre el tiempo de TAR y el número de linfocitos T CD4⁺, indicando que a mayor tiempo de tratamiento se hay un incremento en las cuentas linfocitarias ($r = 0.401$ $p = 0.0019$, Figura 6.1D).

6.2 Frecuencias de subpoblaciones leucocitarias: Inmunofenotipificación

Células Dendríticas. Se caracterizó a las DC como células negativas para marcadores de linaje de linfocitos B/T, monocitos/macrófagos y células NK, que expresan moléculas presentadoras de antígenos (HLA-II). Las subpoblaciones se identificaron con base en su expresión de CD11c y CD123 como DC convencionales y DC plasmacitoides siguiendo la estrategia de análisis que se muestra en la Figura 6.2A [170, 171]. De acuerdo a reportes anteriores [172-174], se encontró una disminución significativa en la frecuencia de DC convencionales en individuos con infección avanzada ($p = 0.05$ en crónicos y $p = 0.0045$ en SIDA) con respecto a los donadores sin VIH-1 (Figura 6.2B). La frecuencia de DC convencionales fue menor en individuos en SIDA, aún en comparación con el grupo de progresores crónicos ($p = 0.0448$) y controladores ($p = 0.017$), pero no con los controladores elite. El TAR incrementó la frecuencia de DC convencionales alcanzando niveles cercanos a los del grupo control. En individuos infectados con VIH-1 sin TAR, se observó que la frecuencia de DC convencionales correlacionó positivamente con las cuentas de linfocitos T CD4⁺ ($r = 0.3663$ $p = 0.002$), pero no con otros marcadores clínicos de progresión de la

infección como CV y cantidad de linfocitos T $CD8^+$ $CD38^+$ $HLA-DR^+$. Tampoco se observaron asociaciones entre el tiempo de tratamiento y la frecuencia de DC convencionales en individuos con TAR.

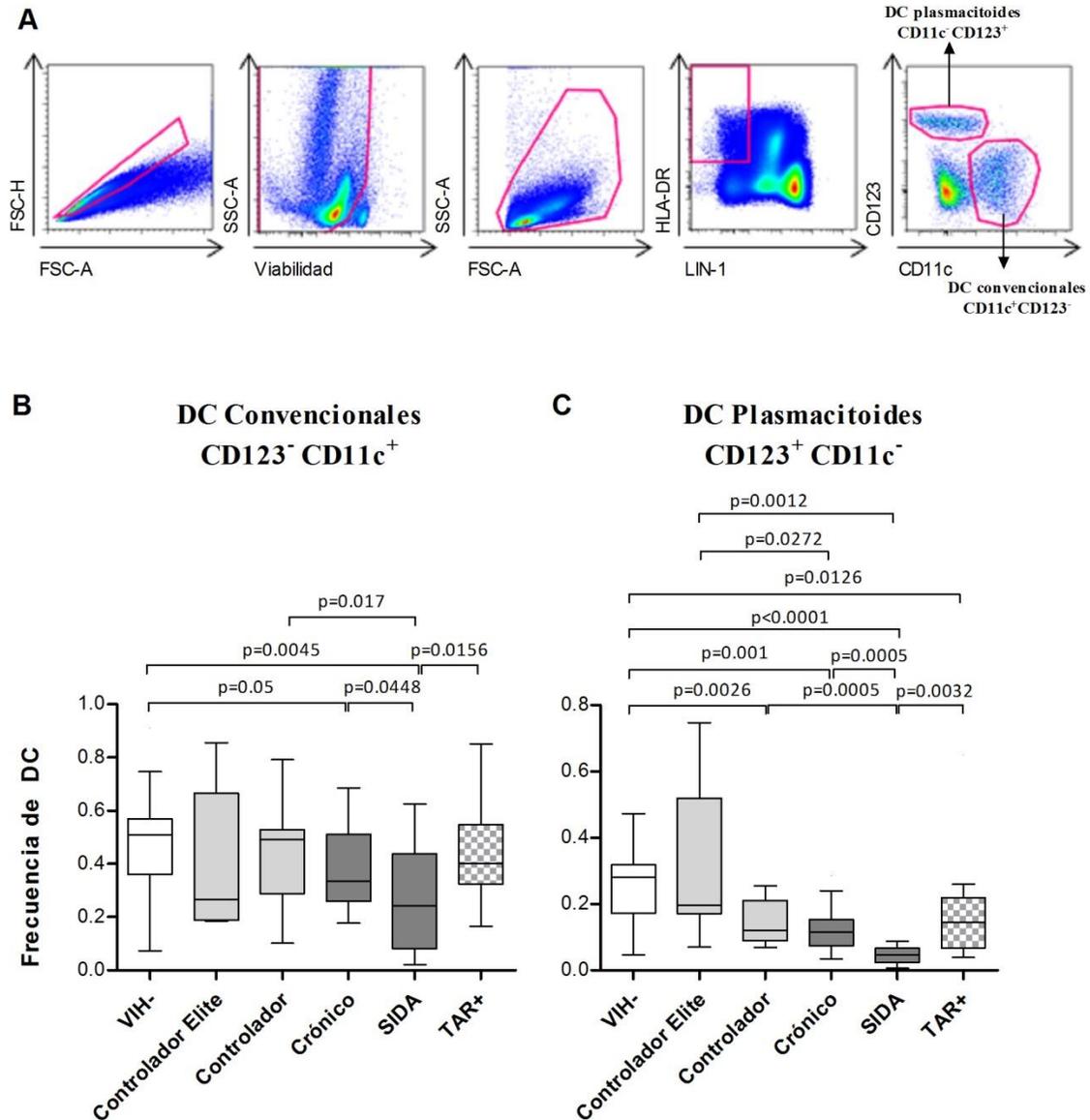


Figura 6.2. Distribución de DC convencionales y plasmacitoides en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. **A)** Estrategia de análisis de citometría de flujo: se seleccionaron las células no agregadas, vivas, granulocitos identificados por su morfología (FSC-A vs. SSC-A), células HLA DR⁺, linaje (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)- negativas. Se identificaron las DC convencionales o plasmacitoides con base en su expresión de CD11c y CD123, definiéndolas como cDC $CD11c^+ CD123^-$, y pDC $CD123^+$. **B)** Frecuencia de DC convecionales y **C)** plasmacitoides. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=19), controladores élite (n=7), controladores (n=12), crónicos (n=18), SIDA (n=15), con TAR (n=15).

Por otra parte, la disminución en la frecuencia de DC plasmacitoides (Figura 6.2C) se observó en todos los individuos con VIH-1 con viremia detectable en comparación con los donadores sin VIH-1 ($p < 0.01$ en todos los casos). Los controladores élite mantuvieron frecuencias similares al grupo control y mayores a los individuos en etapa tardía de la infección (crónicos y SIDA, $p = 0.0272$ y $p = 0.0012$, respectivamente). Los individuos en SIDA tuvieron una frecuencia significativamente menor de DC plasmacitoides que los controladores y progresores crónicos ($p = 0.0005$ en ambos casos). De manera similar a lo observado en las DC convencionales y en concordancia con publicaciones anteriores [173, 175], el TAR incrementó la frecuencia de DC plasmacitoides con respecto al grupo en SIDA ($p = 0.0032$), pero no se alcanzaron niveles similares a los del grupo control ($p = 0.0126$).

De manera interesante, la frecuencia de DC plasmacitoides correlacionó con todos los marcadores clínicos de progresión a la infección por VIH-1. De acuerdo con publicaciones anteriores [176, 177], se encontró una correlación positiva con el número de linfocitos T CD4⁺ ($r = 0.489$ $p = 0.0001$) y nadir de linfocitos T CD4⁺ ($r = 0.535$ $p < 0.0001$) y negativa con la CV ($r = -0.476$ $p = 0.0002$) y porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ ($r = -0.394$ $p = 0.0029$). Al analizar al grupo con TAR, no se observó una asociación entre el tiempo de tratamiento y la frecuencia de DC plasmacitoides.

Los resultados obtenidos indican que, de acuerdo a lo esperado, el avance de la infección por VIH-1 afecta la frecuencia de DC. En particular, la disminución en la frecuencia de DC plasmacitoides fue mayor y correlacionó con marcadores clínicos de progresión de modo que a mayor avance de la infección hay una menor proporción de estas células.

Células NK. Para el análisis de células NK se seleccionaron los linfocitos CD3⁻ CD14⁻ para excluir células T y monocitos/macrófagos. Con base en su expresión de CD56 y CD16 se identificaron tres subpoblaciones: CD56^{bright} CD16⁻, CD56^{dim} CD16⁺ y CD56⁻ CD16⁺ [42, 110] (Figura 6.3A). De acuerdo con publicaciones anteriores [110, 111, 178], se encontraron cambios en las frecuencias de células NK en individuos con VIH-1 en las tres subpoblaciones celulares (Figura 6.3B-D). La frecuencia de células NK CD56^{dim} CD16⁺ se encontró disminuida en los individuos con VIH-1 e infección avanzada (crónicos y SIDA,

$p < 0.01$ en ambos casos) con respecto a donadores sanos, y se recuperó en los individuos con TAR en comparación con los individuos en SIDA, alcanzando niveles similares a los del grupo control (Figura 6.3B). Por el contrario, la frecuencia de las células NK $CD56^{bright} CD16^{-}$ se encontró aumentada en los individuos en SIDA en comparación con los grupos de crónicos y con TAR (Figura 6.3C). Como se esperaba, la frecuencia de las células NK disfuncionales $CD56^{-} CD16^{+}$ fue significativamente mayor en todos los individuos con VIH-1 independientemente de su CV y del TAR (Figura 6.3D, $p < 0.01$ en todos los casos). Sin embargo, la frecuencia de esta subpoblación disminuyó parcialmente con el TAR con respecto a los individuos en SIDA ($p < 0.0001$).

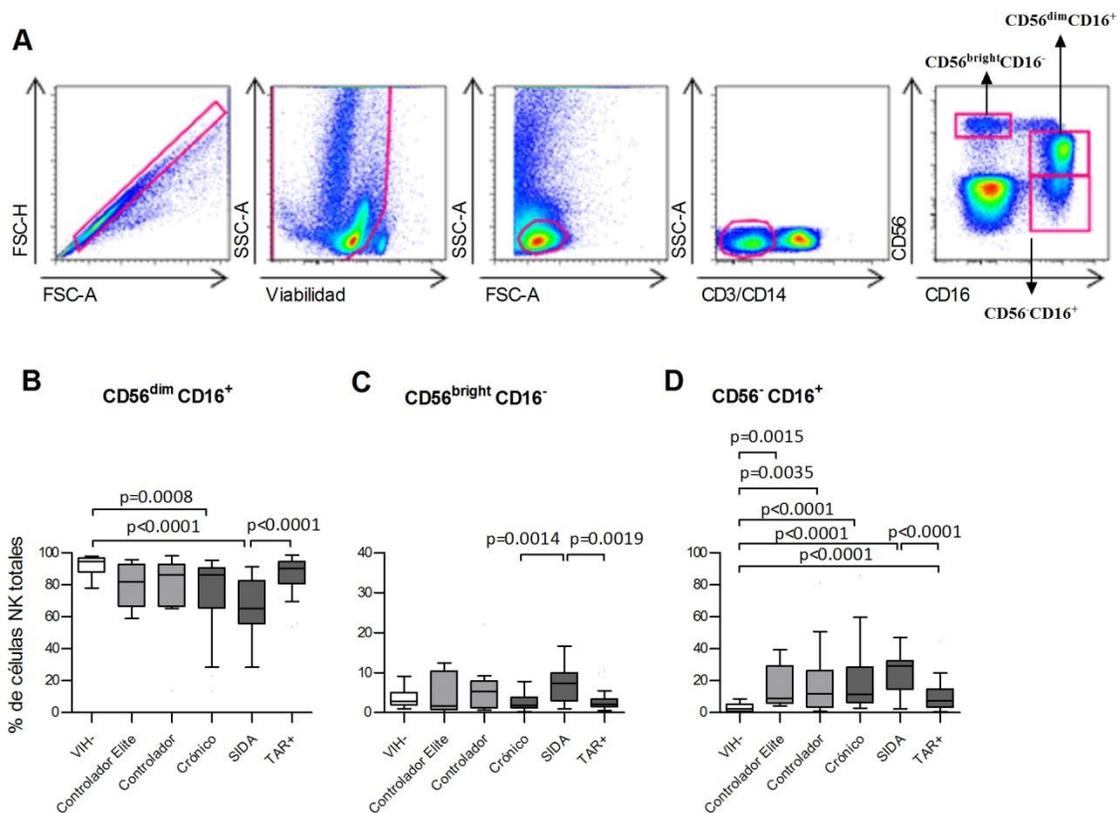


Figura 6.3. Distribución de células NK en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Estrategia de análisis de citometría de flujo: se seleccionaron las células no agregadas, vivas, linfocitos identificados por su morfología (FSC-A vs. SSC-A), linfocitos $CD3^{+} CD14^{-}$. Se identificaron las subpoblaciones de células NK con base en su expresión de CD56 y CD16, definiéndolas como $CD56^{bright} CD16^{-}$, $CD56^{dim} CD16^{+}$ y $CD56^{-} CD16^{+}$. B) Frecuencia de células NK $CD56^{dim} CD16^{+}$. C) Frecuencia de células NK $CD56^{bright} CD16^{-}$. D) Frecuencia de células NK $CD56^{-} CD16^{+}$. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=21), controladores élite (n=8), controladores (n=13), crónicos (n=26), SIDA (n=15), con TAR (n=58).

No se encontraron asociaciones entre las frecuencias de las subpoblaciones de células NK y marcadores de progresión de la infección por VIH-1 en individuos sin TAR. Sin embargo, la frecuencia de células NK CD56⁻ CD16⁺ en el grupo con TAR correlacionó negativamente con el tiempo en tratamiento ($r=-0.4986$ $p<0.0001$), lo que indica que a mayor tiempo de tratamiento disminuye la frecuencia de esta subpoblación.

De acuerdo con publicaciones anteriores, nuestros resultados muestran que la distribución de subpoblaciones de células NK se ve afectada durante la infección por VIH-1. Las diferencias fueron más notorias en individuos con infección avanzada, mientras que la proporción de células NK CD56^{bright} CD16⁻ y CD56^{dim} CD16⁺ en controladores élite y controladores se mantuvieron similares a las del grupo control. El TAR revertió las proporciones de las subpoblaciones a los niveles observados en personas sin VIH-1 excepto en la subpoblación CD56⁻ CD16⁺.

Linfocitos T. Los linfocitos T se caracterizaron como células CD3⁺ CD4⁺ ó CD8⁺ (Figura 6.4A). Como se esperaba, se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ en todos los individuos con VIH-1 con viremia detectable en comparación con el grupo control ($p<0.05$ en todos los casos, Figura 6.4B). Además, la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ fue significativamente menor en individuos con infección avanzada (crónicos y SIDA) en comparación con los controladores y controladores élite ($p<0.01$ en todos los casos). Los individuos en SIDA tuvieron un porcentaje menor que los progresores crónicos ($p=0.009$). El TAR recuperó parcialmente la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ con respecto a progresores crónicos y en SIDA ($p<0.01$ en ambos casos), pero no se alcanzaron los niveles basales ($p<0.0001$).

En el caso de los linfocitos T CD8⁺ se encontró un fenómeno opuesto al observado con los CD4⁺ (Figura 6.4C). Se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ en todos los individuos con viremia detectable en comparación con el grupo control y los controladores élite ($p<0.01$ en todos los casos). Los progresores crónicos y en SIDA también tuvieron mayores frecuencias de linfocitos T CD8⁺ en comparación con los controladores ($p<0.05$ en ambos casos). El TAR disminuyó parcialmente las frecuencias de linfocitos T CD8⁺ observadas en los individuos en fase avanzada de la infección (crónicos y

SIDA), pero no se alcanzaron niveles similares a los observados en el grupo control (p=0.0004).

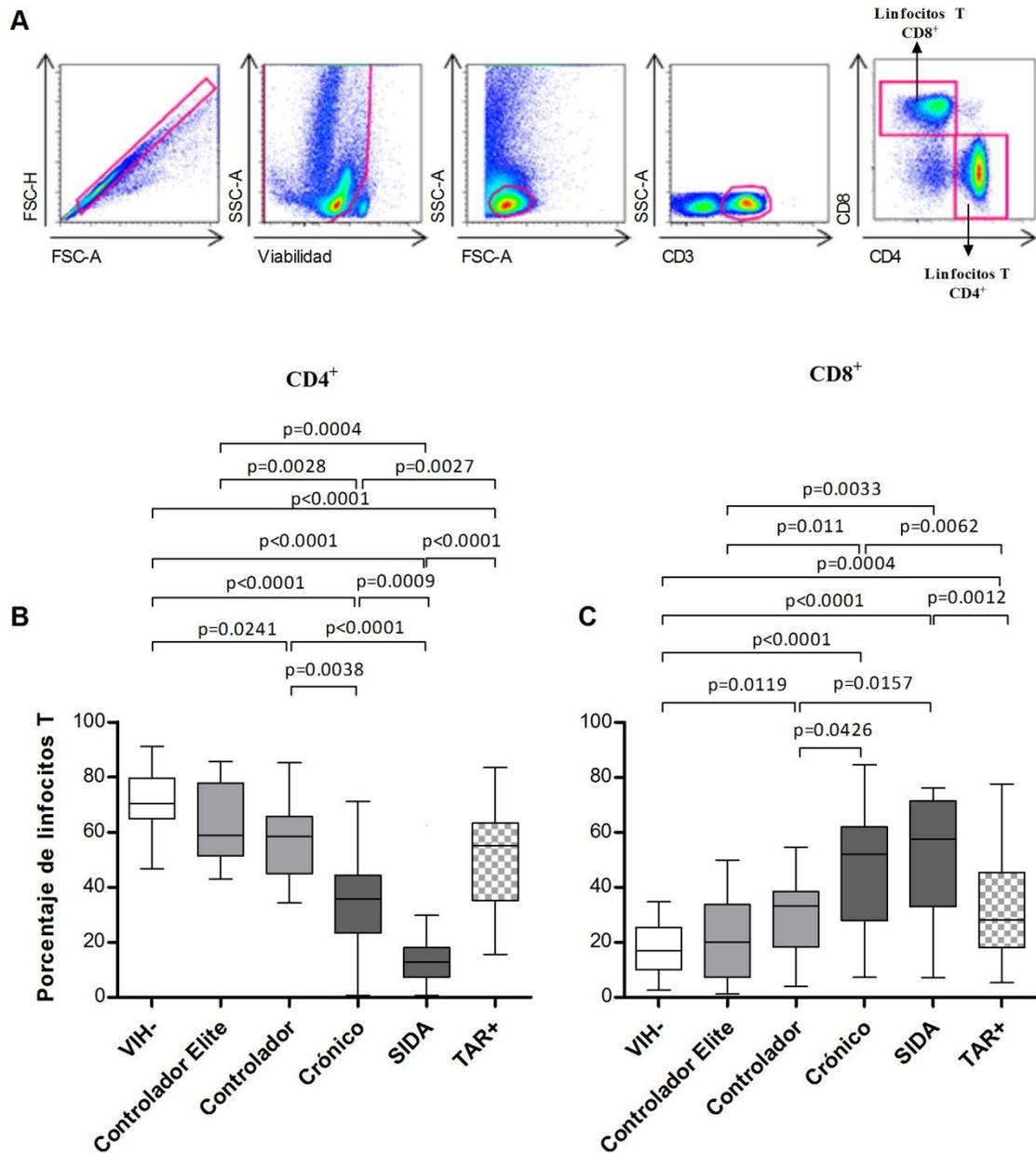


Figura 6.4. Distribución de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Estrategia de análisis de citometría de flujo: se seleccionaron las células no agregadas, vivas, linfocitos identificados por su morfología (FSC-A vs. SSC-A), linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ ó CD8⁺. B) Porcentaje de linfocitos T CD4⁺. C) Porcentaje de linfocitos T CD8⁺. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=25), controladores elite (n=8), controladores (n=12), crónicos (n=25), SIDA (n=15), con TAR (n=55).

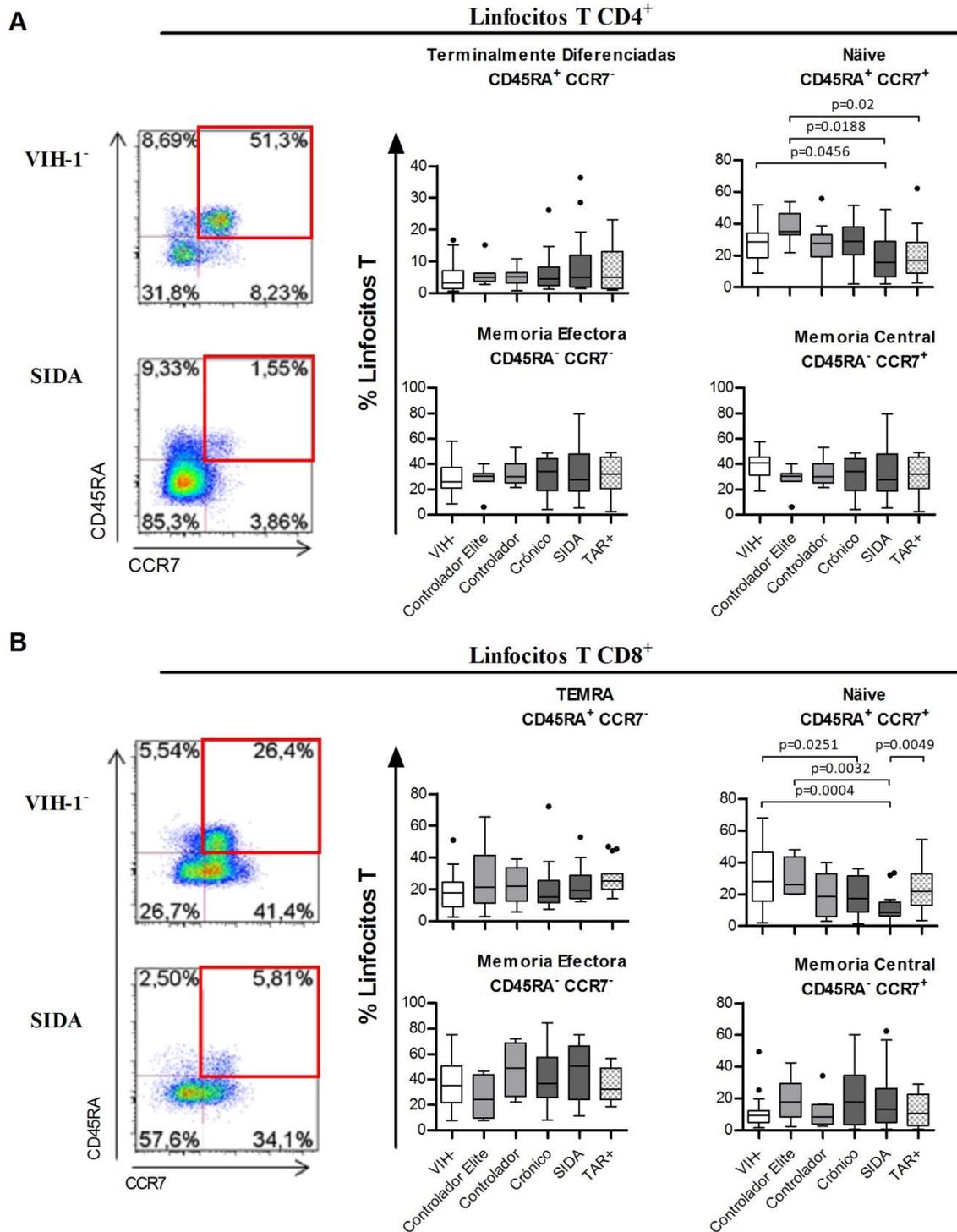


Figura 6.5. Distribución de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Dot plots representativos de las subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ en un donador sin VIH-1 y un individuo en SIDA (izquierda). Distribución de subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ (derecha). **B)** Dot plots representativos de las subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ en un donador sin VIH-1 y un individuo en SIDA (izquierda). Distribución de subpoblaciones de linfocitos T CD8⁺ (derecha). El número dentro del cuadrante indica el porcentaje de linfocitos T que corresponden a la subpoblación. Se recuadra en

rojo el cuadrante correspondiente a los linfocitos T naïve. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. Los puntos representan datos fuera del percentil 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=26), controladores élite (n=8), controladores (n=12), crónicos (n=19), SIDA (n=14), con TAR (n=15).

Se identificaron las diferentes subpoblaciones de maduración de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ con base en su expresión de CCR7 y CD45RA. Se definieron como: a) células naïve CD45RA⁺ CCR7⁺, b) memoria efectora CD45RA⁻ CCR7⁻, c) memoria central CD45RA⁻ CCR7⁺, y d) terminalmente diferenciadas CD4⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻ o de memoria efectora CD45RA⁺ (TEMRA) en linfocitos T CD8⁺ CD45RA⁺ CCR7⁻. En la Figura 6.5 se muestra la distribución de las subpoblaciones de linfocitos T en los diferentes grupos de estudio y ejemplos representativos del cambio en las frecuencias de las subpoblaciones en un individuo sin VIH-1 y un individuo en SIDA. Como se esperaba, tanto en linfocitos T CD4⁺ (Figura 6.5A) como CD8⁺ (Figura 6.5B) se encontró una disminución en el porcentaje de células naïve en los individuos en SIDA con respecto al grupo control (p<0.05 en ambos casos). Las proporciones de células naïve en individuos sin VIH-1, controladores y controladores élite fueron similares para linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Adicionalmente, en los individuos T CD8⁺ se encontró un menor porcentaje de células naïve en el grupo de progresores crónicos con respecto a los donadores sin VIH-1 (p=0.0251). El TAR recuperó la proporción de linfocitos T CD8⁺ naïve en comparación con los individuos en SIDA (p=0.0049), alcanzando frecuencias similares a las del grupo control. Esto no se observó en los linfocitos T CD4⁺. No se encontraron diferencias significativas en las otras subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺.

Los resultados en las frecuencias de las subpoblaciones leucocitarias observados en la cohorte fueron consistentes con los reportados, mostrando cómo el avance de la enfermedad afecta de manera progresiva no solo a los linfocitos T CD4⁺, blanco directo de la infección por VIH-1, sino a otras poblaciones celulares.

6.3. Expresión de TLRs

6.3.1 Expresión de TLRs: Cuantificación de mRNA en PBMC totales

Como primer análisis del papel de los TLRs en la infección por VIH-1, se caracterizó la expresión de mRNA de los 10 TLRs en PBMC totales por qRT-PCR. Se realizó la cuantificación de expresión relativa utilizando dos genes endógenos como referencia de expresión: ACTB de expresión intermedia y HPRT de expresión baja. Dados los niveles de expresión del mRNA de TLRs, se seleccionó HPRT como gen de preferencia para los análisis. Como se muestra en la Figura 6.6, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en la expresión de los TLRs 1, 2, 5, 6, 7, 9 y 10. Se observó menor expresión de TLR3 en individuos con SIDA en comparación con los progresores crónicos ($p=0.0332$). Por el contrario, la expresión relativa de TLR4 (receptor que reconoce a LPS [84, 96, 166]) en controladores elite fue significativamente menor que en los donadores sin VIH-1 ($p=0.0278$), controladores e individuos en SIDA ($p=0.0234$ en ambos casos). De manera interesante, se encontró que el grupo de progresores crónicos tuvo mayor expresión de TLR8 (receptor que reconoce al RNA del VIH-1 [84, 96, 164, 166]) con respecto a los controladores (0.0403), pero no los individuos en SIDA que también viremia alta.

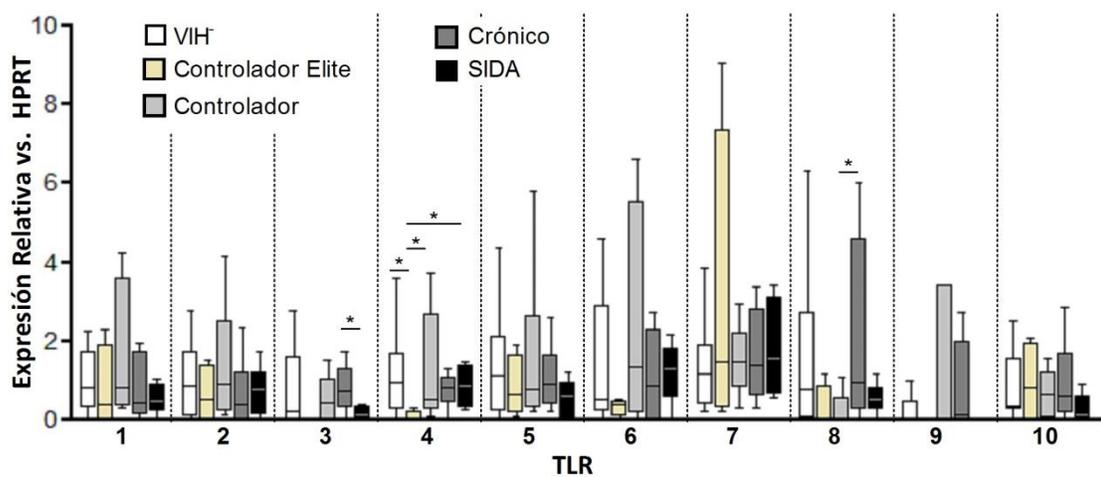


Figura 6.6. Expresión relativa de mRNA de TLRs en PBMC totales de individuos infectados con VIH-1 vs. donadores sin VIH-1. Se midió la expresión relativa de mRNA de los TLRs 1-10 a partir de PBMC totales con respecto al gen endógeno HPRT de expresión baja por qRT-PCR. La expresión relativa se calculó utilizando el método comparativo de $\Delta\Delta C_T$. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con la prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. * $p=0.05$

Dado que los TLRs se expresan en diferentes subpoblaciones celulares [83], el análisis sobre PBMC totales resultó poco específico para la cuantificación de la expresión de estos receptores. Por ello, se realizó la fenotipificación por citometría de flujo de TLRs en subpoblaciones leucocitarias específicas.

6.3.2 Expresión de TLRs en subpoblaciones leucocitarias: Inmunofenotipificación

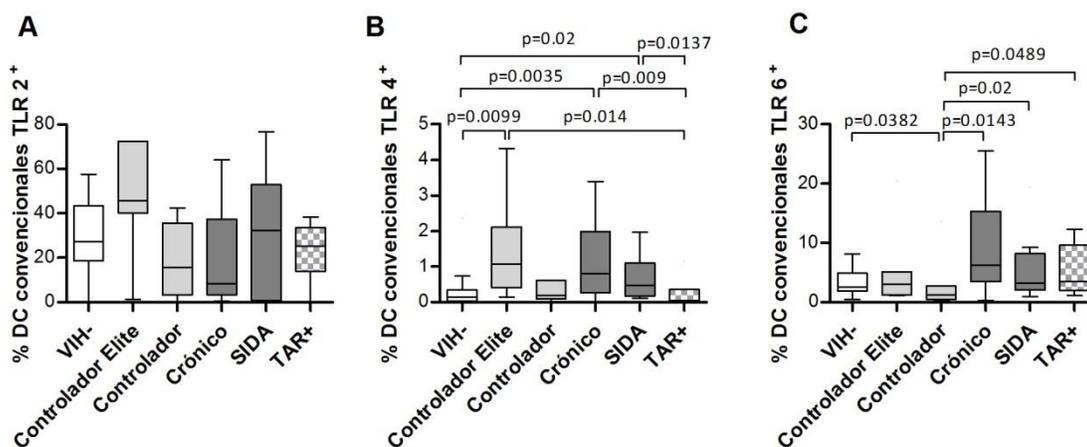
Con base en la disponibilidad de anticuerpos y configuraciones de los citómetros utilizados, se midió la expresión de los TLRs extracelulares 2, 4 y 6, e intracelulares 3 y 9 en subpoblaciones de DC, células NK y linfocitos T.

Células Dendríticas. Siguiendo la estrategia de análisis descrita en la Figura 6.2A, se cuantificó la frecuencia de DC convencionales que expresan TLR2, 3, 4 y 6 (Figura 6.7A-D) y DC plasmacitoides que expresan TLR9 (Figura 6.7E). No se encontraron diferencias entre grupos en la frecuencia de células **TLR2**⁺, pero el porcentaje de DC convencionales que expresan TLR2 en individuos infectados con VIH-1 sin TAR correlacionó negativamente con la activación en linfocitos T CD8⁺ ($r = -0.2904$ $p = 0.03$)⁴. El porcentaje de DC convencionales **TLR4**⁺ se encontró incrementado en los grupos de controladores élite, crónicos y SIDA en comparación con los individuos sin VIH-1 y con VIH-1 en TAR ($p < 0.02$ en todos los casos, Figura 6.7B). Resulta interesante recalcar que los controladores conservaron porcentajes similares al grupo control y al grupo con TAR, siendo el porcentaje de células positivas cercano a cero (medianas de 0.143% y 0.04%, respectivamente). Aun en los grupos donde se encontró incremento de células TLR4⁺, los porcentajes se mantuvieron por debajo del 1.5% (1.1% mediana de controladores élite, 0.8% mediana de crónicos). El porcentaje de células **TLR6**⁺ fue significativamente menor en los controladores en comparación con donadores sin VIH-1, progresores crónicos, en SIDA y con TAR ($p < 0.05$ en todos los casos, Figura 6.7C). Se observó una tendencia al incremento en la frecuencia de DC convencionales TLR6⁺ en progresores crónicos pero no alcanzó significancia estadística. En el caso de los TLRs intracelulares, se encontró un incremento en las DC convencionales **TLR3**⁺ en los individuos en SIDA en comparación con los donadores sin VIH-1, controladores élite y progresores crónicos ($p < 0.05$ en todos

⁴ Los resultados detallados de la activación de linfocitos T CD8⁺ se muestran en la Figura 6.14.

los casos), pero no con los controladores (Figura 6.7D). El TAR disminuyó de manera significativa la proporción de DC convencionales TLR3⁺ en comparación con individuos en SIDA (medianas de 4.3% y 27.4%, respectivamente, p=0.0024) alcanzando valores cercanos a los del grupo control (mediana del 7.9%). Los controladores, controladores élite y los progresores crónicos mantuvieron frecuencias similares de DC convencionales TLR3⁺ a los individuos sin VIH-1. Con la excepción de las células TLR2⁺, no se encontraron asociaciones entre los porcentajes de DC convencionales que expresan TLRs y marcadores clínicos de progresión a SIDA (CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺ y activación inmunológica medida como el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺).

TLR Extracelulares



TLR Intracelulares

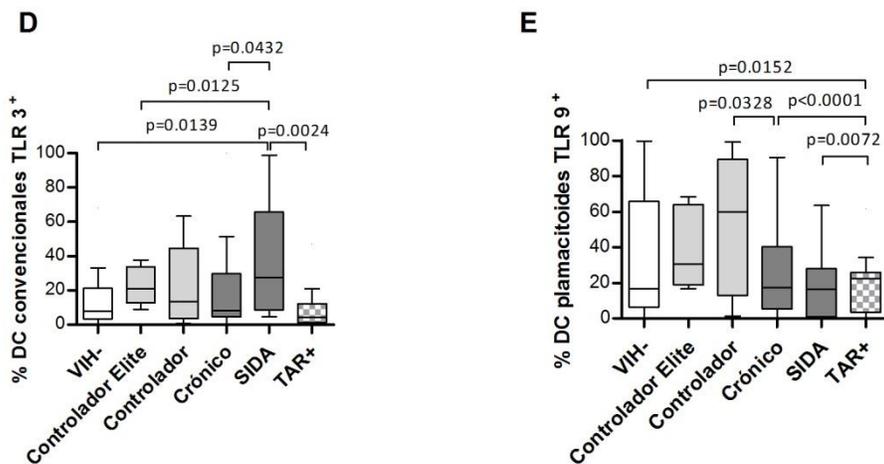


Figura 6.7. Expresión de TLRs en DC en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de DC convencionales que expresan TLR2, 3, 4 y 6 (A-D) y DC plasmacitoides que expresan TLR9 (E). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para

comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=19), controladores élite (n=7), controladores (n=12), crónicos (n=18), SIDA (n=15), con TAR (n=15).

En las DC plasmacitoides, se observó una tendencia a la disminución del porcentaje de células **TLR9⁺** en individuos con infección avanzada (mediana de: 17.4% en crónicos y 16.5% en SIDA) con respecto a los controladores (mediana de 60%) y controladores élite (mediana de 30.5%), aunque no se alcanzó significancia estadística (Figura 6.7E). Solamente se encontró una menor proporción de DC plasmacitoides **TLR9⁺** en progresores crónicos comparados con controladores (p=0.0328). No se encontraron asociaciones entre la frecuencia de DC plasmacitoides **TLR9⁺** y marcadores clínicos de progresión a SIDA. Adicionalmente, en el grupo con TAR se observó una menor frecuencia de células **TLR9⁺** (mediana de 22.3%) en comparación con los progresores crónicos y en SIDA (p<0.01 en ambos casos) pero esta disminución no correlacionó con los meses de tratamiento (p=0.23).

Células NK. Reportes anteriores han mostrado la expresión de mRNA de TLRs en células NK, pero no se conoce específicamente la expresión de estos receptores en membrana ni si hay diferencias entre subpoblaciones de NK [83]. Por ello, se cuantificó el porcentaje de células NK **TLR2⁺**, **3⁺**, **4⁺**, **6⁺** y **9⁺** en las tres subpoblaciones definidas con base en su expresión de CD56 y CD16 como se muestra en la Figura 6.3A. Las frecuencias de células NK **TLR2⁺** y **4⁺** fueron similares entre grupos de estudio en las tres subpoblaciones (Figura 6.8Ay B, Figura 6.9Ay B, Figura 6.10Ay B). Sin embargo, de manera similar a lo observado en DC convencionales, la frecuencia de células NK **CD56⁻ CD16⁺ TLR2⁺** correlacionó negativamente con el porcentaje de linfocitos T **CD8⁺** que expresan marcadores de activación (r= -0.34 p=0.0213).

La expresión de **TLR4** fue muy baja en la mayoría de los grupos, quedando con medianas menores al 1% y, en el caso de las células NK **CD56^{bright} CD16⁺**, la mediana de células **TLR4⁺** en los grupos de controladores, progresores crónicos y con TAR fue cero (Figura 6.9B). A pesar de que no se encontraron diferencias entre grupos en la expresión de **TLR4**,

el porcentaje de células NK $CD56^{\dim} CD16^+$ correlacionó positivamente con la cantidad de sCD14 ($r=0.36$ $p=0.0172$) en el análisis de individuos con VIH-1 sin TAR. Esta asociación resulta particularmente interesante debido a que tanto la frecuencia de esta subpoblación de células NK como la cantidad de sCD14 se encuentran incrementadas con la progresión de la infección.

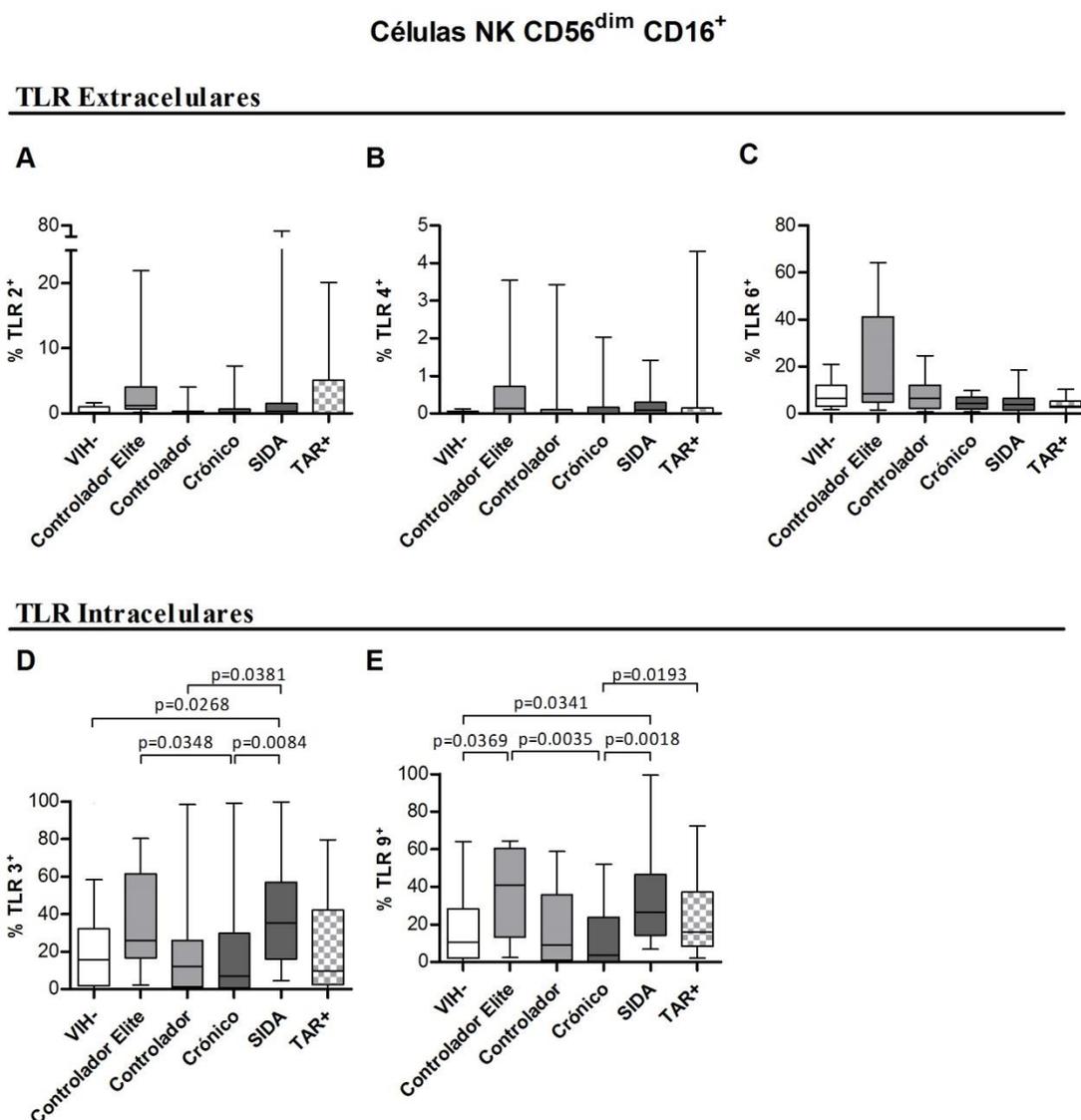
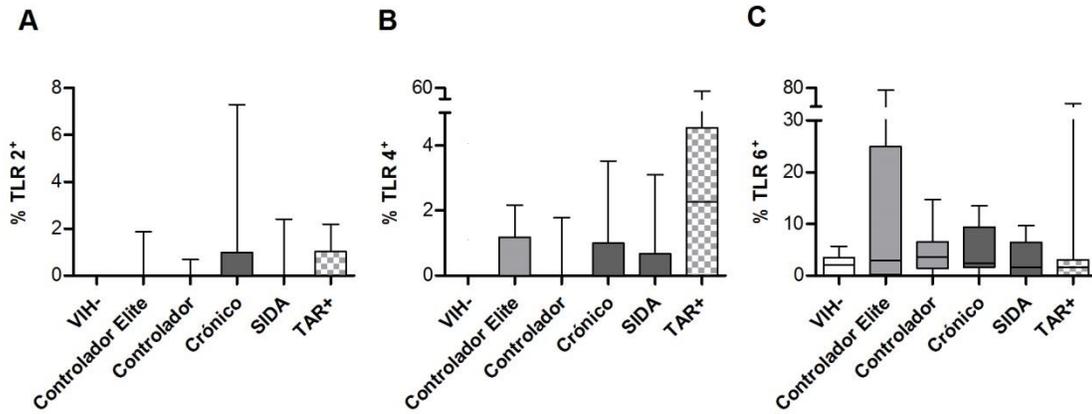


Figura 6.8. Expresión de TLRs en células NK $CD56^{\dim} CD16^+$ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de células NK $CD56^{\dim} CD16^+$ que expresan TLRs extracelulares: 2, 4 y 6 (A-C) e intracelulares: 3 y 9 (D, E). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=21), controladores elite (n=8), controladores (n=12), crónicos (n=20), SIDA (n=15), con TAR (n=13).

Células NK CD56^{bright} CD16⁻

TLR Extracelulares



TLR Intracelulares

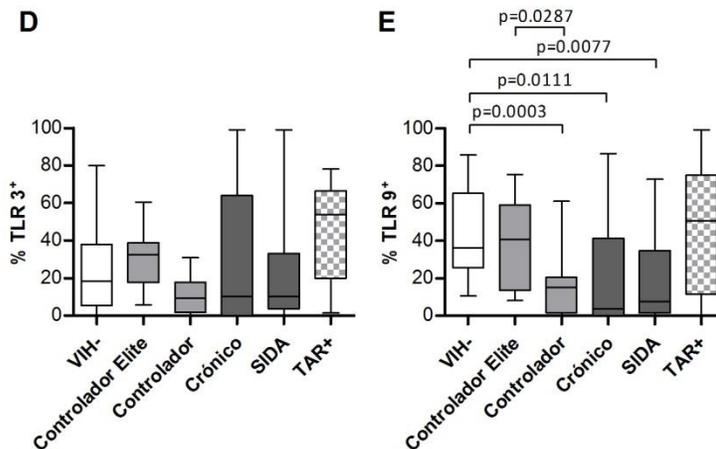


Figura 6.9. Expresión de TLRs en células NK CD56^{bright} CD16⁻ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de células NK CD56^{bright} CD16⁻ que expresan TLRs extracelulares: 2, 4 y 6 (A-C) e intracelulares: 3 y 9 (D, E). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=21), controladores elite (n=8), controladores (n=12), crónicos (n=20), SIDA (n=15), con TAR (n=13).

Solamente variaron los porcentajes de células NK TLR6⁺ en la subpoblación CD56⁻ CD16⁺ (Figura 6.10C). El grupo de controladores tuvo significativamente más células TLR6⁺ que el grupo control (p=0.158) y que los individuos en SIDA (p=0.0068) (medianas de: 30.3%, 14.6% y 14.4%, respectivamente). Adicionalmente, la frecuencia de células NK CD56⁻

CD16⁺ TLR6⁺ correlacionó positivamente con las cuentas de linfocitos T CD4⁺ (r=0.34 p=0.0207) en los individuos con VIH-1 sin TAR. Por otra parte, el grupo con TAR tuvo una mediana de 59.1% de células TLR6⁺, mayor que en el grupo sin VIH-1, controladores élite (mediana de 23.6%) y controladores.

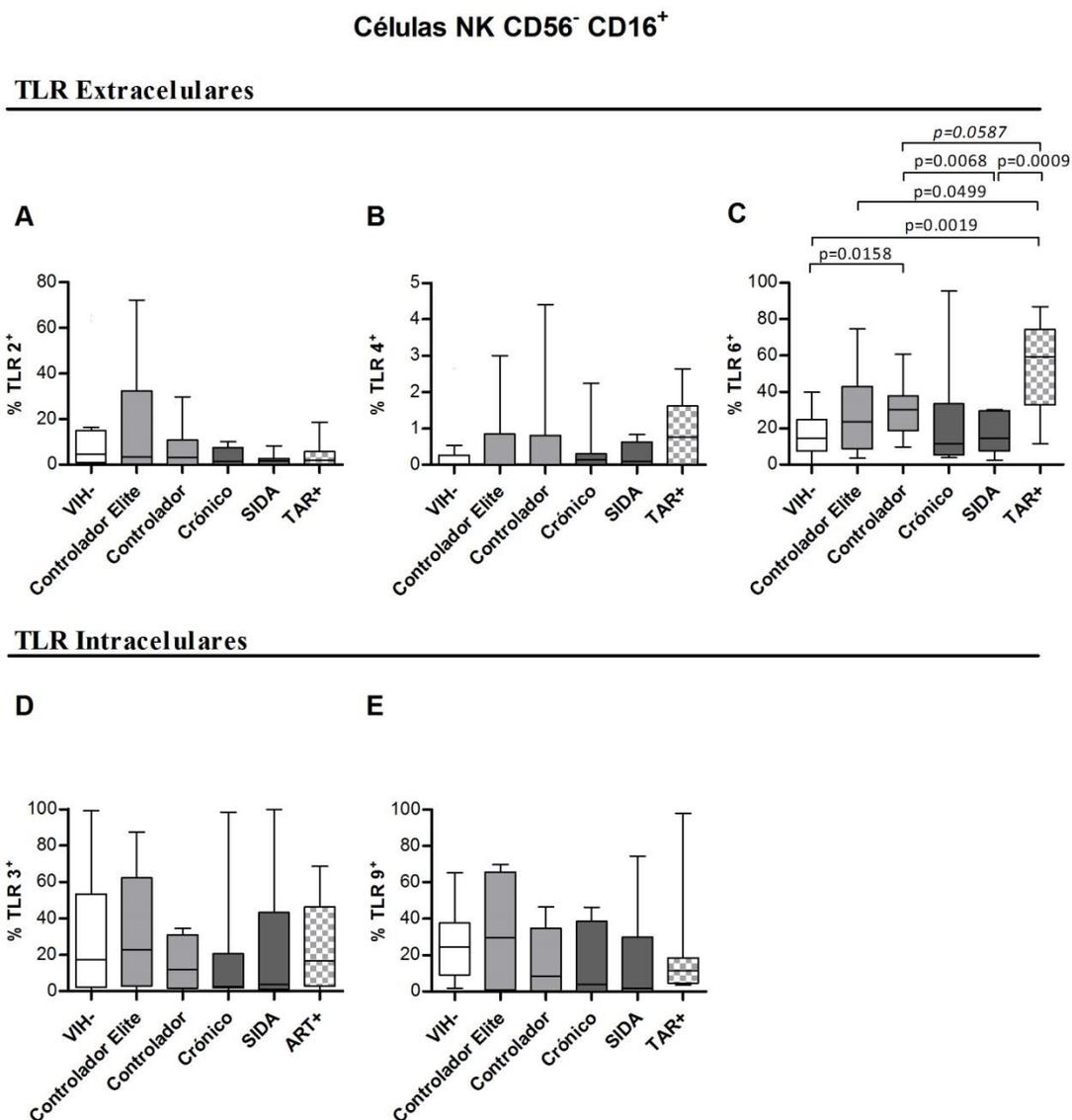


Figura 6.10. Expresión de TLRs en células NK CD56⁻ CD16⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de células NK CD56⁻ CD16⁺ que expresan TLRs extracelulares: 2, 4 y 6 (A-C) e intracelulares: 3 y 9 (D, E). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=21), controladores élite (n=8), controladores (n=12), crónicos (n=20), SIDA (n=15), con TAR (n=13).

La proporción de células NK CD56^{dim} CD16⁺ TLR3⁺ (Figura 6.8D) fue similar entre individuos sin VIH-1, controladores y controladores élite (medianas de 15.8%, 25.8% y 12.1%, respectivamente). En contraste, el porcentaje de células TLR3⁺ fue mayor en el grupo en SIDA (mediana de 9.56%) en comparación con los progresores crónicos (mediana de 6.9%), controladores y personas sin VIH-1 ($p < 0.05$ en todos los casos). En individuos con VIH-1 sin TAR la frecuencia de células NK CD56^{dim} CD16⁺ TLR3⁺ correlacionó negativamente con el número de linfocitos T CD4⁺ ($r = -0.33$ $p = 0.0096$). Aunque el TAR no afectó la proporción de células NK CD56^{dim} CD16⁺ que expresan TLR3, se encontró que a mayor tiempo de tratamiento hay una menor proporción de células TLR3⁺ en esta subpoblación ($r = 0.697$ $p = 0.0082$). En las subpoblaciones CD56^{bright} CD16⁺ y CD56⁻ CD16⁺ no se encontraron diferencias en los porcentajes de células TLR3⁺ (Figuras 6.9D y 6.10D).

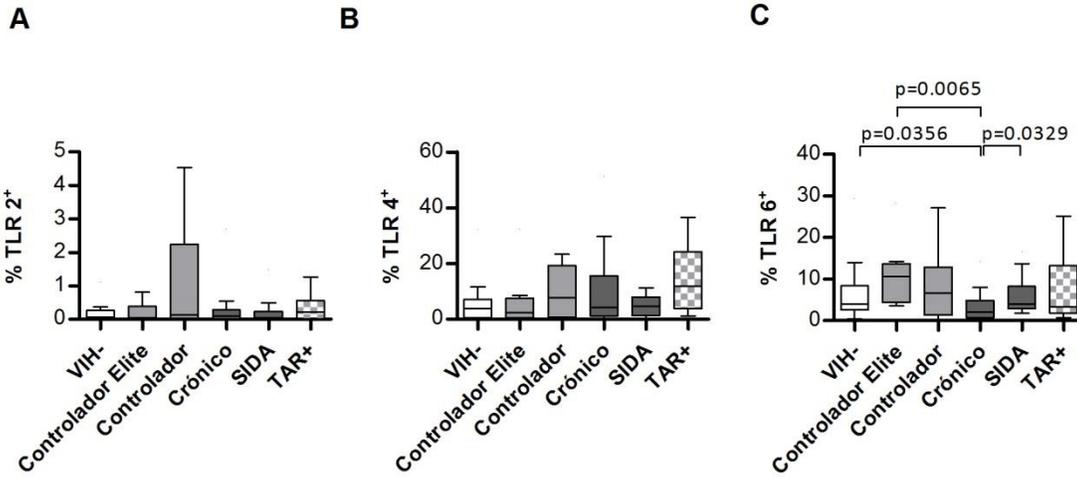
Tanto en células NK CD56^{dim} CD16⁺ como CD56^{bright} CD16⁻ se encontraron diferencias en la frecuencia de células TLR9⁺ (Figuras 6.8E y 6.9E). Las células NK CD56^{dim} CD16⁺ de controladores élite (mediana de 41%) y de individuos en SIDA (mediana de 26.5%) tuvieron mayor cantidad de células TLR9⁺ en comparación con los donadores sin VIH-1 (mediana de 10.5%, $p < 0.05$ en ambos casos). Contrariamente, el grupo de progresores crónicos tuvo un porcentaje menor de células NK CD56^{dim} CD16⁺ TLR9⁺ (mediana de 9.1%) en comparación con controladores élite ($p = 0.0035$), SIDA ($p = 0.0018$) y TAR⁺ (mediana de 16%, $p = 0.0193$). En la subpoblación CD56^{bright} CD16⁻ se observó una disminución en la proporción de células TLR9⁺ en controladores, progresores crónicos e individuos en SIDA con respecto al grupo control (medianas de: 15.2%, 5.86%, 7.7% y 36.9%, respectivamente, $p < 0.02$ en todos los casos). El porcentaje de células CD56^{bright} CD16⁻ TLR9⁺ fue aún más bajo en controladores en comparación con los controladores élite (mediana de 40.8%, $p = 0.0287$). El TAR no afectó el número de células TLR9⁺ en comparación con los otros grupos en la subpoblación CD56^{bright} CD16⁻. No se encontraron asociaciones entre los porcentajes de células NK TLR9⁺ y marcadores de progresión a SIDA en ninguna de las subpoblaciones.

Linfocitos T. Siguiendo la estrategia de análisis que se muestra en la Figura 6.4A, se cuantificaron las frecuencias de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan TLRs (Figuras 6.11 y 6.12). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ TLR⁺ para ninguno de los receptores analizados (Figura 6.12). Sin embargo, la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ TLR6⁺ correlacionó positivamente con el nadir de linfocitos T CD4⁺ ($r= 0.28$ $p=0.0339$) y negativamente con el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ activados ($r= -0.26$ $p=0.0406$) en los individuos con VIH-1 sin TAR. Por otra parte, de manera similar a lo observado en las células NK CD56^{dim} CD16⁺, el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ TLR3⁺ disminuye a mayor tiempo de TAR ($r=0.612$ $p=0.0199$).

En los linfocitos T CD4⁺ solamente se encontraron variaciones entre grupos en TLR6 y TLR9 (Figura 6.11 C y E). A pesar de las diferencias en los porcentajes de células TLR⁺ entre grupos, no se encontraron asociaciones con marcadores clínicos de progresión de la infección por VIH-1 (CV y cuentas de linfocitos T CD4⁺) ni con activación inmunológica en ningún caso. Los progresores crónicos tuvieron un porcentaje menor de linfocitos T CD4⁺ TLR6⁺ que los donadores sin VIH-1, controladores élite y SIDA (medianas de: 2.1% en progresores crónicos, 4% en personas sin VIH-1, 10.6% en controladores élite y 4% en SIDA). No se encontraron diferencias entre ninguno de los otros grupos (Figura 6.11C). A diferencia de TLR6, el grupo con TAR mostró un mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺ TLR9⁺ (mediana de 28.9%) con respecto al grupo control sin VIH-1 (mediana de 2.7%, $p=0.0009$), controladores (mediana de 3.7%, $p=0.032$) y progresores crónicos (mediana de 11.2%, $p=0.028$) (Figura 6.11E), y la frecuencia de células TLR9⁺ no correlacionó con el tiempo de TAR ($p=0.8$). Las frecuencias de linfocitos T CD4⁺ TLR9⁺ fueron similares entre los individuos sin VIH-1, controladores y controladores élite. No se encontraron diferencias significativas entre individuos libres de tratamiento independientemente de la CV.

Células T CD4⁺

TLR Extracelulares



TLR Intracelulares

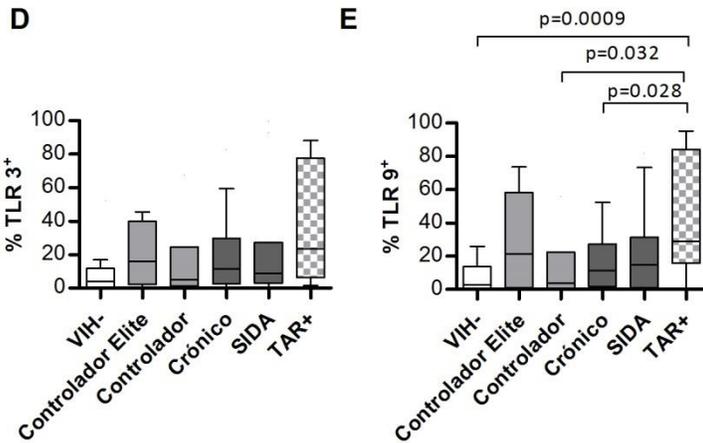
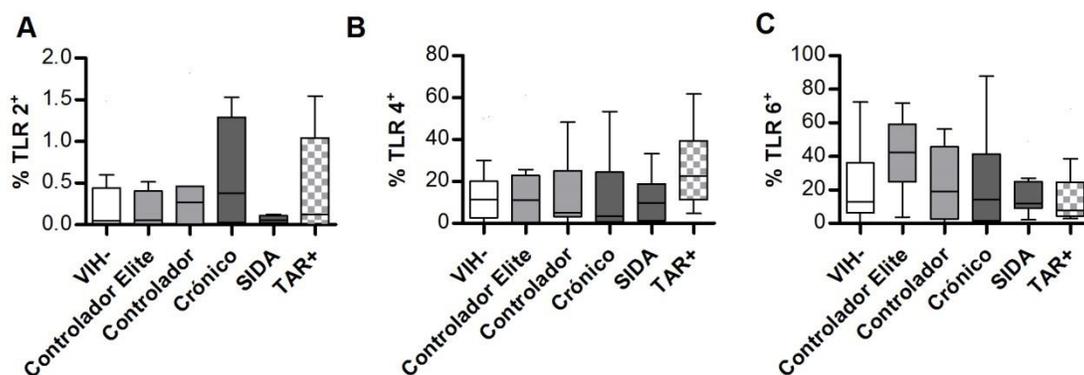


Figura 6.11. Expresión de TLRs en linfocitos T CD4⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que expresan TLRs extracelulares: 2, 4 y 6 (A-C) e intracelulares: 3 y 9 (D, E). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=25), controladores élite (n=8), controladores (n=11), crónicos (n=21), SIDA (n=15), con TAR (n=13).

Células T CD8⁺

TLR Extracelulares



TLR Intracelulares

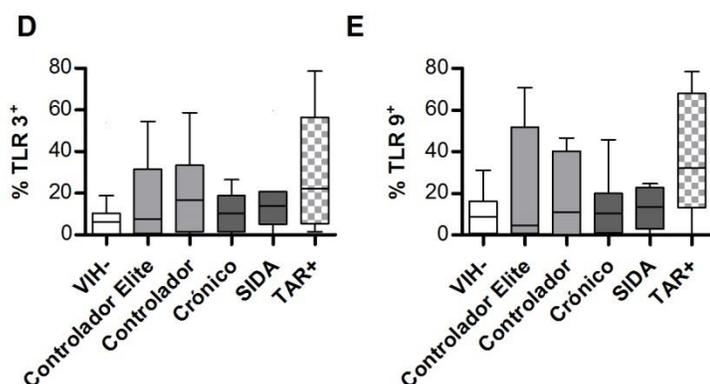


Figura 6.12. Expresión de TLRs en linfocitos T CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de linfocitos T CD8⁺ que expresan TLRs extracelulares: 2, 4 y 6 (A-C) e intracelulares: 3 y 9 (D, E). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=25), controladores elite (n=8), controladores (n=11), crónicos (n=21), SIDA (n=15), con TAR (n=13).

En conjunto, los resultados de citometría de flujo muestran que dependiendo de la subpoblación leucocitaria cada TLR se expresa de manera diferente. Se ha reportado la variabilidad en la expresión de mRNA de TLRs en diferentes poblaciones leucocitarias [83], sin embargo, no se han realizado estudios de citometría de flujo donde se observe la expresión de los receptores en la superficie celular en donadores sanos ni en personas infectadas con VIH-1. En individuos con VIH-1 se ha reportado un incremento en la

expresión de mRNA de TLR2, 3, 4, 6, 7 y 8 en PBMC totales, pero no se analizó específicamente en subpoblaciones celulares [87]. Siendo que las DC son células presentadoras de antígenos, se habría esperado una mayor cantidad de expresión de TLRs con respecto a las células NK y linfocitos T. Los resultados muestran que únicamente en el caso de **TLR2** se observan porcentajes más altos de DC convencionales que expresan el receptor con respecto a los linfocitos T (tanto CD4⁺ como CD8⁺) y a las células NK. TLR2, además, fue el único TLR en el que no se encontraron diferencias entre grupos en ninguna de las poblaciones estudiadas. A pesar de lo anterior, los análisis de correlación en individuos con VIH-1 sin TAR mostraron que tanto en DC convencionales como en células NK CD56⁻ CD16⁺ el porcentaje de células TLR2⁺ disminuye conforme la activación inmunológica en linfocitos T CD8⁺ aumenta.

Contrariamente a lo esperado, los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ que expresan **TLR4** fueron mayores que en DC convencionales y células NK, independientemente del grupo de estudio, posiblemente como una consecuencia del desarrollo de tolerancia a endotoxina [179]. También es interesante recalcar que sí se observaron diferencias entre grupos en los porcentajes de células positivas para TLRs, en particular TLR6 y TLR9, en linfocitos T CD4⁺ mientras que no hubo variaciones en los porcentajes de linfocitos T CD8⁺.

Otro resultado interesante es que los porcentajes de células TLR⁺ para los receptores intracelulares fueron mucho más altos que en los extracelulares, alcanzando medianas de hasta 30% de células TLR⁺ como es el caso de TLR9 los linfocitos T CD8⁺ en individuos con TAR contra medianas del 0% en TLR2 ó TLR4 la células NK CD56^{bright} CD16⁻ en el grupo control sin VIH-1.

Dada la variabilidad observada en la expresión los TLR en cada una de las subpoblaciones analizadas y en los diferentes grupos de estudio no fue posible distinguir patrones de expresión por receptor, subpoblación ni grupo de estudio. Sin embargo, en los controladores se observó una disminución consistente en el porcentaje de células TLR6⁺ en DC convencionales (Figura 6.7C), linfocitos T CD4⁺ (Figura 6.11C), y células NK CD56^{bright} CD16⁻ TLR9⁺ (Figura 6.9E) con respecto a los demás grupos de estudio. Por otra parte, el TAR parece tener un efecto en la expresión de TLRs en varias subpoblaciones. En

el caso de las DC, tanto para el porcentaje de DC convencionales que expresan TLR3 y TLR4 como en las DC plasmacitoides que expresan TLR9, se observó que el TAR disminuyó el porcentaje de células TLR⁺ con respecto a individuos con infección avanzada (Figura 6.7B, D y E). En las DC plasmacitoides, el TAR disminuyó el porcentaje de células TLR9⁺ aún por debajo de lo observado en el grupo control (Figura 6.7E). En linfocitos T, el grupo TAR⁺ mostró un incremento de células TLR9⁺ con respecto a los otros grupos, aunque sólo se alcanzó significancia estadística en los CD4⁺ (Figuras 6.11E y 6.12E). Además, el TAR incrementó los porcentajes de células TLR6⁺ en linfocitos T CD4⁺, que se ven disminuidos en individuos con infección avanzada, alcanzando valores similares a los del grupo control (Figura 6.11C). Finalmente, en células NK, el TAR incrementó los porcentajes de células CD56⁻ CD16⁺ TLR6⁺ aún por encima de los valores observados en individuos sin VIH-1. En la subpoblación CD56^{bright} CD16⁻, también se encontró que el TAR recuperó el porcentaje de células TLR9⁺ que se observaban disminuidas en progresores crónicos e individuos en SIDA, alcanzando niveles similares a los del grupo control (Figura 6.9E).

Los resultados sugieren que el TAR tiene un efecto importante en la variación de la expresión de los TLRs en las diferentes subpoblaciones celulares. Aunque, como ya se ha mencionado, cada TLR se expresó en cada subpoblación de manera particular, se encontraron casos interesantes como el efecto en el porcentaje de células TLR6⁺ en linfocitos T CD8⁺ y células NK CD56^{dim} CD16⁺. Es interesante que, al margen de no encontrar diferencias en los porcentajes de células TLR6⁺ y los otros grupos de estudios en ambas subpoblaciones celulares, éste se asociara negativamente con el tiempo de TAR (Figura 6.13). Este resultado es especialmente interesante dadas las similitudes entre ambas poblaciones celulares: tanto los linfocitos T CD8⁺ como las células NK CD56^{dim} CD16⁺ tienen una función primordialmente citotóxica, y sus frecuencias y porcentajes de células activadas se ven incrementadas con el avance de la infección.

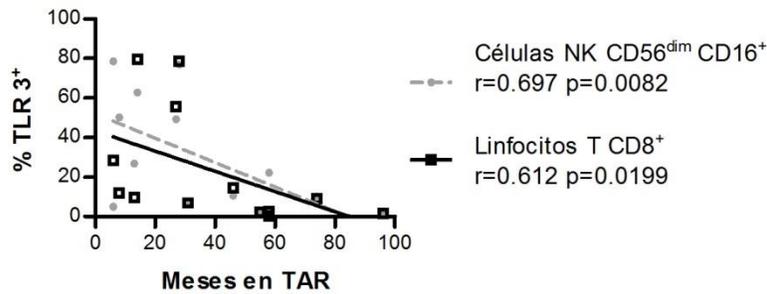


Figura 6.13. Asociación de células TLR3⁺ y meses de TAR en células citotóxicas. Correlación de Spearman del porcentaje de linfocitos T CD8⁺ (círculos grises) o células NK CD56^{dim} CD16⁺ (rectángulos negros) que expresan TLR3 contra tiempo de tratamiento.

6.4 Caracterización del Estado Inflamatorio

Como primer análisis para caracterizar el estado inflamatorio en el que se encontraban los individuos en cada uno de los grupos de estudio, se cuantificó el porcentaje de DC, células NK y linfocitos T que expresan marcadores de activación por citometría de flujo. Posteriormente, se midieron los biomarcadores de inflamación PCR en suero y fibrinógeno en plasma de los participantes del estudio, y citocinas pro- y anti-inflamatorias a partir de plasma congelado. Como marcador de activación de monocitos/macrófagos y marcador indirecto de translocación bacteriana, se cuantificó sCD14 en plasma.

6.4.1 Expresión de marcadores de activación en subpoblaciones leucocitarias: Inmunofenotipificación

Linfocitos T. Una de las características particulares de la infección por VIH-1 es el incremento en la activación inmunológica observada en linfocitos T (expresión de CD38 y co-expresión de CD38 y HLA-DR) [19, 41, 61]. Por ello, se cuantificó la expresión de marcadores de activación en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ totales (Figura 6.14) y en subpoblaciones de éstos (Figura 6.15). Como se esperaba, los porcentajes de linfocitos T CD4⁺ activados fue similar en los dos grupos de controladores y donadores sin VIH-1 tanto en células totales como en subpoblaciones (Figuras 6.14A y 6.15A). En general, se encontró un incremento en la proporción de linfocitos T CD4⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ en los individuos crónicos y en SIDA en comparación con los el grupo control. El grupo con TAR

tuvo porcentajes menores de células activadas que los individuos en infección avanzada, alcanzando significancia estadística solamente en las células terminalmente diferenciadas $CD45RA^+ CCR7^+$ y de memoria efectora $CD45RA^- CCR7^-$, pero significativamente mayores a los observados en individuos sin VIH-1, controladores élite y controladores. Este mismo fenómeno se observó en linfocitos T $CD4^+$ totales. De acuerdo a lo esperado, la proporción de linfocitos T $CD4^+$ activados correlacionó de manera positiva con la CV y negativa con la cuenta de linfocitos T $CD4^+$ en los individuos con VIH-1 sin TAR ($r=0.65$ $p<0.0001$ y $r= -0.42$ $p<0.0001$, respectivamente). Además, a mayor tiempo de TAR, se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T $CD4^+ CD38^+ HLA-DR^+$ ($r= -0.44$ $p=0.0008$).

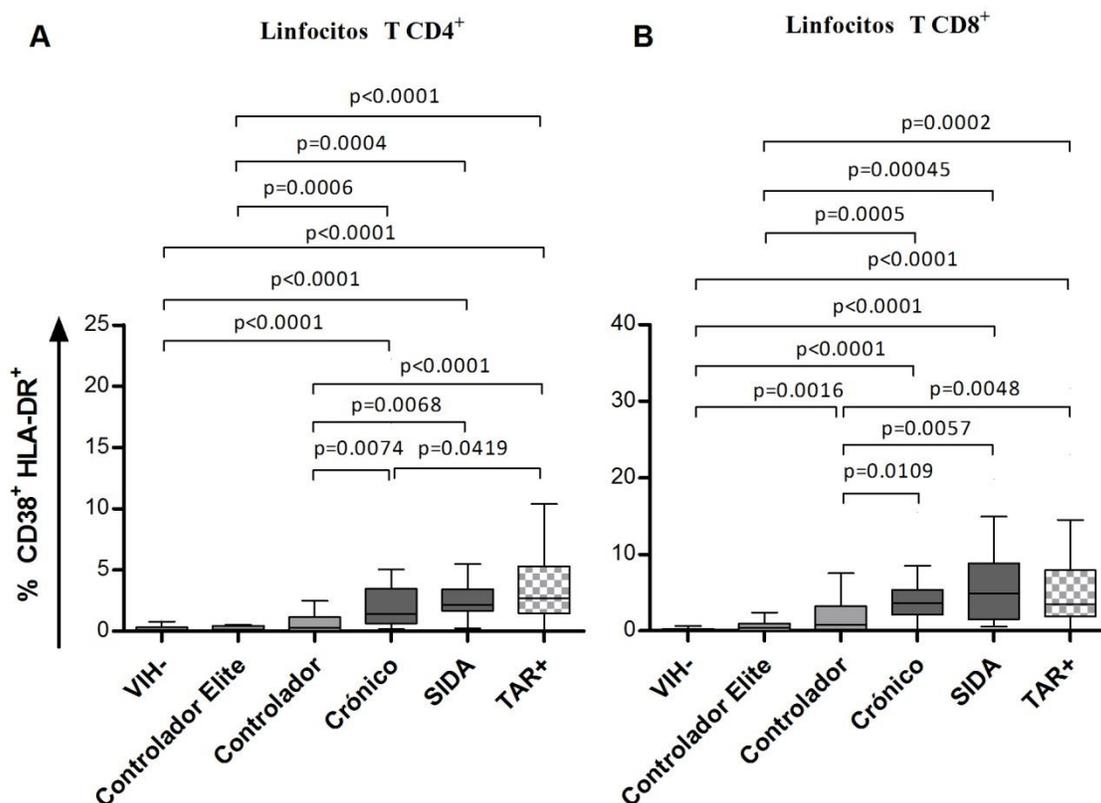


Figura 6.14. Expresión de marcadores de activación en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de linfocitos T $CD4^+$ (A) y $CD8^+$ (B) que co-expresan HLA-DR Y CD38. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=25), controladores élite (n=7), controladores (n=12), crónicos (n=18), SIDA (n=15), con TAR (n=15).

En los linfocitos T $CD8^+$ se observó el incremento en la frecuencia de células $CD38^+$ HLA-DR⁺ en todos los individuos con viremia detectable en comparación con el grupo control ($p < 0.01$ en todos los casos, Figura 6.14B), no así en los controladores élite. En el caso de células naïve $CD45RA^+$ CCR7⁺ y terminalmente diferenciadas $CD45RA^+$ CCR7⁻, también hubo una mayor proporción de linfocitos T $CD8^+$ activados en los controladores élite con respecto a los donadores sin VIH-1 (Figura 6.15B). En particular, resulta interesante el incremento en la proporción de células naïve $CD45RA^+$ CCR7⁺ $CD38^+$ HLA-DR⁺ en todos los individuos con VIH-1. Siendo que la subpoblación de linfocitos T naïve no han sido previamente expuestos a su antígeno específico, no se esperaría la expresión de marcadores de activación. Este fenómeno forma parte de la activación inmunológica característica en la infección por VIH-1 [180]. Tanto en linfocitos T $CD8^+$ como en subpoblaciones se observó una mayor frecuencia de células $CD38^+$ HLA-DR⁺ en los individuos con infección avanzada en comparación con controladores élite y controladores. Como se esperaba, el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ $CD38^+$ HLA-DR⁺ correlacionó con los marcadores clínicos de progresión a SIDA ($r = -0.4156$ $p = 0.0005$ para cuenta de linfocitos T $CD4^+$ y $r = 0.5254$ $p < 0.0001$ para CV, Figura 6.23A) en individuos con VIH-1 sin TAR. Aunque el TAR redujo los porcentajes de células activadas con respecto a los grupos de individuos crónicos y en SIDA, las células $CD38^+$ HLA-DR⁺ fueron significativamente mayores que en el grupo control tanto en linfocitos T $CD8^+$ totales como en subpoblaciones naïve $CD45RA^+$ CCR7⁻, memoria efectora $CD45RA^-$ CCR7⁻ y terminalmente diferenciadas $CD45RA^+$ CCR7⁻ ($p \leq 0.0001$ en todos los casos). Adicionalmente, se observó que a mayor tiempo de TAR disminuyó la proporción de linfocitos T $CD8^+$ activados ($r = -0.62$ $p = 0.0199$).

De acuerdo a lo esperado, los resultados muestran que la frecuencia de linfocitos T activados son similares entre individuos que controlan la viremia (controladores élite y controladores) y personas sin VIH-1. Los progresores crónicos y personas en SIDA tienen mayores cantidades de linfocitos T que expresan marcadores de activación y, en general, el TAR redujo parcialmente la proporción de estas células activadas.

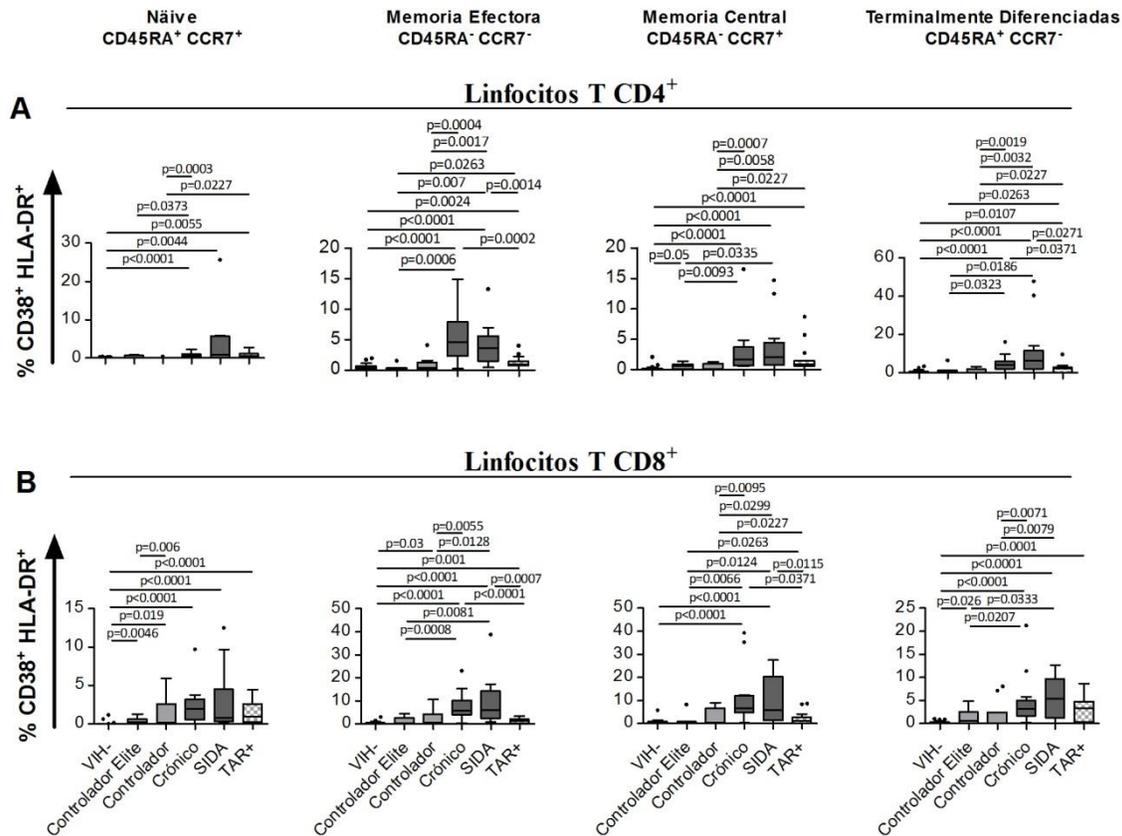


Figura 6.15. Expresión de marcadores de activación en subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (A) y CD8⁺ (B) que coexpresan HLA-DR Y CD38 por subpoblación. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. Los puntos representan datos fuera del percentil 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=26), controladores elite (n=8), controladores (n=12), crónicos (n=19), SIDA (n=14), con TAR (n=15).

Células Dendríticas. Como marcadores de activación de las DC se utilizaron las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en DC convencionales y plasmacitoides [181]. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de DC convencionales que expresan **CD80** (Figura 6.16A). Contrariamente, se observó que los progresores crónicos y en SIDA tienen mayor proporción de DC convencionales **CD86⁺** que los donadores sin VIH-1 ($p < 0.0001$ y $p = 0.0167$, respectivamente, Figura 6.16B y Figura 6.17A). A pesar del incremento en la frecuencia de DC convencionales activadas en individuos con infección

avanzada con respecto a donadores sin VIH-1, no se encontraron asociaciones entre la proporción de DC convencionales CD86⁺ con marcadores clínicos de progresión a SIDA (Tabla 6.2). El TAR disminuyó el porcentaje de células que expresan CD86 con respecto a progresores crónicos ($p < 0.0001$) y en SIDA ($p = 0.0072$), alcanzando valores similares a los observados en el grupo control (medianas de: 1.11% en personas sin VIH-1 y 0.1% con TAR). De manera interesante, en los controladores élite también se observó un incremento en el porcentaje de DC convencionales CD86⁺ con respecto al grupo control y al grupo con TAR ($p = 0.0152$ en ambos casos), manteniendo valores similares a los observados en los individuos con infección avanzada (medianas de: 5.6% en controladores élite, 6.7% en progresores crónicos y 4.2% en SIDA). Aunque el TAR disminuyó el porcentaje de DC convencionales CD86⁺, no se encontró una asociación entre la proporción de estas células y el tiempo de tratamiento ($p = 0.65$).

A diferencia de lo observado en las DC convencionales, los individuos en SIDA tuvieron un porcentaje mayor de DC plasmacitoides CD80⁺ (mediana de 2.7%) que los donadores sin VIH-1 (mediana de 0.1%), controladores élite (mediana de 0.1%), controladores (mediana de 0.1%) e individuos con TAR (mediana de 0.4%) ($p < 0.05$ en todos los casos, Figura 6.16C y Figura 6.17B). El incremento en la frecuencia de DC plasmacitoides CD80⁺ se observó también en los progresores crónicos (mediana de 1%) comparados con el grupo control ($p = 0.036$). Los individuos que mantienen CV bajas o indetectables de manera natural (controladores y controladores élite) mantuvieron porcentajes de DC plasmacitoides CD80⁺ similares a los de los donadores sin VIH-1, con medianas de expresión cercanas o iguales a cero. Además, la frecuencia de DC plasmacitoides que expresan CD80 correlacionó con marcadores clínicos de progresión a SIDA y con activación de linfocitos T CD8⁺ y células NK (Tabla 6.2, Figura 6.23B) en individuos con VIH-1 sin TAR. Aunque el TAR disminuyó el porcentaje de DC plasmacitoides CD80⁺, no se encontró una asociación entre la proporción de estas células y el tiempo de tratamiento ($p = 0.57$).

Como se muestra en las Figuras 6.16D y 6.17C, los progresores crónicos y en SIDA también tuvieron un porcentaje mayor de DC plasmacitoides que expresan CD86 con respecto al grupo control ($p \leq 0.01$ en ambos casos, medianas de: crónicos 1%, SIDA 1.9%, sin VIH-1 0.5%). El TAR también disminuyó la frecuencia de DC plasmacitoides CD86⁺

(mediana de 0%) en comparación con los individuos en SIDA ($p=0.0307$). A diferencia de las DC convencionales, los porcentajes de DC plasmacitoides $CD86^+$ fueron similares entre donadores sin VIH-1, controladores y controladores élite (medianas de: 0.6% en controladores élite y 1% en controladores). En el caso de $CD86$, la frecuencia de DC plasmacitoides activadas en individuos con VIH-1 sin TAR no tuvo ninguna asociación con marcadores clínicos de progresión a SIDA ni con activación de linfocitos T $CD8^+$ (Tabla 6.2).

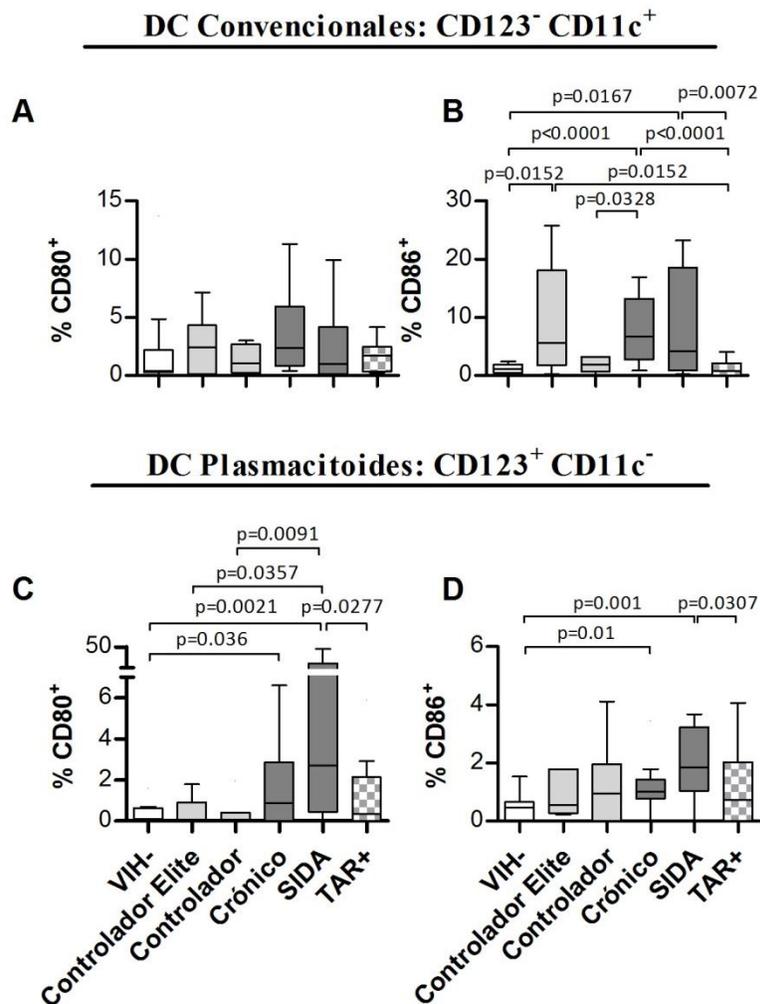


Figura 6.16. Expresión de marcadores de activación en DC convencionales y plasmacitoides en individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de DC que expresan $CD80$ (A y C) y $CD86$ (B y D). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 ($n=19$), controladores élite ($n=7$), controladores ($n=12$), crónicos ($n=18$), SIDA ($n=15$), con TAR ($n=15$).

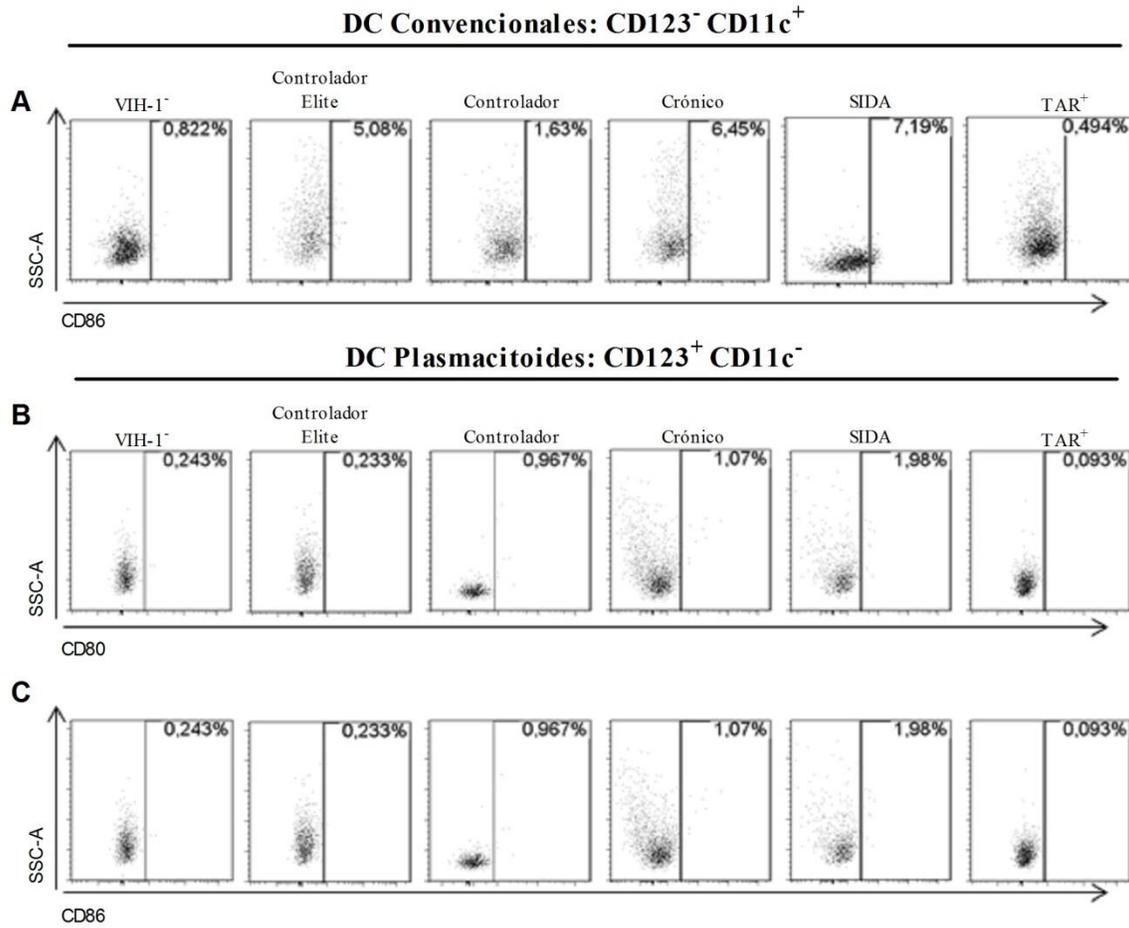


Figura 6.17. Expresión de marcadores de activación en DC de individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Ejemplos representativos de la expresión de CD86 en DC convencionales (A), y CD80 (B) y CD86 en DC plasmacitoides (C). El número dentro del plot indica el porcentaje de células positivas para el marcador de activación correspondiente.

En general, los resultados muestran que la proporción de DC activadas incrementa en personas con VIH-1 con infección avanzada, en particular en las DC plasmacitoides. Además, el TAR reduce la frecuencia de DC activadas alcanzando niveles similares a los observados en el grupo control independientemente del tiempo de tratamiento.

Tabla 6.2. Correlaciones entre la activación en DC y marcadores de progresión a SIDA en individuos con VIH-1 sin TAR.

		CV (copias/ml)	T CD4 ⁺ (cels/μl)	% T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA- DR ⁺	% NK CD38 ⁺ CD56 ^{dim} CD16 ⁺	sCD14 [§]
DC convencionales						
% CD80 ⁺	<i>r</i>	0.04921	-0.03445	0.1251	0.1887	0.0331
	<i>p</i>	0.7187	0.801	0.3629	0.1636	0.814
		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>Ns</i>	<i>Ns</i>
% CD86 ⁺	<i>r</i>	0.1071	0.1043	0.01696	0.1197	0.02842
	<i>p</i>	0.4319	0.4441	0.9022	0.3797	0.8399
		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
DC plasmacitoides						
% CD80 ⁺	<i>r</i>	0.4039	-0.3639	0.3507	0.446	0.3274
	<i>p</i>	0.002	0.0058	0.0087	0.0006	0.0167
		**	**	**	***	*
% CD86 ⁺	<i>r</i>	0.1982	-0.1207	0.1215	0.324	0.2115
	<i>p</i>	0.1432	0.3755	0.377	0.0149	0.1284
		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>

Resultados de correlaciones de *ns*, no significativo. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

§Los resultados detallados de activación en linfocitos T CD8⁺ y células NK y la cuantificación de sCD14 se muestran en las Figuras 6.13, 6.17 y 6.19, respectivamente.

Células NK. Como marcadores de activación para células NK se utilizaron las moléculas CD69, CD38 y HLA-DR. CD69 indica la activación temprana en linfocitos y se ha utilizado frecuentemente en estudios de estimulación de células NK *in vitro* [160, 182-184]. CD38 es una glicoproteína con acción de ectoenzima que regula los niveles de calcio intracelular y actúa como una molécula de adhesión que se expresa en células NK activadas [185, 186]. HLA-DR se ha utilizado como marcador de activación en células NK (y otras células que no son presentadoras profesionales de antígenos), lo que sugiere la posibilidad de que estas células puedan presentar antígenos [184, 187].

Las frecuencias de células **CD38⁺** fueron similares entre donadores sin VIH-1, controladores y controladores élite en las tres subpoblaciones (medianas de: 73% de CD56^{dim} CD16⁺, 49% de CD56^{bright} CD16⁻ y 57% de CD56⁻ CD16⁺ en controladores élite; medianas de 59% de CD56^{dim} CD16⁺, 44% de CD56^{bright} CD16⁻ y 44% de CD56⁻ CD16⁺ en controladores; medianas de 72% de CD56^{dim} CD16⁺, 55% de CD56^{bright} CD16⁻ y 59% de CD56⁻ CD16⁺ en personas sin VIH-1; Figura 6.18A y 6.19). Las proporciones de células NK CD56^{dim} CD16⁺ y CD56^{bright} CD16⁻ CD38⁺ fueron significativamente mayores en

progresores crónicos e individuos en SIDA en comparación con los controladores élite, controladores y grupo control (medianas de: progresores crónicos 94% de CD56^{dim} CD16⁺ y 84% de CD56^{bright} CD16⁻, SIDA 99% de CD56^{dim} CD16⁺ y 95% de CD56^{bright} CD16⁻, $p < 0.01$ en todos los casos). Además, los individuos en SIDA tuvieron una mayor frecuencia de células CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ que los progresores crónicos ($p = 0.0246$). En la subpoblación de células NK CD56⁻ CD16⁺ también se observó un mayor porcentaje de células CD38⁺ en individuos en SIDA en comparación con los controladores élite, controladores y donadores sin VIH-1 ($p < 0.01$ en todos los casos). El TAR redujo la proporción de células NK CD38⁺ en las subpoblaciones CD56^{dim} CD16⁺ y CD56⁻ CD16⁺, pero no en las CD56^{bright} CD16⁻ en comparación con lo observado en el grupo en SIDA (medianas en TAR⁺: 91% de CD56^{dim} CD16⁺, 81% de CD56^{bright} CD16⁻ y 69% de CD56⁻ CD16⁺), aunque no se alcanzaron niveles similares a los observados en las personas sin VIH-1, controladores y controladores élite.

Los porcentajes de células NK **HLA-DR⁺** y **CD38⁺ HLA-DR⁺** también fueron similares entre controladores élite, controladores e individuos sin VIH-1 en las tres subpoblaciones (Figura 6.18B y C). Además, las frecuencias de células NK CD56^{dim} CD16⁺ HLA-DR⁺ y CD38⁺ HLA-DR⁺ en progresores crónicos e individuos en SIDA fueron mayores que en el grupo control ($p < 0.01$ en todos los casos). El porcentaje de células NK CD56^{dim} CD16⁺ HLA-DR⁺ y CD38⁺ HLA-DR⁺ en el grupo de SIDA también fue mayor que en los dos grupos de controladores ($p < 0.04$ en todos los casos), y que los progresores crónicos en el caso de HLA-DR ($p = 0.0082$). El TAR redujo de manera significativa la cantidad de células NK CD56^{dim} CD16⁺ HLA-DR⁺ y CD38⁺ HLA-DR⁺ en comparación con los individuos en SIDA, pero no se alcanzaron los niveles basales observados en el grupo control. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de células NK HLA-DR⁺ y CD38⁺ HLA-DR⁺ en la subpoblación CD56^{bright} CD16⁻. Contrariamente, la frecuencia de células NK CD56⁻ CD16⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ se observó incrementada en progresores crónicos en comparación con donadores sin VIH-1, controladores élite y controladores. A diferencia de los resultados en células CD56^{dim} CD16⁺, en el grupo con TAR se mantuvo elevada la proporción de células CD56⁻ CD16⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ en comparación con los donadores sin VIH-1 y los controladores ($p = 0.0062$ y $p = 0.0172$, respectivamente).

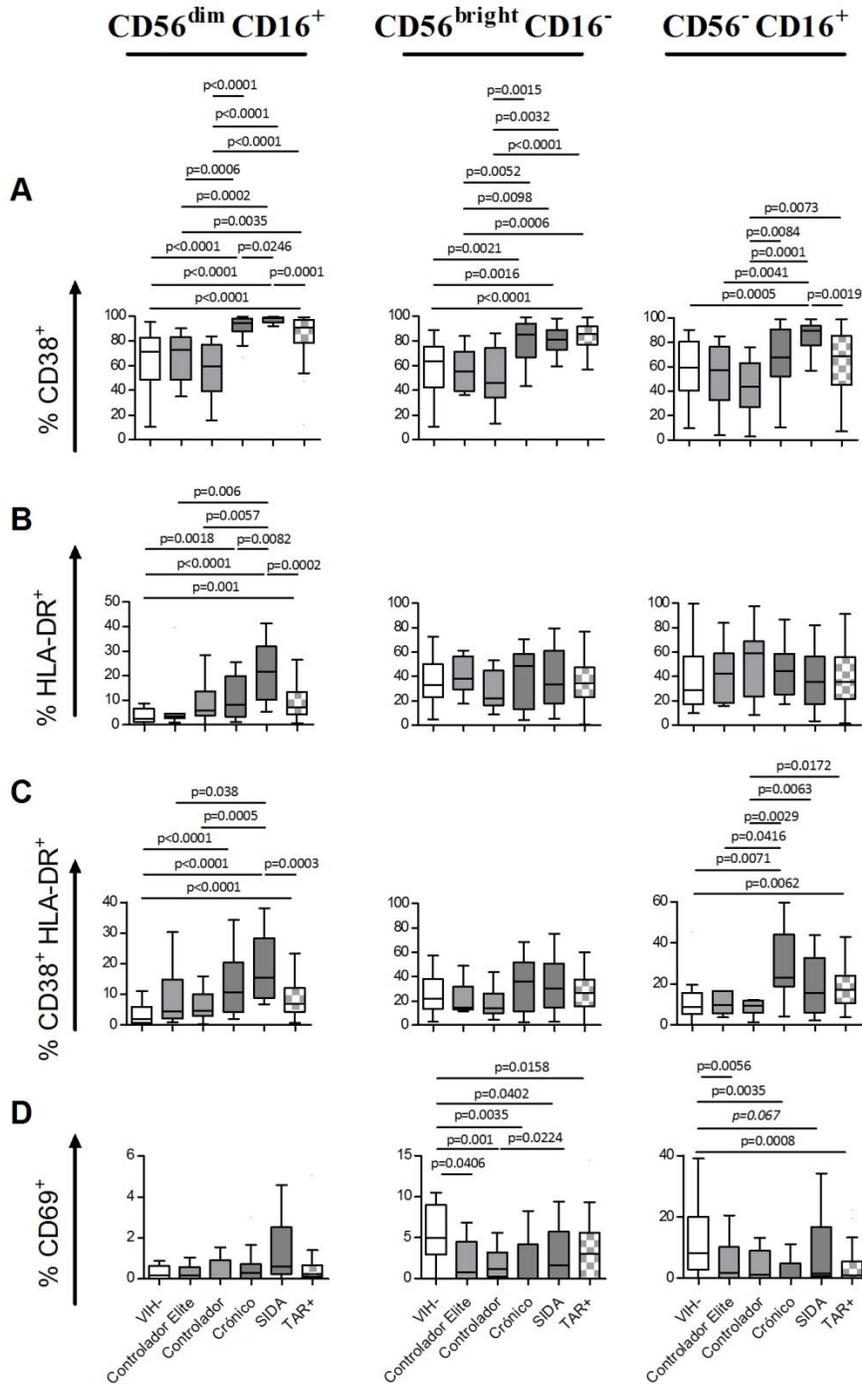


Figura 6.18. Expresión de marcadores de activación en células NK de individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Porcentaje de células NK CD38⁺ (A), CD38⁺ HLA-DR⁺ (B), HLA-DR⁺ (C) y CD69⁺ (D). Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo. Total de individuos analizados por grupo: sin VIH-1 (n=21), controladores élite (n=8), controladores (n=13), crónicos (n=26), SIDA (n=15), con TAR (n=58).

Finalmente, los porcentajes de células NK $CD56^{dim} CD16^+ CD69^+$ no cambiaron entre los grupos estudiados (Figura 6.18D). De manera interesante y contraria a los otros marcadores, en la subpoblación $CD56^{bright} CD16^-$ se encontró una disminución en la frecuencia de células NK $CD69^+$ en todos los individuos con VIH-1 con respecto al grupo control, independientemente de su CV y del TAR ($p < 0.05$ en todos los casos). De manera similar, los porcentajes de células NK $CD56^- CD16^+ CD69^+$ también se encontraron reducidos en los controladores elite, controladores, progresores crónicos y TAR⁺ ($p < 0.01$ en todos los casos), pero no en el grupo de individuos en SIDA, con respecto al grupo control.

Dado que las frecuencias de células NK $CD38^+$ fueron significativamente mayores en individuos en SIDA en las tres subpoblaciones, se compararon las proporciones de células NK $CD38^+$ en las subpoblaciones $CD56^{dim} CD16^+$, $CD56^{bright} CD16^-$ y $CD56^- CD16^+$ (Figura 6.19). Para ello, se consideraron a todos los individuos con VIH-1 libres de TAR independientemente de su viremia. Se encontró que la subpoblación de células NK $CD56^{dim} CD16^+$ tiene mayor proporción de células $CD38^+$ en comparación con las $CD56^{bright} CD16^-$ y $CD56^- CD16^+$ ($p < 0.0001$ en ambos casos). Además, las células NK $CD38^+ CD56^{bright} CD16^-$ también fueron más abundantes que las $CD38^+ CD56^- CD16^+$ ($p = 0.0024$). En la Figura 6.19B se muestran ejemplos representativos de las frecuencias de células $CD38^+$ para las tres subpoblaciones en los diferentes grupos de estudio.

Como se muestra en la Tabla 6.3, la frecuencia de células NK $CD38^+$ correlacionó con todos los marcadores clínicos de progresión a SIDA en individuos con VIH-1 sin TAR: CV, cuentas de linfocitos T $CD4^+$, nadir de linfocitos T $CD4^+$ y activación de linfocitos T $CD8^+$ ($p < 0.01$ en todos los casos, la Figura 6.23C muestra las correlaciones con la subpoblación $CD56^{dim} CD16^+$). En el caso de las subpoblaciones $CD56^{dim} CD16^+$ y $CD56^{bright} CD16^-$ también se observó que a mayor sCD14, marcador indirecto de translocación bacteriana, hay una mayor proporción de células que expresan $CD38$. Además, para la población $CD56^{dim} CD16^+$ se encontró que la frecuencia de células activadas correlaciona con marcadores clínicos de progresión de la infección, independientemente del marcador de activación. Estas asociaciones se mantienen aún con

la proporción de células CD69⁺, a pesar de no haber encontrado diferencias significativas entre los grupos. Finalmente, en los análisis de correlación en el grupo con TAR se observó que a mayor tiempo de tratamiento disminuyó la frecuencia de células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ y CD69⁺ ($r = -0.493$ $p < 0.0001$ y $r = -0.0321$ $p = 0.0169$). Esta asociación no se observó en la expresión de HLA-DR ni en su co-expresión con CD38.

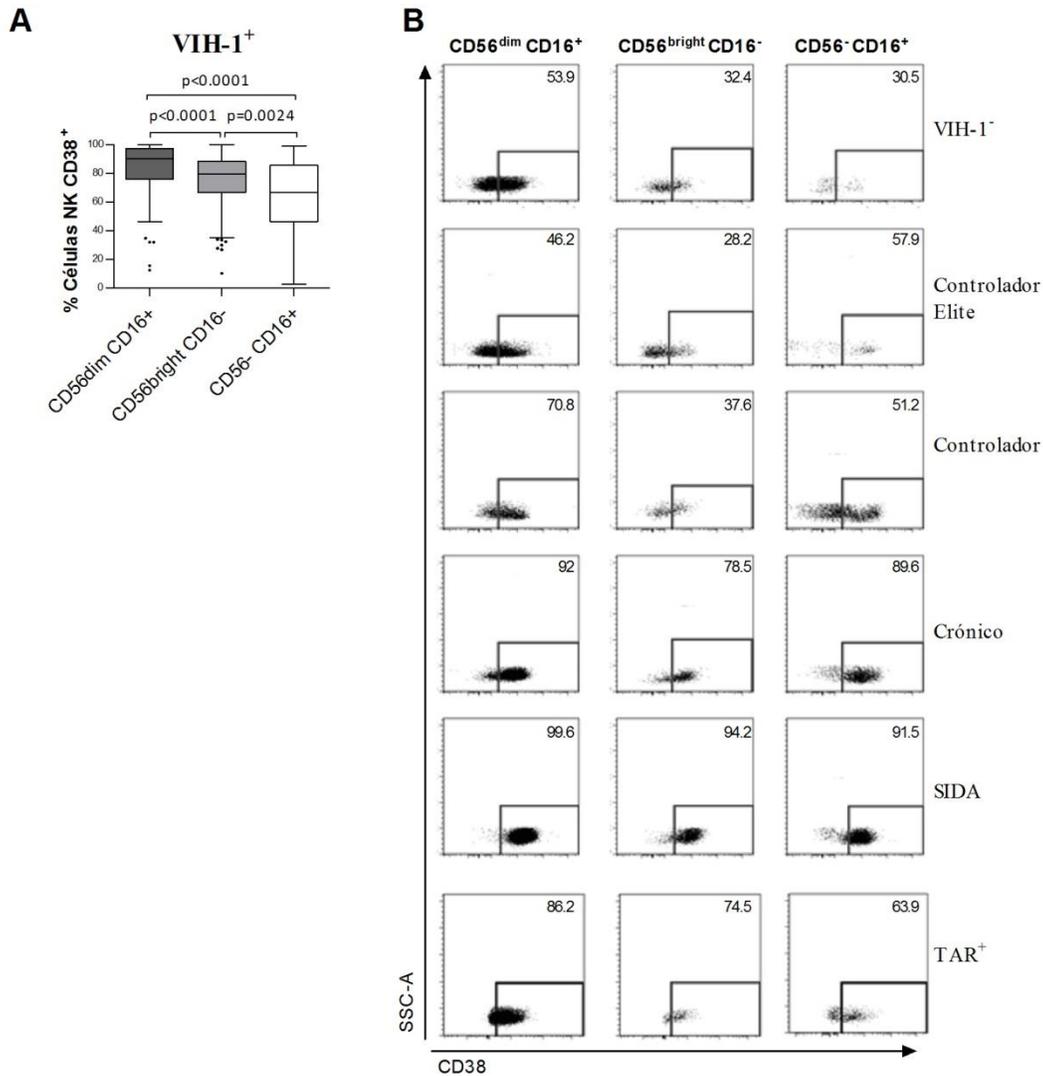


Figura 6.19. Expresión de CD38 en subpoblaciones de células NK de individuos con VIH-1 y donadores sin VIH-1. **A)** Porcentaje de células NK CD38⁺. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. Los puntos representan datos fuera del percentil 10-90. La línea indica la mediana del grupo. **(B)** Ejemplos representativos de la expresión de CD38 en diferentes subpoblaciones de células NK. El número dentro del plot indica el porcentaje de células CD38⁺.

Tabla 6.3. Correlaciones entre la activación en subpoblaciones de células NK y marcadores de progresión a SIDA.

		CV (copias/ml)	T CD4 ⁺ (cels/μl)	% T CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA- DR ⁺	Nadir T CD4 ⁺	sCD14 [§]
CD56^{dim} CD16⁺						
% CD38 ⁺	<i>r</i>	0.731	-0.7292	0.5608	-0.6769	0.3468
	<i>p</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0082
		***	***	***	***	**
% CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	<i>r</i>	0.4358	-0.4475	0.2537	-0.4633	0.0716
	<i>p</i>	0.0004	0.0002	0.0505	0.0001	0.61
		***	***	<i>ns</i>	***	<i>Ns</i>
% HLA-DR ⁺	<i>r</i>	0.4117	-0.4638	0.2062	-0.516	0.2799
	<i>p</i>	0.0008	0.0001	0.1139	<0.0001	0.0423
		***	***	<i>ns</i>	***	*
% CD69 ⁺	<i>r</i>	0.3552	-0.3527	0.03229	-0.3774	0.3501
	<i>p</i>	0.0032	0.0034	0.8	0.0018	0.0076
		**	**	<i>ns</i>	**	**
CD56^{bright} CD16⁻						
% CD38 ⁺	<i>r</i>	0.5608	-0.4588	0.5281	-0.4397	0.4489
	<i>p</i>	<0.0001	0.0006	<0.0001	0.0012	0.0025
		***	***	***	**	**
% CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	<i>r</i>	0.2976	-0.2408	0.1611	-0.2943	0.2202
	<i>p</i>	0.04	0.0992	0.2905	0.0423	0.278
		*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>
% HLA-DR ⁺	<i>r</i>	0.01358	-0.0862	-0.111	-0.1452	-0.03614
	<i>p</i>	0.927	0.5602	0.468	0.3247	0.8271
		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
% CD69 ⁺	<i>r</i>	0.08102	0.04368	0.0303	-0.01049	0.2045
	<i>p</i>	0.568	0.7585	0.8363	0.9417	0.1884
		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
CD56⁻ CD16⁺						
% CD38 ⁺	<i>r</i>	0.4944	-0.4542	0.3847	-0.4134	0.1091
	<i>p</i>	<0.0001	0.0001	0.0017	0.0006	0.4193
		***	***	**	***	<i>ns</i>
% CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	<i>r</i>	0.3346	-0.2748	0.2201	-0.272	0.1248
	<i>p</i>	0.0164	0.051	0.1329	0.535	0.431
		*	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
% HLA-DR ⁺	<i>r</i>	-0.2171	0.1553	-0.141	0.09073	-0.09814
	<i>p</i>	0.1259	0.2765	0.3392	0.5266	0.5364
		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
% CD69 ⁺	<i>r</i>	-0.03289	-0.1708	-0.0863	-0.09591	-0.06247
	<i>p</i>	0.817	0.2261	0.5512	0.5032	0.6871
		<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>

Resultados de correlaciones de Spearman. *ns*, no significativo. **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

§Los resultados detallados de activación en linfocitos T CD8⁺ y la cuantificación de sCD14 se muestran en las Figuras 6.13 y 6.19, respectivamente.

En conjunto, los resultados muestran que la expresión de marcadores de activación asociados a la progresión de la infección por VIH-1 (CD38 y HLA-DR) se encuentran en niveles similares en individuos que mantienen naturalmente CV baja o indetectable (controladores y controladores élite) y los donadores sin VIH-1. La frecuencia de células activadas en estos grupos fue significativamente menor a la de progresores crónicos y en SIDA, y el TAR redujo parcialmente la proporción de células activadas. Además, se encontró que la subpoblación de células NK que presentó mayor expresión de marcadores de activación fue la CD56^{dim} CD16⁺, alcanzando en los individuos en SIDA una mediana de 99% de células CD38⁺. De los tres marcadores de activación analizados, se observó un incremento en las frecuencias de células que expresan CD38 en todas las subpoblaciones de células NK en individuos con infección avanzada. Finalmente, el porcentaje de células CD69⁺ fue mucho menor que el de CD38⁺ y HLA-DR⁺, y se observó una disminución en este con el avance de la infección en células NK CD56^{birght} CD16⁻ y CD56⁻ CD16⁺.

6.4.2 Cuantificación de Biomarcadores de Inflamación y Translocación Bacteriana

Dado que se ha reportado que la infección por VIH-1 está asociada con translocación bacteriana, activación *bystander* e inflamación [41, 49, 91, 188-191], se midieron biomarcadores en los individuos estudiados. Se sabe que marcadores de inflamación como IL-1 α , IL-6, fibrinógeno y PCR están incrementados en individuos infectados con VIH-1 [188-192]. Como biomarcadores de inflamación, se cuantificaron las cantidades circulantes de PCR y fibrinógeno de los participantes. Los niveles de **PCR** se observaron incrementados en todos los individuos con VIH-1 con respecto al grupo control (Figura 6.20A). No se encontraron diferencias entre los controladores y controladores élite y los progresores crónicos y en SIDA. El TAR tampoco disminuyó los niveles de PCR en el plasma de los individuos con VIH-1.

A diferencia de la PCR, solo se observó un incremento en la cantidad de **fibrinógeno** en plasma en los controladores en comparación con el grupo control sin VIH-1, progresores crónicos y el grupo con TAR (Figura 6.20B). Además, el TAR disminuyó los niveles de fibrinógeno en plasma con respecto a todos los individuos con viremia detectable

(controladores, progresores crónicos y en SIDA, $p < 0.05$ en todos los casos) alcanzando un nivel similar al del grupo control. Los controladores elite y los donadores sin VIH-1 tuvieron niveles similares del biomarcador.

Aunque se encontraron algunas diferencias entre los individuos con VIH-1 en las cantidades circulantes de PCR y fibrinógeno, no se encontraron asociaciones con marcadores de progresión a SIDA (cuentas de linfocitos T $CD4^+$, CV, nadir de linfocitos T $CD4^+$) ni con activación de linfocitos T, células NK o DC ($p > 0.5$ en todos los casos). De manera interesante, se encontró una asociación negativa entre el porcentaje de linfocitos T $CD8^+$ $TLR2^+$ y la cantidad de PCR en plasma, de manera que a mayor cantidad de PCR hay un menor porcentaje de células que expresan TLR2 ($r = -0.4217$ $p = 0.006$).

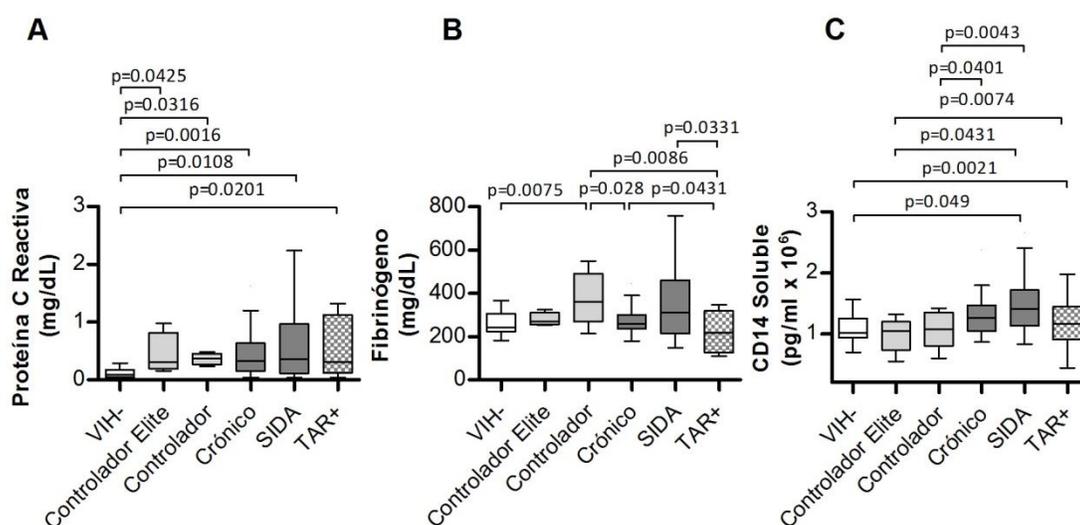


Figura 6.20. Marcadores de inflamación y activación inmunológica innata en individuos infectados con VIH-1 y donadores sin VIH-1. A) Niveles de proteína C reactiva medidos en suero por nefelometría. B) Niveles de fibrinógeno en plasma medidos por nefelometría a partir de muestras de plasma congelado. C) Niveles de sCD14 cuantificados por ELISA a partir de muestras de plasma congelado. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo.

Se cuantificó el **sCD14** como un marcador de activación inmunológica innata y marcador indirecto de translocación bacteriana [193]. De acuerdo a reportes anteriores [91], se observó que individuos con VIH-1 con viremia detectable (crónicos y SIDA) tenían mayor cantidad de sCD14 que los controladores elite y virémicos y el grupo control ($p < 0.05$ en

todos los casos, Figura 6.20C). Los individuos con viremia indetectable tuvieron cantidades similares de sCD14 en plasma que el grupo sin VIH-1. Como se esperaba, la cantidad de sCD14 correlacionó positivamente con las cuentas de linfocitos T CD4⁺ y negativamente con la CV en los individuos con VIH-1 sin TAR (Figura 6.21).

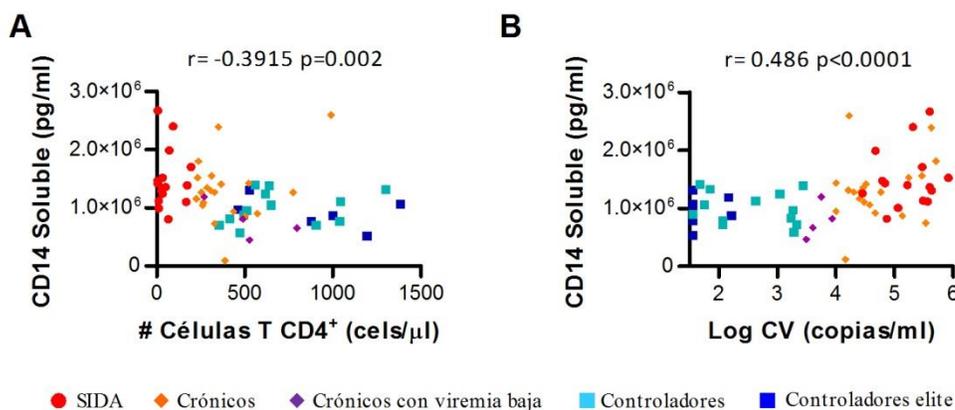


Figura 6.21. Asociación entre sCD14 y marcadores de progresión a SIDA en individuos con VIH-1 sin TAR. Correlaciones de Spearman entre la cantidad de sCD14 en plasma y cuentas de linfocitos T CD4⁺ (A) o CV (B).

Otro resultado interesante fue la asociación del porcentaje de células NK CD56⁺ CD16⁻ TLR4⁺ con la cantidad de sCD14 ($r=0.3574$ $p=0.0172$). Tanto TLR4 como CD14 son moléculas que reconocen al LPS en la membrana de los leucocitos [194]. Los resultados obtenidos muestran que a mayor translocación bacteriana, indicada indirectamente por la presencia de sCD14 en plasma, se observa un incremento en el porcentaje de células NK CD56⁺CD16⁻ que expresan TLR4. Esto sugiere que la presencia de este receptor y su ligando podrían estar asociados a la disfuncionalidad reportada en esta subpoblación, aunque no se encontraron asociaciones entre sCD14 y marcadores de activación de células NK CD56⁺ CD16⁻. Se encontraron asociaciones positivas entre la cantidad de sCD14 y marcadores de activación en DC plasmacitoides, linfocitos T y células NK. Como se esperaba, a mayor cantidad de sCD14 hubo un mayor porcentaje de linfocitos T CD4⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ ($r=0.3671$ $p=0.0054$) y CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ ($r=0.3059$ $p=0.0219$, Figura 6.23A). Adicionalmente, los niveles de sCD14 correlacionaron positivamente con los porcentajes de DC plasmacitoides CD80⁺ (Tabla 6.2, Figura 6.23B), células NK

CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺, HLA-DR⁺ y CD69⁺ (Tabla 6.3, Figura 6.23C para CD38), y con células NK CD56^{bright} CD16⁻ CD38⁺ (Tabla 6.3).

6.4.3 Cuantificación de citocinas

Como se mencionó anteriormente, diversos marcadores de inflamación como IL-1 α , IL-6, fibrinógeno y PCR están incrementados en individuos infectados con VIH-1 [188-192]. Por ello, para continuar con la caracterización del estado inflamatorio de los individuos infectados con VIH-1, se cuantificó un panel de 26 citocinas pro-/anti-inflamatorias en el plasma de los participantes del estudio: 15 sin VIH-1, 7 controladores élite, 14 controladores, 29 crónicos, 15 en SIDA y 38 con TAR (los resultados detallados para cada citocina se muestran en las Figura A1 en la sección de Apéndices). En la Figura 6.22 se muestran los resultados de las citocinas en las que se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control. Además, se realizaron análisis de correlación buscando las asociaciones entre los niveles las citocinas con marcadores clínicos de progresión a SIDA, expresión de TLRs y marcadores de activación en subpoblaciones leucocitarias, translocación bacteriana (sCD14) y con los otros marcadores de inflamación estudiados. Los resultados estadísticamente significativos se muestran en la Tabla 6.4.

IP-10, IL-2 y eotaxina se encontraron incrementadas en todos los individuos con VIH-1, independientemente de su CV y del TAR. Además, las cantidades de IP-10 se encontraron significativamente más altas en progresores crónicos y en SIDA en comparación con controladores de élite y controladores ($p < 0.01$ en todos los casos). El TAR disminuyó los niveles de IP-10 en comparación con los progresores crónicos y SIDA ($p < 0.0001$ y $p = 0.0004$, respectivamente) pero no se alcanzaron los niveles basales observados en control sin VIH-1. En el caso de IP-10 e IL-2, los niveles de citocinas en algunos individuos crónicos y en SIDA sobrepasaron más de 10 veces al grupo control. Tanto IP-10 como eotaxina, pero no IL-2, correlacionaron con los marcadores clínicos de progresión a SIDA: positiva con CV y activación de linfocitos T CD8⁺ y negativa con las cuentas de linfocitos T CD4⁺. Finalmente, los niveles de las tres citocinas se encontraron asociados positivamente con la cantidad de sCD14 en plasma en individuos con VIH-1 sin TAR. IP-

10, además, se encontró asociado positivamente a los niveles de PCR, otro biomarcador de inflamación que se eleva en individuos con VIH-1 sin TAR.

TNF- α se observó incrementado en todos los individuos con VIH-1 con viremia detectable (controladores, crónicos y SIDA) y en el grupo con TAR ($p < 0.01$ en todos los casos), pero no en los controladores élite. Los niveles de esta citocina se encontraron asociados con marcadores clínicos de progresión a SIDA (CV y cuentas de linfocitos T CD4⁺), activación en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, activación de las tres subpoblaciones de células NK y con la cantidad de sCD14 en individuos infectados con VIH-1 con TAR. Estos resultados enfatizan la importancia de TNF- α en el estado inflamatorio exacerbado observado en individuos con VIH-1 con infección avanzada.

Las cantidades circulantes de **MCP-1**, **MIP-1 β** e **IL-6** se observaron aumentadas en los progresores crónicos, SIDA e individuos con TAR, pero no en los controladores ni controladores élite. Además, en el caso de MIP-1 β se encontró aún mayor cantidad en el grupo con TAR en comparación con los progresores crónicos y los individuos en SIDA ($p = 0.0118$ y $p = 0.0068$, respectivamente). El nivel de esta citocina correlacionó positivamente con el biomarcador de inflamación PCR y la cantidad de sCD14, y negativamente con las cuentas de linfocitos T CD4⁺. Contrario a lo esperado, aunque sí se encontró un aumento en la cantidad circulante de IL-6 en progresores crónicos y en SIDA, los niveles de esta citocina no se encontraron asociados a marcadores clínicos de progresión, activación de linfocitos T, translocación bacteriana ni biomarcadores de inflamación (PCR y fibrinógeno).

Solamente se encontraron niveles elevados de **IL-10** y **IL-1 α** en el grupo de crónicos y SIDA, no así en los individuos con TAR, controladores ni controladores élite. Además, en el caso de IL-10, se encontraron mayores cantidades en crónicos y en SIDA que en controladores, controladores élite y con TAR ($p < 0.01$ en todos los casos). El nivel de IL-1 α fue menor en controladores élite comparados con individuos crónicos y en SIDA ($p < 0.01$ en ambos casos) y disminuyó parcialmente con el TAR ($p = 0.0042$ vs. crónicos y $p = 0.0284$ vs. SIDA). Los resultados de IL-10 e IL-1 α resultan especialmente interesantes ya que IL-10 es una citocina primordialmente anti-inflamatoria, mientras que IL-1 α (en combinación

con TNF- α e IL-6) es de las principales citocinas pro-inflamatorias. Ambas citocinas se encontraron aumentadas en individuos con VIH-1 con infección avanzada, y los niveles circulantes correlacionaron con marcadores de progresión, translocación bacteriana y activación en linfocitos T, DC y células NK. El papel inmunomodulador de IL-10 parece jugar un papel importante en el control de la inflamación causado por los otros marcadores inflamatorios presentes en los individuos con VIH-1 con infección avanzada. Además de las correlaciones mencionadas, se encontró que en individuos con VIH-1 sin TAR hay una mayor cantidad de IL-10 en suero cuando se elevan los niveles de IL-1 α ($r=0.46$ $p<0.0001$), TNF- α ($r=0.54$ $p<0.0001$), IL-6 ($r=0.5$ $p<0.0001$), G-CSF ($r=0.27$ $p=0.0246$), GM-CSF ($r=0.46$ $p<0.0001$), IL-12(p40) ($r=0.5$ $p<0.0001$), IL-15 ($r=0.32$ $p=0.006$), IP-10 ($r=0.63$ $p<0.0001$), MCP-1 ($r=0.3$ $p=0.0153$), MIP-1 α ($r=0.33$ $p=0.0055$) y MIP-1 β ($r=0.26$ $p=0.0325$).

Resulta interesante recalcar que la única citocina que se encontró disminuida en cantidad con respecto a los donadores sanos fue **IL-17**, pero únicamente en los individuos con viremia alta (crónicos y SIDA). Además, el nivel de IL-17 se mantuvo por debajo del basal aún después del TAR. Los controladores y controladores élite mantuvieron niveles similares que los donadores sin VIH-1, y menores a los de crónicos, SIDA y TAR ($p<0.04$ en todos los casos). A diferencia de lo observado con otras citocinas, la cantidad de IL-17 en plasma correlacionó positivamente con las cuentas de linfocitos T CD4⁺ y negativamente con la CV y la activación de linfocitos T. Además, se encontró una correlación negativa entre IL-17 y eotaxina ($r=-0.3111$) y TNF- α ($r=-0.3074$) y positiva con IFN- γ ($r=0.5089$), IL-15 ($r=0.009$), IL-1 β ($r=0.4976$), IL-4 ($r=0.4801$) y TNF- β ($r=0.6322$), $p<0.05$ en todos los casos.

Las cantidades de **IL-15** se encontraron elevadas solamente en el grupo de individuos en SIDA en comparación con donadores sin VIH-1, controladores élite, controladores e individuos crónicos ($p<0.05$ en todos los casos). Los niveles de **IL-8** se encontraron elevados únicamente en el grupo de controladores con respecto al control ($p=0.0051$) y a los individuos con TAR ($p=0.0133$). **GM-CSF** se observó incrementado solamente en el grupo con TAR con respecto al grupo control y a los controladores ($p=0.0035$ y $p=0.0153$, respectivamente).

Tabla 6.4. Asociaciones entre la expresión de citocinas y marcadores de progresión, inflamación, activación y TLRs en individuos con VIH-1 sin TAR.

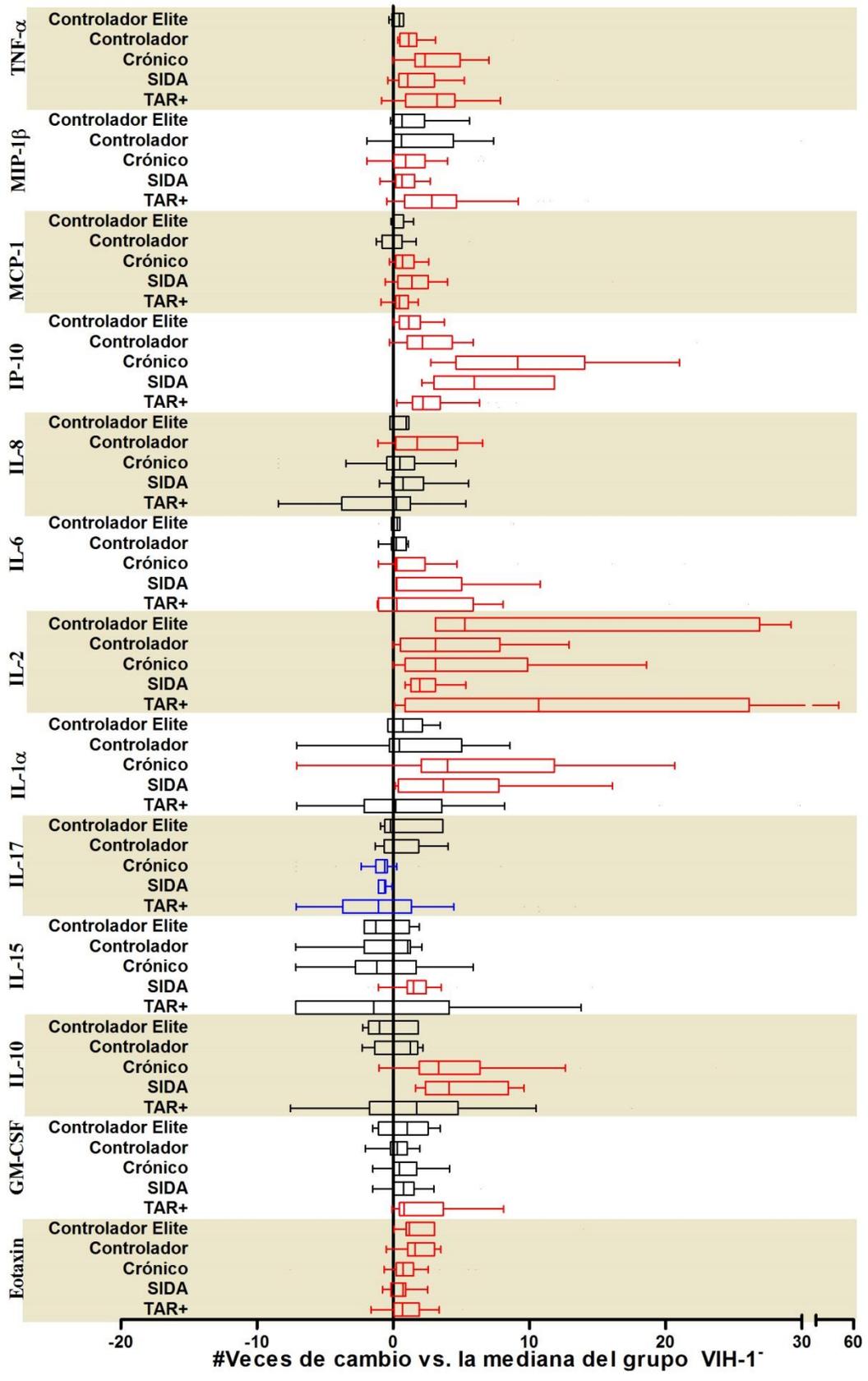
	<i>r</i>	<i>p</i>		<i>r</i>	<i>p</i>
IFN-a			IFN-g		
% NK CD56 ^b CD38 ⁺	-0.2990	0.0349	% NK CD56 ^b HLA-DR ⁺	0.2904	0.0476
% pDC TLR9 ⁺	0.2746	0.0466	% CD4 TLR3 ⁺	-0.3198	0.0144
% Lc T CD4 ⁺ TLR4 ⁺	-0.2867	0.0322	% cDC TLR6 ⁺	-0.2681	0.05
IL-10			% NK CD56 ^b TLR6 ⁺	0.2675	0.0406
CV	0.5457	<0.0001	IL-15		
# Lc T CD4 ⁺	-0.4263	0.0002	% cDC CD86 ⁺	0.3467	0.0095
sCD14	0.3408	0.0083	IL-17		
% cDC CD80 ⁺	0.2754	0.0418	CV	-0.363	0.0017
% pDC CD80 ⁺	0.3189	0.0176	# Lc T CD4 ⁺	0.3071	0.0087
% T CD4 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.3070	0.0136	% T CD4 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	-0.2824	0.0238
% T CD8 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.3316	0.0074	% T CD8 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	-0.2567	0.039
% NK CD56 ^d CD38 ⁺	0.6022	<0.0001	% NK CD56 ^d CD38 ⁺	-0.2752	0.0253
% NK CD56 ^d CD69 ⁺	0.2818	0.0219	% NK CD56 ^b CD38 ⁺	-0.3653	0.0084
% NK CD56 ^b CD38 ⁺	0.5905	<0.0001	% cDC TLR6 ⁺	-0.3866	0.0039
% NK CD56 ^c CD38 ⁺	0.4438	0.0002	IL-1α		
% pDC TLR9 ⁺	-0.3590	0.0071	CV	0.3975	0.0005
% NK CD56 ^b TLR6 ⁺	-0.3363	0.0092	# Lc T CD4 ⁺	-0.362	0.0018
IL-12 (p40)			sCD14	0.2739	0.0358
% pDC CD86 ⁺	0.2924	0.0303	% pDC CD80 ⁺	0.3237	0.0159
% NK CD56 ^d CD38 ⁺	0.3136	0.0103	% T CD4 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.2917	0.0193
% NK CD56 ^b CD38 ⁺	0.3634	0.0088	% T CD8 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.3006	0.0158
% NK CD56 ^c CD38 ⁺	0.2819	0.0219	% NK CD56 ^d CD38 ⁺	0.4223	0.0004
% pDC TLR9 ⁺	-0.4155	0.0016	% NK CD56 ^b CD38 ⁺	0.3889	0.0048
IL-12 (p70)			% NK CD56 ^c CD38 ⁺	0.2483	0.0445
% NK CD56 ^c CD69 ⁺	0.3208	0.0231	% Lc T CD4 ⁺ TLR6 ⁺	-0.3717	0.0041
% Lc T CD4 ⁺ TLR3 ⁺	-0.3584	0.0062	% Lc T CD8 ⁺ TLR6 ⁺	-0.265	0.0426
% Lc T CD8 ⁺ TLR3 ⁺	-0.3362	0.0099	% NK CD56 ^d TLR6 ⁺	-0.2903	0.0257
% NK CD56 ^d TLR3 ⁺	-0.3148	0.0161	% NK CD56 ^c TLR6 ⁺	-0.3004	0.045
% NK CD56 ^b TLR6 ⁺	0.3385	0.0264	IL-1β		
IL-2			% NK CD56 ^b DR ⁺	0.326	0.0253
sCD14	0.3521	0.0062	% NK CD56 ^b CD38 ⁺ DR ⁺	0.2947	0.0443
% NK CD56 ^d CD38 ⁺ DR ⁺	0.275	0.0305	% cDC TLR4 ⁺	-0.3622	0.0066
% NK CD56 ^d DR ⁺	0.2827	0.026	% cDC TLR6 ⁺	-0.2972	0.0291
IP-10			MIP-1β		
CV	0.5714	<0.0001	# Lc T CD4 ⁺	-0.2454	0.0406
# Lc T CD4 ⁺	-0.4973	<0.0001	PCR	0.3649	0.0190
sCD14	0.383	0.0025	sCD14	0.2657	0.0457
PCR	0.3096	0.0403	% Lc T CD4 ⁺ TLR4 ⁺	-0.301	0.0242
% pDC CD80 ⁺	0.297	0.0277	% NK CD56 ^d CD38 ⁺ DR ⁺	0.3053	0.0177
% pDC CD86 ⁺	0.3682	0.0057	% NK CD56 ^d DR ⁺	0.3925	0.0019
% T CD4 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.4034	0.0009	% NK CD56 ^d CD59 ⁺	0.3114	0.0069
% T CD8 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.4050	0.0009	% NK CD56 ^d TLR3 ⁺	0.3374	0.0103
% NK CD56 ^d CD38 ⁺	0.6299	<0.0001	% NK CD56 ^d TLR9 ⁺	0.3617	0.0057
% NK CD56 ^d CD69 ⁺	0.3694	0.0023	IL-6		
% NK CD56 ^b CD38 ⁺	0.5737	<0.0001	% pDC CD80 ⁺	0.3394	0.0112
% NK CD56 ^c CD38 ⁺	0.4331	0.0003	% NK CD56 ^b DR ⁺	0.368	0.0109
% pDC TLR9 ⁺	-0.2676	0.0483	% NK CD56 ^b CD38 ⁺ DR ⁺	0.3347	0.0215

	<i>r</i>	<i>p</i>		<i>r</i>	<i>p</i>
TNF-α			IL-8		
CV	0.4537	<0.0001	% cDC CD80 ⁺	-0.2897	0.0319
# Lc T CD4 ⁺	-0.4004	0.0005	% cDC TLR3 ⁺	0.3538	0.0087
sCD14	0.3012	0.0204	% NK CD56 ^d TLR3 ⁺	0.2582	0.0483
% T CD4 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.3594	0.0035	% Lc T CD4 ⁺ TLR4 ⁺	-0.2882	0.0297
% T CD8 ⁺ CD38 ⁺ DR ⁺	0.3231	0.0092	% pDC TLR9 ⁺	0.2785	0.0395
% NK CD56 ^d CD38 ⁺	0.5911	<0.0001	MCP-1		
% NK CD56 ^d CD38 ⁺ DR ⁺	0.3878	0.0018	CV	0.2704	0.0236
% NK CD56 ^d DR ⁺	0.4134	0.0008	% NK CD56 ^d CD38 ⁺	0.4598	0.0001
% NK CD56 ^d CD69 ⁺	0.2452	0.0472	% NK CD56 ^d CD38 ⁺ DR ⁺	0.2909	0.0241
% NK CD56 ^b CD38 ⁺	0.5158	0.0001	% NK CD56 ^d CD69 ⁺	0.2621	0.0364
% NK CD56 ^b CD38 ⁺ DR ⁺	0.3058	0.0366	% NK CD56 ^B CD38 ⁺	0.2795	0.0493
% NK CD56 ⁺ CD38 ⁺	0.3101	0.0113	% NK CD56 ⁺ CD38 ⁺	0.314	0.0115
% pDC TLR9 ⁺	-0.3207	0.0184	% Lc T CD8 ⁺ TLR2 ⁺	-0.2718	0.0427
TNF-β			Eotaxina		
CV	-0.2442	0.0387	sCD14	-0.2648	0.0427
# Lc T CD4 ⁺	0.2852	0.0152	% NK CD56 ^b CD38 ⁺	-0.2763	0.0497
sCD14	-0.276	0.0328	% NK CD56 ^b CD38 ⁺ DR ⁺	-0.3093	0.0344
% NK CD56 ^b CD38 ⁺	-0.2763	0.0497	% NK CD56 ⁻ CD38 ⁺ DR ⁺	-0.3129	0.0269
% NK CD56 ^b CD38 ⁺ DR ⁺	-0.3093	0.0344	% NK CD56 ⁻ DR ⁺	-0.3791	0.0066
% NK CD56 ⁻ CD38 ⁺ DR ⁺	-0.3129	0.0269	% Lc T CD4 ⁺ TLR3 ⁺	-0.2829	0.0314
% NK CD56 ⁻ DR ⁺	-0.3791	0.0066	% NK CD56 ^b TLR3 ⁺	-0.3021	0.0462
% NK CD56 ^b TLR3 ⁺	-0.3021	0.0462			
% Lc T CD4 ⁺ TLR3 ⁺	-0.2829	0.0314			

pDC, DC plasmacitoides; cDC, DC convencionales; Lc T, linfocitos T; NK CD56^b, CD56^{bright}, CD16⁺; NK CD56^d, CD56^{dim} CD16⁺; NK CD56⁻, CD56⁻ CD16⁺; DR, HLA-DR; PCR, proteína C reactiva.

No se encontraron diferencias significativas con G-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-1 β , MIP-1 α . Los niveles de IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, y TNF- β fueron muy bajos y, en algunos casos, indetectables por el método utilizado. No se encontraron asociaciones entre las cantidades circulantes de ninguna de las citocinas estudiadas con el tiempo de TAR.

(Siguiente página) **Figura 6.22. Cambio en los niveles de citocinas en plasma de individuos infectados con VIH-1 vs. donadores sin VIH-1.** Se cuantificaron los niveles 26 citocinas por Luminex a partir de muestras de plasma congelado. En rojo se muestran aquellas donde el nivel de la citocina correspondiente fue significativamente mayor a la mediana del grupo control sin VIH-1, y en azul aquéllas donde el nivel fue significativamente menor. Aquellas donde no se encontró diferencia estadística se muestran en color negro. Las diferencias entre los grupos se calcularon mediante una prueba de Kruskal-Wallis corregida para comparaciones múltiples con la prueba posthoc de Dunn. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo.



6.4.4 Asociación entre la expresión de TLRs, activación inmunológica e inflamación

Habiendo analizado independientemente las frecuencias de DC, linfocitos T y células NK que expresan TLRs y marcadores de activación, así como el estado inflamatorio de los individuos con VIH-1 en diferentes etapas de progresión comparados con donadores sanos, se realizó un estudio de asociación entre las variables estudiadas. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron aquellos que resultaron particularmente interesantes.

Expresión de TLR9 en DC plasmacitoides. Se sabe que una de la principales funciones de las DC plasmacitoides es la producción de IFNs tipo I, en particular IFN- α , y que pueden producir hasta 1000 veces más que otros tipos celulares en respuesta a virus [31, 195-197]. Se ha reportado que las DC plasmacitoides de individuos con VIH-1 responden a la estimulación por TLRs mediante la producción de TNF- α e IFN- α [197, 198]. Sin embargo, la funcionalidad de las DC en individuos infectados con VIH-1 sigue siendo controversial. Un primer enfoque en la posibilidad de las DC plasmacitoides de responder a una infección viral es la expresión de TLRs. En este trabajo se cuantificó la cantidad de células TLR9⁺ y se encontró una disminución en la proporción de DC plasmacitoides que expresan TLR9 en individuos con VIH-1 con infección avanzada (Figura 6.7). Además, la proporción de DC plasmacitoides TLR9⁺ correlacionó negativamente con la activación de linfocitos T CD8⁺ ($r = -0.27$ $p = 0.0481$) células NK CD38⁺ en las subpoblaciones CD56^{dim} CD16⁺ ($r = -0.33$ $p = 0.0153$) y CD56⁻ CD16⁺ ($r = -0.4$ $p = 0.0029$) y con la citocina IL-10. Además, se observó una correlación negativa con IFN- α , IL-12, IP-10 y TNF- α (Tabla 6.4). Estos resultados sugieren que a mayor avance de la infección ocurre una disminución en las DC plasmacitoides TLR9⁺, y a mayor cantidad de células que expresan este receptor se encuentran niveles más altos de IFN- α y TNF- α en circulación. En un modelo de regresión múltiple se encontró una asociación significativa de la cantidad de DC plasmacitoides TLR9⁺ considerando las citocinas asociadas (IL-10, IFN- α , IL-12, IP-10, TNF- α e IL-8) y los porcentajes de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ y CD56⁻ CD16⁺ CD38⁺ como posibles causas de la expresión de TLR9 en DC plasmacitoides ($r^2 = 0.451$ $p = 0.0017$). El efecto más fuerte fue dado la proporción de células NK CD56^{dim} CD16⁺ activadas ($p = 0.0022$, análisis detallado en la Tabla A1 en la sección de Apéndices). Resulta interesante recalcar que, a diferencia de las células NK y linfocitos T

CD8⁺, no se encontraron asociaciones entre la frecuencia de DC activadas y el porcentaje de DC plasmacitoides TLR9⁺.

TLRs extracelulares en DC convencionales. Tanto la frecuencia de DC convencionales TLR4⁺ como TLR6⁺ correlacionaron positivamente con marcadores de activación en diferentes poblaciones leucocitarias (DC convencionales CD80⁺ r=0.3 p=0.0237 para TLR4 y células NK CD38⁺ CD56^{bright} CD16⁻ r= 0.35 p=0.0331 y CD56⁻ CD16⁺ r=0.32 p=0.0163 para TLR6) y negativamente con IL-1β (Tabla 6.4), lo que podría sugerir un incremento en la expresión de estos receptores asociado a la activación generalizada observada en la infección. De manera contraria, la cantidad de DC convencionales que expresa TLR2 correlacionó negativamente con la activación de linfocitos T CD8⁺ (r= -0.3 p=0.0331) y con la cantidad de IFN-γ circulante (producido abundantemente por este subtipo celular) y con IL-17 (Tabla 6.4).

TLR3 en células inmunomoduladoras. Se encontraron asociaciones entre las proporciones de células que expresan TLR3 en linfocitos T CD4⁺ y células NK CD56^{bright} CD16⁻ con los marcadores de activación e inflamación analizados (Tabla 6.4). Estas poblaciones son principalmente productoras de citocinas, por lo que se les atribuye un papel inmunomodulador. En ambos casos, se observaron correlaciones negativas entre la cantidad de células TLR3⁺ con TNF-α, eotaxina. Además, la cantidad de células TLR3⁺ correlacionó positivamente con el porcentaje de células activadas de la población correspondiente (r=0.28 p=0.0316 para linfocitos T CD4⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ y r=0.51 p=0.0007 para células NK CD56^{bright} CD16⁻ CD38⁺ HLA-DR⁺). Lo anterior sugiere que la expresión de TLR3 en poblaciones linfocitarias productoras de citocinas está fuertemente asociada a su activación y a la producción de citocinas inflamatorias y quimiotácticas. La cantidad de células TLR3⁺ también correlacionó negativamente con la cantidad de IL-12 circulante para linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺.

Expresión de TLR4 en linfocitos. Se sabe que el LPS es uno de los principales productos de translocación bacteriana en la infección por VIH-1 [91] y que este producto es reconocido por TLR4 [194]. Por ello, se habría esperado encontrar diferencias en la expresión de este TLR entre grupos de estudio y asociaciones con marcadores de activación, progresión e inflamación en individuos con VIH-1. Es interesante que la frecuencia de células TLR4⁺

fuera mayor en linfocitos T que en otras poblaciones celulares. Contrario a lo esperado, no se encontraron asociaciones entre las frecuencias de células que expresan TLR4 y sCD14 (que se eleva en presencia de altas cantidades de LPS en plasma), con la excepción de la población de células NK CD56⁻ CD16⁺ TLR4⁺ (r=0.3574 p=0.0172). Esta baja expresión y la falta de asociación entre TLR4 y sCD14 podría deberse a un fenómeno de tolerancia a LPS [179] y posiblemente también como un mecanismo de regulación negativa de la respuesta inflamatoria.

Expresión de TLR6 en linfocitos. Independientemente de las diferencias de células TLR6⁺ en linfocitos T y células NK, resulta interesante que fue el TLR extracelular más abundantemente expresado. Con la excepción de las células NK CD56^{dim} CD16⁺, la frecuencia de células que expresan TLR6 correlacionó negativamente con la cantidad de IL-1 α circulante en todas las poblaciones de linfocitos analizadas (Tabla 6.4). Además, se encontraron asociaciones negativas entre la frecuencia de células que expresan este TLR y activación inmunológica en varios casos: linfocitos T CD8⁺ TLR6⁺ y linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ (r= -0.26 p=0.0406), células NK CD56^{bright} CD16⁻ TLR6⁺ y CD56^{dim} CD16⁺ HLA-DR⁺ (r= -0.43 p=0.0047), células NK CD56⁻ CD16⁺ TLR6⁺ y CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ (r= -0.36 p=0.0129) y HLA-DR⁺ (r= -0.36 p=0.0201). IL-1 α es principalmente producida por monocitos y macrófagos en respuesta a estimulación por TLRs. Es posible que ocurra una disminución en la expresión de TLR6 en otras poblaciones linfocitarias como un mecanismo de regulación negativa que inhiba la producción de más citocinas inflamatorias como respuesta a la estimulación por este receptor, de manera similar a la tolerancia a LPS por TLR4. Los hallazgos en TLR6 son especialmente interesantes ya que no se ha descrito ningún ligando de este receptor asociado a la infección por VIH-1.

Activación de DC plasmacitoides y células NK como marcadores de progresión a SIDA. De manera interesante, los análisis de expresión de marcadores de activación en diferentes subpoblaciones leucocitarias mostraron una tendencia generalizada al incremento de frecuencias de células activadas en la infección avanzada (progresores crónicos y en SIDA). Se ha establecido que la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ correlaciona con CV y linfocitos T CD4⁺, los principales parámetros que se utilizan para el monitoreo clínico de la infección por VIH-1 [61, 199]. Algunos autores consideran que la

activación de linfocitos T CD8⁺ es un mejor predictor de la progresión a SIDA que los marcadores clínicos [199-201]. Como se esperaba, la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ correlacionó con ambos marcadores clínicos (Figura 6.23A).

Dado nuestro hallazgo del incremento en la cantidad de DC plasmacitoides (CD80⁺) y células NK CD56^{dim} CD16⁺ activadas en la infección avanzada, se analizó la correlación entre estas células y la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺ y la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, buscando su asociación con la progresión de la infección por VIH-1 (Figura 6.23B, D y tabla 6.3 para DC y Figura 6.23C, D y tabla 6.4 para células NK). De manera interesante, se encontraron asociaciones positivas entre la frecuencia de DC plasmacitoides CD80⁺ y células NK CD38⁺ con la CV y frecuencia de linfocitos T CD8⁺ activados y negativas con las cuentas de linfocitos T CD4⁺. Cabe recalcar, que las asociaciones más fuertes se encontraron en el porcentaje de células NK CD38⁺. Debido a la gran representatividad de la población de células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ en sangre periférica (Figuras 6.18 y 6.19), se ejemplificó esta subpoblación en la Figura 6.23. Sin embargo, las asociaciones con marcadores clínicos de progresión y activación en linfocitos T se encontraron también con las subpoblaciones CD56^{bright} CD16⁻ y CD56⁻ CD16⁺ de células NK (Tabla 6.3), no así con las DC convencionales (Tabla 6.2). Finalmente, se realizó una correlación entre activación de DC plasmacitoides y células NK CD38⁺ y se encontró que incrementan de manera similar con el avance de la infección ($r=0.446$ $p=0.0006$ para CD56^{dim} CD16⁺ Figura 6.23E, $r=0.5149$ $p=0.0006$ para CD56^{bright} CD16⁻ y $r=0.341$ $p=0.0102$ para CD56⁻ CD16⁺).

La activación de linfocitos T se ha asociado con translocación bacteriana, activación *bystander*, y marcadores de inflamación en la infección por VIH-1 [41, 49, 91, 188, 189]. Dados los resultados encontrados en la medición de sCD14 (como marcador de activación inmunológica innata e indirectamente de LPS en plasma), biomarcadores de inflamación y citocinas, se buscaron las asociaciones de éstos con la activación de leucocitos. De acuerdo a publicaciones anteriores [91], se encontró una correlación positiva entre la cantidad de linfocitos T CD8⁺ activados y el sCD14 (Figura 23A). Adicionalmente, también se encontró esta asociación con la frecuencia de DC plasmacitoides CD80⁺ (Figura 23B, Tabla 6.2) y células NK CD56^{dim} CD16⁺ (Figura 23C) y CD56^{bright} CD16⁻ CD38⁺ (Tabla 6.4).

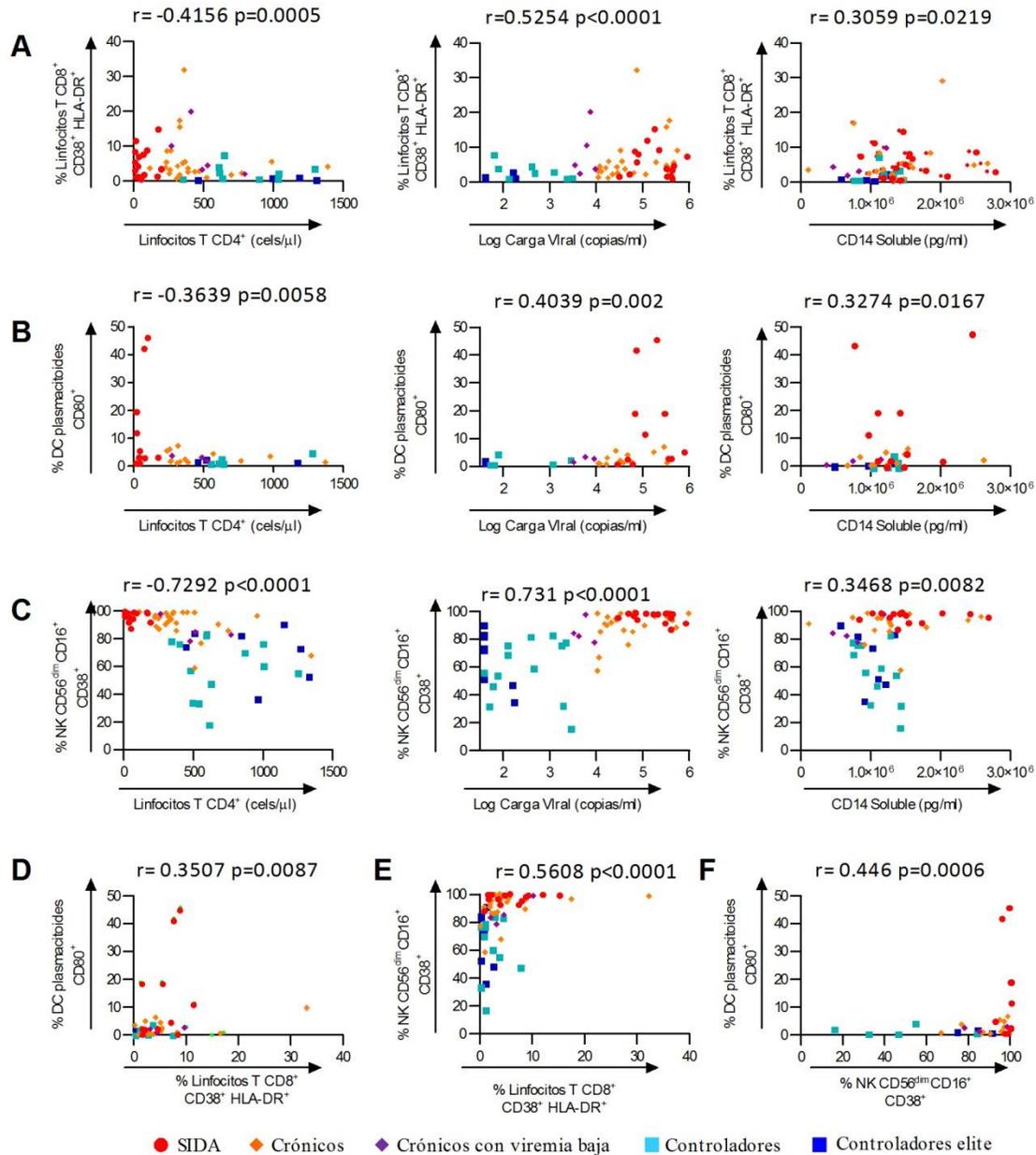


Figura 6.23. Asociación entre marcadores de activación en DC plasmacitoides y células NK CD56^{dim} CD16⁺ con marcadores de progresión a SIDA y translocación bacteriana en individuos con VIH-1 sin TAR. **A-C)** Correlaciones de Spearman entre porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, DC plasmacitoides CD80⁺ y células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ con cuentas de linfocitos T CD4⁺, CV y sCD14. **D y E)** Correlaciones de Spearman d entre porcentaje de DC plasmacitoides CD80⁺ y células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ con linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺. **F)** Correlación de Spearman entre el porcentaje DC plasmacitoides CD80⁺ y células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺.

Además de las asociaciones mencionadas entre la activación de células NK y marcadores clínicos de progresión a SIDA y activación inmunológica (linfocitos T, DC plasmacitoides y sCD14), también se encontraron asociaciones positivas con citocinas proinflamatorias y/o quimiotácticas como IL-1 α , IP-10, TNF- α , IL-10, IL-12 y MCP-1 α , y negativa con IL-17 (Tabla 6.3). Se hizo un análisis multivariado considerando a la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ y DC plasmacitoides, cantidad de sCD14 y las citocinas mencionadas como posibles causas de la activación de la activación de las células NK (resultados detallados en la Tabla A2 en la sección de Apéndices). El análisis multivariado mostró una asociación significativa entre la frecuencia de células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ y las variables mencionadas ($r^2=0.568$ $p=0.0001$). El modelo de regresión mostró que la activación en NK CD56^{dim} CD16⁺ está dirigido por las cuentas de linfocitos T CD4⁺ ($p=0.0368$) y la cantidad de MCP-1 circulante ($p=0.0371$). A pesar del incremento en las células CD38⁺ en las células NK CD56^{bright} CD16⁻ y sus asociaciones con otros marcadores de progresión a SIDA, el modelo de regresión múltiple no fue significativo para esta subpoblación.

También se realizó análisis multivariado para la frecuencia de DC plasmacitoides CD80⁺ y marcadores de progresión, inflamación y activación asociados. En el modelo de regresión múltiple se consideraron como variables dependientes a la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, porcentajes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺, DC convencionales CD80⁺, cantidad de sCD14, IL-1 α , IL-6, IL-10 e IP-10. Aunque si se encontraron asociaciones independientes entre la frecuencia de DC plasmacitoides activadas y los marcadores mencionados de manera independiente, el modelo de regresión no permitió establecer si la causa del incremento en la activación de las DC plasmacitoides fue dependiente de ellos ($p=0.357$).

Estos hallazgos muestran que la expresión de CD38 en células NK CD56^{dim} CD16⁺ se puede utilizar como un marcador de progresión de la infección por VIH-1. Estos resultados ya fueron publicados en la revista Journal of Leukocyte Biology [202]. La publicación completa se encuentra anexa en la sección de Apéndices.

6.4.5 Perfiles inflamatorios y progresión a SIDA

Incremento de IP-10 y su asociación con la progresión de la infección por VIH-1. Como se mostró anteriormente, la cantidad de IP-10 se vio sumamente incrementada en los individuos con VIH-1 con respecto al grupo control, independientemente de su CV y del TAR (Figura 6.22, 6.24 y A1 en la sección de Apéndices). Este incremento se vio exacerbado en individuos con infección avanzada con respecto a los controladores y controladores élite. Dadas las asociaciones encontradas entre la cantidad de esta citocina y marcadores de progresión y activación en la infección por VIH-1, se realizó un análisis multivariado considerando la cantidad de IP-10 (pg/ml) como variable independiente y la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, cantidad de sCD14, cantidad de PCR, porcentaje DC plasmacitoides CD80⁺, porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ y porcentaje células NK CD38⁺ y citocinas asociadas como variables dependientes (análisis detallado en la Tabla A3 en la sección de Apéndices).

Los resultados de la regresión múltiple mostraron una fuerte asociación significativa entre la cantidad de IP-10 en plasma y los marcadores analizados ($r^2=0.998$ $p=0.0021$) y, de manera interesante, se observó que el incremento de esta citocina depende de la activación inmunológica generalizada, incluyendo la de DC plasmacitoides ($p=0.0273$), linfocitos T CD4⁺ ($p=0.0455$) y CD8⁺ ($p=0.0262$), células NK CD16⁺ (CD56^{dim} $p=0.0317$ y CD56⁺ $p=0.0363$). El efecto además se encontró significativamente asociado con citocinas como GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-6 y TNF- α ($p<0.05$ en todos los casos). Este dato resulta especialmente interesante ya que esta citocina (y quimiocina, también llamada CXCL-10) es inducida por de IFNs, citocinas que juegan un papel importante en la infección por VIH-1. Además, el nivel de IP-10 se han propuesto como un potencial marcador de inflamación en otras enfermedades [203] y, recientemente, se ha reportado como un predictor de progresión rápida en infección aguda [204].

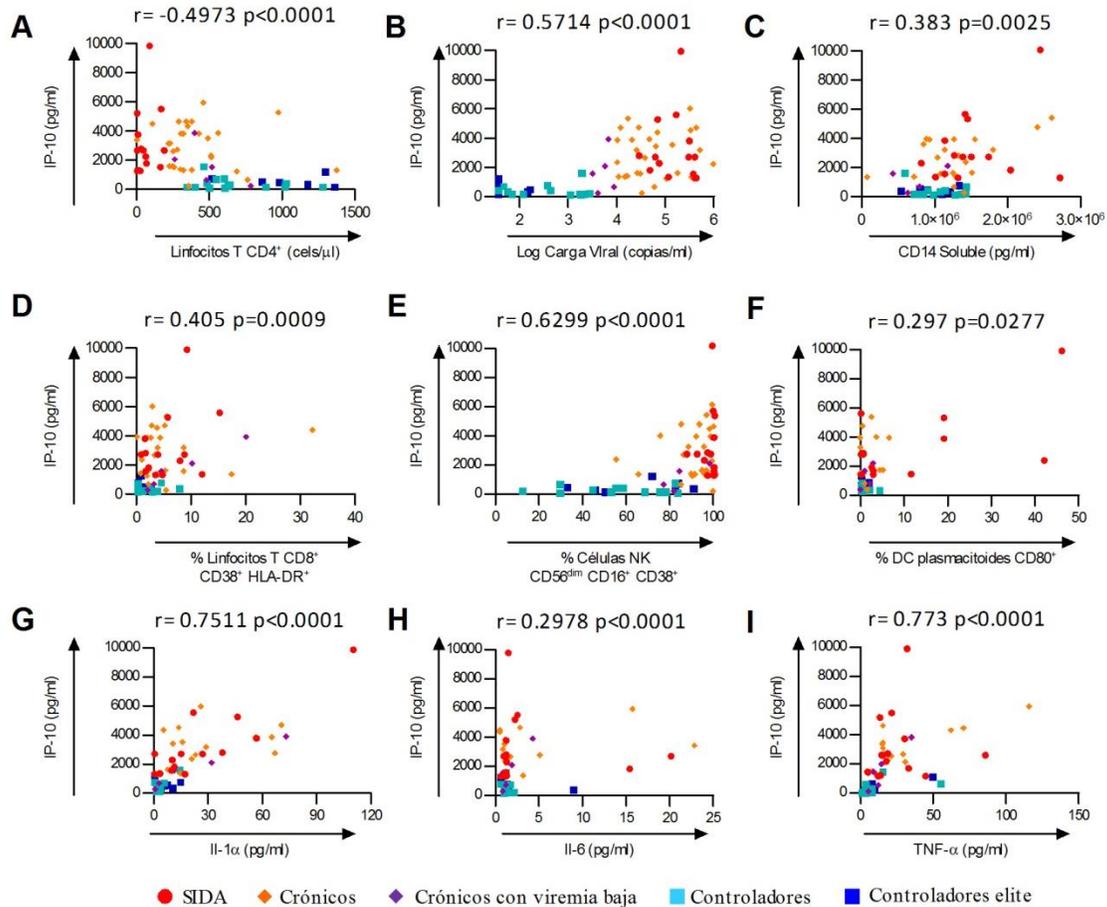


Figura 6.24. Asociación entre cantidad circulante de IP-10 y marcadores clínicos de progresión a SIDA, activación inmunológica, translocación bacteriana y citocinas proinflamatorias en individuos con VIH-1 sin TAR. Correlaciones de Spearman entre la cantidad de IP-10 y con cuentas de linfocitos T CD4⁺, (A), CV (B), sCD14 (C), porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ (D), células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ (E) y DC plasmacitoides CD80⁺ (F), y cantidad en plasma de IL-1α (G), IL-6 (H) y TNF-α (I).

IL-10 como principal citocina anti-inflamatoria en la infección por VIH-1. IL-10 se encontró asociada a marcadores clínicos de progresión a SIDA (Tabla 6.4, Figura 6.25), así como a activación de linfocitos T, DC y células NK de manera independiente. Además, la cantidad circulante de IL-10 también se asoció positivamente con varias citocinas proinflamatorias (ver sección 6.4.3 de Resultados). Al realizar un análisis multivariado de regresión múltiple, se encontró que el modelo fue significativo al considerar la activación inmunológica (linfocitos T, células NK y DC), inflamación (G-CSF, GM-CSF, IL-12, IL-15, IL-1α, IL-6, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β y TNF-α), translocación bacteriana y marcadores clínicos de progresión ($r^2=0.929$, $p < 0.0001$, resultados detallados del análisis

multivariado en la Tabla A4 en la sección de Apéndices). De manera interesante y opuesta a lo observado en IP-10, no se encontró que los niveles de IL-10 dependen de la expresión de marcadores de activación en poblaciones leucocitarias. Sin embargo, el modelo indicó que las cantidad de IL-10 depende de IL-1 α (p=0.0439), IL-6 (p=0.0012) e IP-10 (p=0.0021) tres de las principales citocinas proinflamatorias, pero no de los niveles de TNF- α . Este resultado sugiere que el incremento en los niveles de IL-10 ocurre como un mecanismo para contrarrestar la acción inflamatoria inducida por IL-1 α , IL-6 e IP-10.

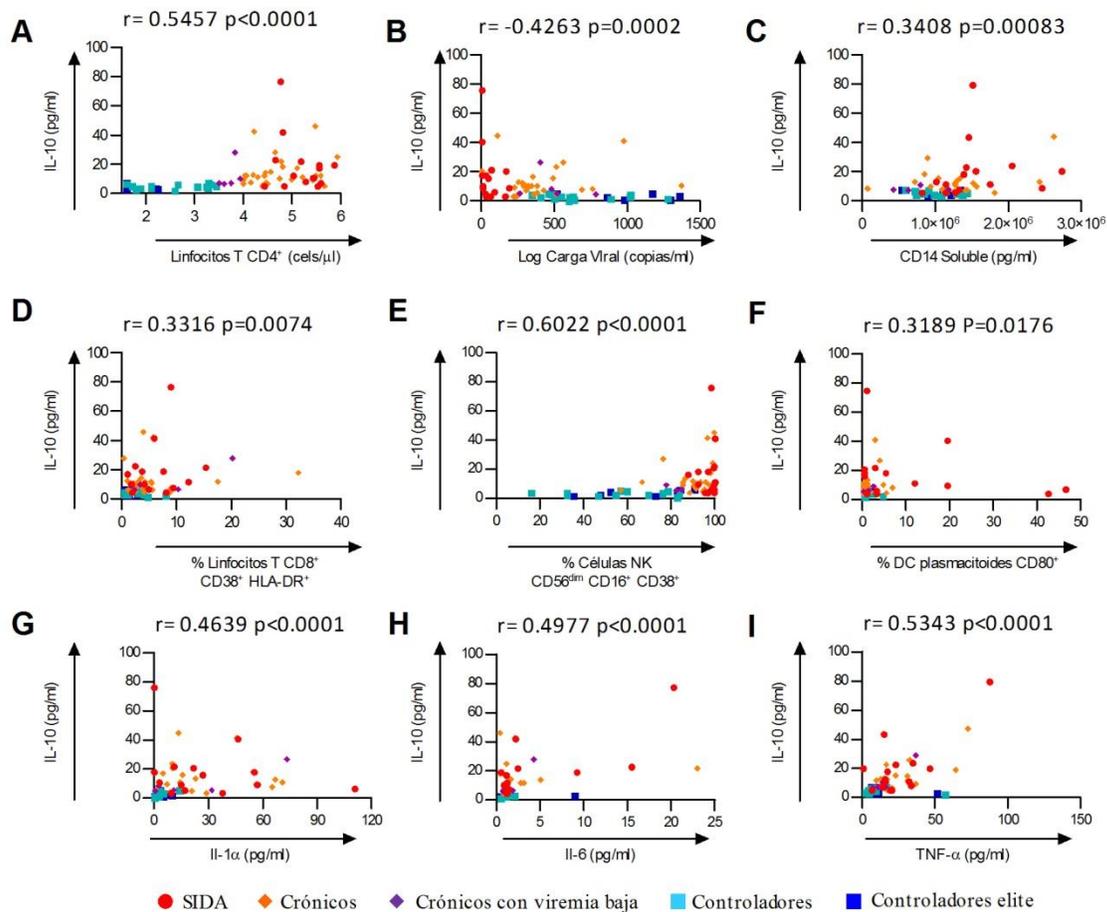


Figura 6.25. Asociación entre cantidad circulante de IL-10 y marcadores clínicos de progresión a SIDA, activación inmunológica, translocación bacteriana y citocinas proinflamatorias en individuos con VIH-1 sin TAR. Correlaciones de Spearman entre la cantidad de IP-10 y con cuentas de linfocitos T CD4⁺, (A), CV (B), sCD14 (C), porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ (D), células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ (E) y DC plasmacitoides CD80⁺ (F), y cantidad en plasma de IL-1 α (G), IL-6 (H) y TNF- α (I).

Incremento de TNF- α e IL-1 α en individuos con VIH-1 en infección avanzada. Las cantidades circulantes de TNF- α e IL-1 α se vieron incrementados en individuos con VIH-1 en infección avanzada en comparación con el grupo control (Figura 6.22). Independientemente, tanto el nivel de TNF- α como el de IL-1 α correlacionaron negativamente con CV, y positivamente con número de linfocitos T CD4⁺, sCD14, activación de pDC, células NK (porcentaje de CD38⁺ en las tres subpoblaciones) y linfocitos T (CD4⁺ y CD8⁺), diversas citocinas proinflamatorias e IL-10 (Tabla 6.4). IL-1 α además correlacionó positivamente con la expresión de TLR6 en linfocitos T, células NK CD56^{dim} CD16⁺ y CD56⁻ CD16⁺ (Tabla 6.4). En un modelo multivariado se consideraron todas las variables asociadas a la cantidad de IL-1 α y se encontró una asociación significativa ($r^2=0.941$ $p=0.0018$). De manera interesante, únicamente se observó que la cantidad de esta citocina depende de los niveles de IL-10 ($p=0.0285$) e IP-10 ($p=0.0014$).

TNF- α , además de las asociaciones mencionadas, correlacionó con el porcentaje de DC plasmacitoides TLR9⁺. En este caso, el modelo multivariado resultó significativo ($r^2=0.934$ $p<0.0001$) y se encontró que la cantidad de TNF- α depende de IL-10 ($p=0.006$), IL-2 ($p=0.0465$) y MIP-1 β ($p=0.0013$).

Es interesante que aunque ambas citocinas están asociadas con marcadores clínicos de progresión a SIDA (CV, linfocitos T CD4⁺, activación de linfocitos T CD8⁺ y sCD14) de manera independiente, en el análisis multivariado no se encontró que estos parámetros jueguen un papel en la cantidad circulante de las citocinas proinflamatorias. Sin embargo, aunado a los resultados anteriores, se encontró que los niveles de TNF- α e IL-1 α son dependientes de la cantidad de IL-10 y, en el caso de IL-1 α también de la cantidad de IP-10. Estos resultados, junto con las asociaciones observadas para IL-10 e IP-10 apoyan un modelo de desregulación inmunológica que afecta directamente a la activación de poblaciones leucocitarias así como a diversos factores solubles de que incrementan o controlan la inflamación.

Panorama global de la inflamación y activación en la infección por VIH-1

Como un análisis final que englobe el estado inflamatorio y de activación asociado a la progresión por VIH-1, se realizó un *heat map* incorporando las variables que mostraron los

resultados más interesantes (Figura 6.26). Se pueden observar patrones de asociación de variables en los diferentes grupos de progresión. En particular, se encuentra un grupo de asociación de activación de DC plasmacitoides, células NK (todas las subpoblaciones), linfocitos T CD8⁺, y citocinas como IL-10, TNF- α , IP-10 e IL-1 α en individuos crónicos y en SIDA, que no se encuentran tan elevados en donadores sin VIH-1 y en controladores élite y virémicos. En el grupo TAR⁺, el porcentaje de DC plasmacitoides CD86⁺ y la cantidad de IL-10 e IL-1 α disminuyeron aún por debajo de los valores encontrados en donadores sin VIH-1. Por el contrario, las frecuencias de linfocitos T CD8⁺ y células NK CD56^{bright} CD16⁻ y CD56^{dim} CD16⁺ se mantuvieron elevadas junto con los niveles de TNF- α e IP-10 a pesar del TAR.

Por otra parte, citocinas como IFN- γ , TNF- β , IL-15, MIP-1 α e IL-17 se agruparon en donadores VIH-1 y fueron más abundantes que en las personas con VIH-1. De manera interesante, los valores más bajos de estas citocinas se encontraron en las personas con TAR.

Otro resultado sobresaliente es la diferencia entre los patrones que se observan entre controladores élite y controladores virémicos. El mapa sugiere que los controladores tienen, en general, menores concentraciones de citocinas proinflamatorias y frecuencia de células activadas que los controladores élite y aún por debajo del grupo control. Estos datos muestran que, aunque ambos grupos mantienen niveles más bajos de activación que los progresores y mantienen CVs bajas en ausencia de tratamiento, la diferencia en la viremia circulante parece tener un efecto en los patrones inflamatorios. Además, es interesante que cada grupo de individuos es similar al grupo control, pero de manera independiente con base en diferentes variables.

Este análisis permite realizar un primer enfoque general de posibles perfiles inflamatorios y de activación que se observan en individuos sin VIH-1 y en personas con VIH-1 con diferentes características clínicas. Las diferencias de patrones observadas entre los grupos sugieren ciertas asociaciones entre variables que, en conjunto y en combinación con marcadores clínicos de progresión (CV y cuentas de linfocitos T CD4⁺), podrían utilizarse en la clínica para un mejor seguimiento de las personas con VIH-1.

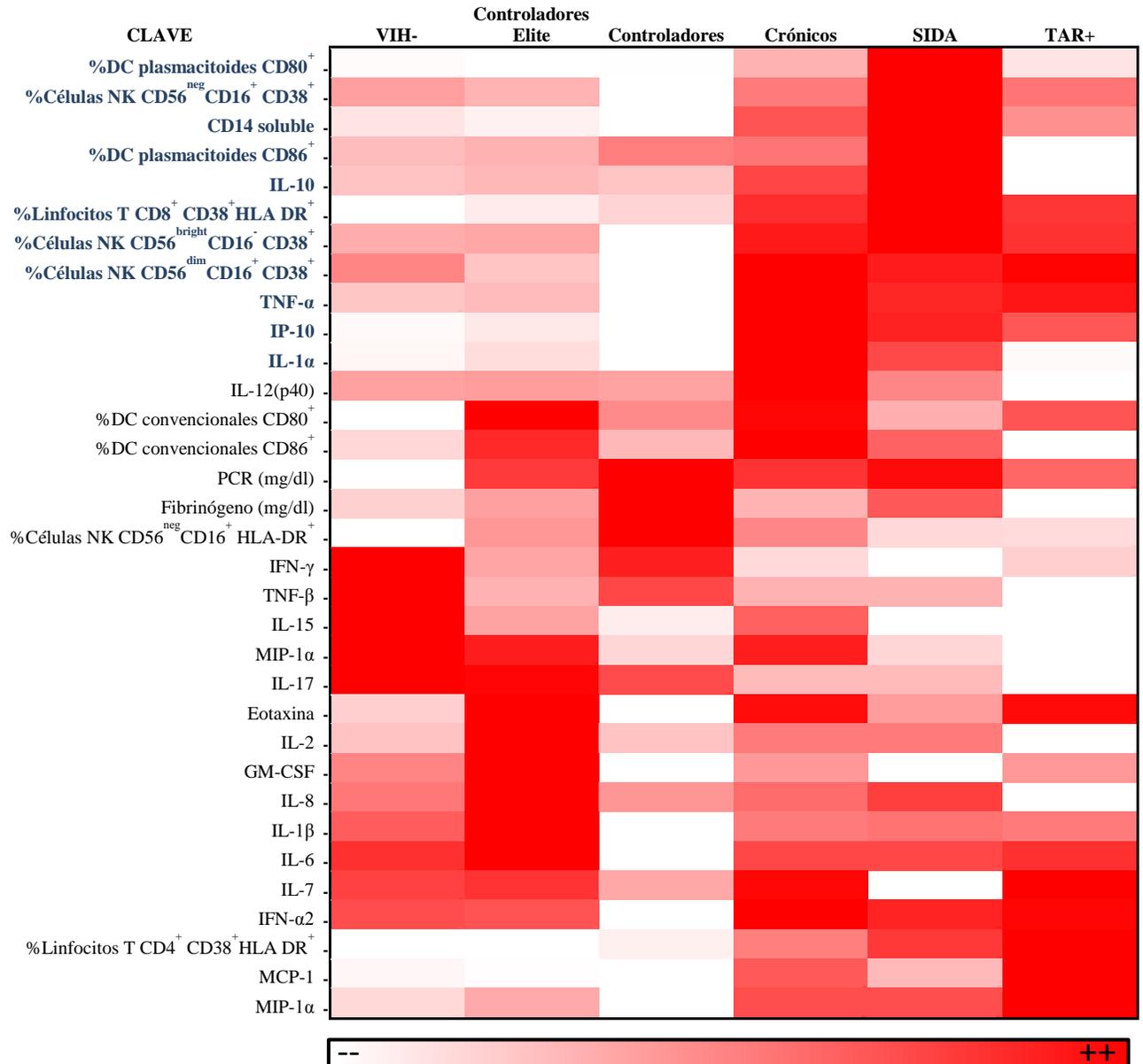


Figura 6.26. Heat map de los marcadores de activación en leucocitos y de inflamación en personas con VIH-1 y donadores sin VIH-1. Para cada variable se indica en color blanco el valor más bajo y rojo el más alto.

7. DISCUSIÓN

Se ha propuesto que diversos factores pueden estar asociados con la progresión de la infección por VIH-1 a SIDA [203]. Entre ellos se encuentran la posibilidad de tener virus defectuosos incapaces de replicar o infectar eficientemente [204, 205], los efectos protectores de células citotóxicas (NK y linfocitos T CD8⁺) asociados a la expresión de moléculas HLA y receptores [59, 145, 206-209] y la conservación de células T CD4⁺ tanto en capacidad de proliferación como de recambio y mantenimiento [210]. Aún hay mucha controversia en el papel que juega la activación inmunológica de células innatas en la progresión de la enfermedad por VIH-1, así como la caracterización de perfiles inflamatorios y de activación en personas que controlan la viremia de manera natural. Aunque se sabe que los controladores muestran marcadores de inflamación asociados con la activación inmunológica persistente [211], no se ha caracterizado completamente el papel que esta activación, el entorno inflamatorio y la translocación bacteriana juegan en el control de la viremia en estos individuos.

En este trabajo se caracterizó la expresión de TLRs, receptores cuya estimulación está asociada a la producción de citocinas que pudieran estar involucradas en la activación *bystander* de linfocitos T, asociada con la inmunopatogénesis de la infección por VIH-1. También se identificaron fenotipos característicos de individuos controladores y progresores, así como citocinas que podrían estar asociadas con la progresión de la infección.

7.1 La infección por VIH-1 afecta la frecuencia de poblaciones leucocitarias

De acuerdo con reportes anteriores, se encontró un cambio en la frecuencia de todas las poblaciones leucocitarias estudiadas [19, 42, 116, 172, 175, 212, 213]. Los individuos en SIDA tuvieron menor frecuencia de DC convencionales y plasmacitoides, células NK CD56^{dim} CD16⁺ y linfocitos T CD4⁺ en comparación con los donadores sin VIH-1. Se encontró que la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ y las células NK CD56⁻ CD16⁺ aumentó, ambos fenómenos característicos de la infección avanzada por VIH-1. El cambio en la frecuencia de las poblaciones mencionadas correlacionó con los marcadores clínicos de progresión a SIDA, lo que muestra que la infección por VIH-1 no solo afecta los blancos

directos del virus (linfocitos T CD4⁺ y DC CD4⁺), sino también a otras poblaciones celulares cuyo papel efector contribuye al control de la viremia.

7.2 Expresión diferencial de TLRs en poblaciones leucocitarias

Los TLRs pueden ser estimulados por diversos ligandos propios del VIH-1 o de productos bacterianos translocados [38, 86, 91-94, 166, 214]. Además, se ha observado que hay un cambio en la expresión TLRs en células que funcionan como posibles reservorios del VIH-1 como linfocitos T CD4⁺, macrófagos y DC [215-217]. Otros estudios han evaluado la capacidad de los TLRs para modular la replicación del virus, así como la regulación de los TLRs durante la infección [87]. Además, se ha reportado que la estimulación por TLRs puede incrementar la producción de citocinas en PBMC totales [218] o aumentar la transmisión del VIH-1 a DC y linfocitos T CD4 [219].

En personas con VIH-1, se han reportado diversas alteraciones en la expresión de TLRs [87, 218-220], lo que apunta a que durante la infección crónica, las señales proinflamatorias pueden afectar la replicación viral [221]. Estos datos sugieren que la expresión, estimulación y respuesta de los TLRs juega un papel importante en la progresión de la infección y posiblemente en la activación inmunológica.

Expresión de TLRs en donadores sin VIH-1

Existen pocos reportes que han caracterizado la expresión de TLRs en poblaciones leucocitarias, y la mayoría de ellos se enfocan en el análisis de mRNA [83, 87]. Hornung *et al*, reportó la expresión de mRNA de TLRs en poblaciones leucocitarias cuyo papel principal no es la presentación antigénica en donadores sin VIH-1. En particular, encontraron que TLR5, TLR6 y TLR9 están expresados de manera abundante en linfocitos T y células NK, aunque no en niveles tan altos como en monocitos, células B y DC [83]. Sin embargo, en esta publicación no se caracterizó la expresión de los TLRs en subpoblaciones específicas de linfocitos T y células NK. Los análisis de citometría de flujo realizados en esta tesis mostraron que las células NK CD56^{bright} CD16⁻ de donadores sin VIH-1 presentaban porcentajes mayores de células TLR3⁺ y TLR9⁺ que las CD56^{dim} CD16⁺, mientras que hubo mayor frecuencia de células TLR6⁺ en las CD56^{dim} CD16⁺.

También se encontró que existe expresión basal de los TLRs analizados en linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, y TLR2 fue el receptor menos abundante en estas subpoblaciones. De acuerdo con lo reportado en mRNA, la expresión de TLR6 en membrana fue de las más abundantes tanto en NK como en linfocitos T en comparación con los otros TLRs analizados.

Modificación de la expresión de TLRs en individuos con VIH-1

La infección por VIH-1 puede afectar la expresión y señalización por TLRs debido a que el virus puede directamente estimular a TLR7/8 [38, 86, 90] o indirectamente mediante la alteración del entorno inmunológico y la exposición a co-infecciones y translocación bacteriana [91, 222]. Por ello, la interacción de TLRs y patógenos o productos bacterianos translocados podría jugar un papel indirecto en la regulación de la enfermedad asociada a VIH-1 y la progresión. Además, se ha reportado que la estimulación a través de TLRs en ratones induce activación inmunológica y daño al tejido linfoide, semejante a lo que ocurre en la patogenia inducida por VIH-1 [223]. Dado lo anterior, es razonable esperar que la infección por VIH-1 pueda estar asociada a cambios en la expresión de TLRs. Existe un solo reporte en el que se ha medido la expresión de TLRs en individuos con VIH-1 [87]. En ese trabajo, realizado en mRNA de PBMC totales, se encontró que la expresión de mRNA de TLR 1, 5, 9 y 10 fue similar entre los donadores sin VIH-1 y los individuos con VIH-1, independientemente del estado de la infección. Los TLRs 6, 7 y 8 se encontraron incrementados en progresores crónicos. Además, también observó mayor expresión de TLR2, 3 y 4 en individuos en SIDA. Dados estos resultados, se esperaba que al analizar la expresión de TLRs en nuestra cohorte de estudio se encontrarían niveles incrementados de estos receptores con respecto a los donadores sin VIH-1. Sin embargo, en análisis por qRT-PCR en PBMC totales solamente se encontró incremento de TLR3 y TLR8 en progresores crónicos en comparación con controladores, y de TLR4 en controladores y crónicos en comparación con controladores elite. Las diferencias observadas con los resultados antes publicados podrían deberse a la diferencia en las características de las cohortes. En la publicación de Lester *et al* el grupo de estudio se conformó únicamente por mujeres de origen africano, mientras que en este trabajo se incorporaron ambos géneros y los grupos de progresores crónicos y con SIDA estuvieron conformados mayoritariamente por hombres

mexicanos. Otro punto a considerar es que en este trabajo sí se controló para la presencia de enfermedades oportunistas o infecciones activas en los participantes. Ninguno de los participantes de este estudio se presentó con enfermedad evidente en el momento de la toma de muestra. Por el contrario, en la publicación mencionada no se hace referencia a la presencia de enfermedades oportunistas ni co-infecciones asociadas a la enfermedad por VIH-1. Siendo que tanto el VIH-1 como productos bacterianos translocados u otros antígenos derivados de co-infecciones pueden afectar la expresión de TLRs en diferentes poblaciones celulares [38, 84, 86, 166], la presencia de co-infecciones y enfermedades oportunistas en la población africana estudiada en el trabajo de Lester *et al* podría ser un factor importante que hubiera afectado la expresión de estos receptores y la discordancia entre los resultados publicados y los que se encontraron en este trabajo.

Los análisis de qRT-PCR realizados en esta tesis muestran que las principales diferencias se observaron en la expresión de TLR3, TLR4 y TLR8. TLR4 reconoce a LPS y TLR8 a ssRNA, ambos ligandos presentes en la infección por VIH-1. De manera interesante, también se encontraron diferencias en los niveles de TLR3 en progresores crónicos. Aunque no se han identificado ligandos de este receptor en la infección por VIH-1, su ligando dsRNA se genera como intermediario viral universal durante la mayoría de los procesos de replicación viral [224], por lo que productos de VIH-1 podrían ser reconocidos por este receptor.

Siendo que el análisis de PBMC totales para la expresión de mensajero fue diferente a los resultados esperados y no discrimina entre las diversas poblaciones celulares, se continuó con la cuantificación de la expresión de TLRs en la superficie de DC, células NK y linfocitos T. Como se mencionó en la sección de Resultados, la expresión de cada TLR fue distinta en cada una de las subpoblaciones estudiadas, por lo que no fue posible identificar patrones de expresión característicos para cada receptor. Es importante mencionar que la mayoría de las publicaciones reportan la expresión de TLRs con base en su capacidad de respuesta a los ligandos o a agonistas o en la expresión de mRNA. Pocos reportes muestran resultados de citometría de flujo para estudiar la expresión de estos receptores [221, 225-227]. Esto puede deberse a la poca disponibilidad de anticuerpos de citometría de flujo para la detección de estos receptores. Un punto a considerar en los resultados de citometría de

flujo de este trabajo es que la expresión de algunos TLRs pudo haberse detectado en mayor proporción que otros debido a la variación en la señal de los fluorocromos utilizados con cada anticuerpo. Por ejemplo, aparentemente TLR6 fue el más abundante en todas las poblaciones celulares estudiadas en comparación con otros TLRs. Sin embargo, el anticuerpo que se utilizó en los paneles para la detección de este receptor estaba conjugado con biotina y requería tinción secundaria con estreptavidina. Se conoce que los anticuerpos biotinilados dan señales más altas que los directos, por lo que se debe interpretar cuidadosamente la comparación entre la proporción de células que expresan uno u otro TLR.

Solamente existe una publicación que reporta la expresión de TLRs en linfocitos por citometría de flujo en personas con VIH-1 [227]. Este estudio se realizó en linfocitos T, y se midió la expresión de TLR3, 4, 8 y 9. Encontraron que el 74% de los individuos analizados expresaron TLR3, y el 100% fueron TLR4⁺, mientras que todos sus controles sin VIH-1 resultaron negativos para ambos receptores. Estos resultados son contrastantes con los de esta tesis, ya que aquí se reporta la expresión de TLR3 y TLR4 en linfocitos T tanto de donadores sin VIH-1 como de personas con VIH-1, y la frecuencia de linfocitos T TLR3⁺ (tanto CD4⁺ como CD8⁺) fue menor al 60% en todos los grupos sin TAR. Las diferencias observadas pueden deberse a las diferencias en las cohortes (CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, presencia de enfermedades oportunistas), y en los anticuerpos utilizados para medir la expresión de los TLRs. En la publicación se estudió un total de 50 individuos con VIH-1, de los cuales 12 tenían cuentas de linfocitos T CD4⁺ mayores a 500 células/ μ l, 21 entre 200-500 células/ μ l y 17 se encontraban en SIDA. Los resultados reportados en ese artículo incorporaron a todos los individuos sin diferenciar etapas de la infección por VIH-1. La cohorte estudiada en esta tesis incluyó dentro del grupo de progresores crónicos a 13 individuos con cuentas de linfocitos T CD4⁺ mayores a 500 células/ μ l, 26 con entre 200-500 células/ μ l y 18 personas en SIDA. Aunque las cohortes parecen incluir individuos con características similares, el trabajo de Sanders *et al* mencionado no detalla las CV de los individuos estudiados, si alguno de ellos era controlador ni la presencia de enfermedades oportunistas. Como se mencionó anteriormente, estos factores podrían afectar la expresión de TLRs de manera diferencial entre cohortes y afectar los resultados observados.

Por otra parte, se han publicado dos estudios que midieron la expresión de TLR2 y 4 en DC por citometría de flujo [221, 226]. En estos trabajos se analizaron células *ex vivo* o DC derivadas de macrófagos en cultivo, respectivamente. En el estudio de Hernández *et al*, 2011 mostraron que la presencia de enfermedades oportunistas en personas con VIH-1 incrementó la presencia de TLR2 y 4 en DC convencionales y monocitos. Los resultados de esta tesis no mostraron un incremento significativo en la expresión de TLR2 en progresores (crónicos ni SIDA) en comparación con donadores sin VIH-1 y, en el caso de TLR4, se encontró un incremento en crónicos y una disminución en personas con SIDA en comparación con los controles. En la publicación mencionada no se hizo una distinción entre personas con SIDA y progresores crónicos, aunque su población de personas con enfermedades oportunistas está enriquecida en personas con cuentas de linfocitos T CD4⁺ bajas. Es importante recalcar que la mediana de linfocitos T CD4⁺ en ese trabajo fue de 130 células/ μ l en personas con enfermedades oportunistas y de 330 células/ μ l en personas sin enfermedades oportunistas. En esta tesis las medianas de linfocitos T CD4⁺ fueron de 33 células/ μ l ó 331 células/ μ l para los grupos en SIDA y progresores crónicos, respectivamente, y ningún individuo tuvo enfermedades oportunistas aparentes. Dado que se demostró que la presencia de enfermedades oportunistas afecta significativamente la expresión de TLR2 y TLR4, las diferencias entre las cohortes y la ausencia de enfermedades oportunistas en esta cohorte explica la discordancia entre los resultados en la expresión de estos receptores. Otro punto que se debe considerar es que en ambas publicaciones de Hernández *et al* [221, 226] se analizó la expresión por intensidad de fluorescencia, mientras que en esta tesis se analizaron porcentajes de células TLR⁺, y no cantidad de expresión. Dado que son mediciones diferentes, cada una aporta información distinta y podría o no ser complementaria, dependiendo de las condiciones de la cohorte estudiada.

Otra consideración que podría explicar las diferencias encontradas en otros trabajos y los resultados que se muestran en esta tesis es la diferencia metodológica. En la publicación de Sanders *et al* [227] se realizó la tinción en sangre total, utilizando anticuerpos de la marca Imgenex. En esta tesis la tinción de citometría se realizó sobre PBMC purificadas y se utilizaron anticuerpos de la marca eBiosciencias. Tanto la manipulación diferente de la sangre para la realización de la tinción como la calidad de los anticuerpos de las diferentes

marcas podría causar las discordancias entre los resultados mostrados. Para poder realizar una comparación adecuada, sería necesario validar la técnica utilizando los reactivos de ambas casas comerciales en alguna línea celular que exprese de manera constitutiva a los TLRs de interés. En las dos publicaciones de Hernández *et al* [221, 226] se realizaron tinciones con PBMC totales purificadas por gradiente de densidad de manera similar a lo que se hizo en este trabajo. Sin embargo, en esta tesis, además, se realizó una permeabilización y tinción intracelular posterior que podría afectar la señal de algunos anticuerpos conjugados en comparación con la tinción extracelular simple utilizada en las publicaciones citadas. Los anticuerpos utilizados en los artículos y en esta tesis son de la marca eBiosciences, pero los fluorocromos acoplados a los anticuerpos son diferentes. Como se ha mencionado, algunos fluorocromos tienen mayor señal que otros y, tanto el uso de anticuerpos conjugados a diferentes fluorocromos como la interacción entre señales de distintos anticuerpos conjugados (dependiente de los paneles utilizados), podrían explicar las diferencias entre los resultados publicados y los que se encontraron en este trabajo.

La capacidad de respuesta de poblaciones celulares a la estimulación por TLRs así como su papel en la protección ante la infección son controversiales. Experimentos han mostrado que la estimulación por TLRs induce la expresión de CD80 en DC plasmacitoides en personas con VIH-1 sin TAR [221]. Otros reportes muestran que la estimulación de DC convencionales y DC plasmacitoides de personas con VIH-1 con ligandos de TLR3 y TLR7, respectivamente, induce la expresión de moléculas co-estimuladoras (HLA-DR) y producción de IL-6, pero éstas son poco eficientes en la activación de linfocitos T naïve [228]. Sin embargo, otros estudios reportan que las DC de personas con VIH-1 tienen menor capacidad de respuesta (marcadores de activación y maduración) a ligandos de TLRs en comparación con donadores sin VIH-1 [229]. Los resultados de citometría de flujo en la expresión de TLR en esta tesis muestran que sólo las frecuencias de DC convencionales y linfocitos T CD4⁺ TLR4⁺ correlacionan con la activación de DC convencionales (CD80). Estos datos sugieren que la expresión de TLRs en subpoblaciones no necesariamente está asociada con un cambio en la expresión de marcadores de activación en la población celular correspondiente. Sin embargo, sería necesario realizar experimentos de estimulación directa

de dichas subpoblaciones celulares con ligandos de TLR 4 (u otros receptores de interés) para analizar si la estimulación a través de este receptor resulta en la sobreexpresión de marcadores de activación de manera directa, o como consecuencia de la producción de citocinas en otras poblaciones.

Un estudio en simios (macacos *rhesus*) mostró que la estimulación por TLRs en células linfoides y del sistema nervioso central puede inducir cambios fenotípicos en células CD8⁺ asociados a progresión rápida de la infección por SIV [230]. También se ha reportado que estimulación de DC plasmacitoides o convencionales con ligandos de TLRs expuestas a VIH-1 aumenta la respuesta de linfocitos T de memoria autólogos mediante la producción de citocinas [231]. En tejido linfoide, se observó que los agonistas de TLRs inducen la respuesta anti-VIH-1 de linfocitos T CD8⁺ y células NK a través de la estimulación de DC [98]. Lo anterior, aunado a los resultados de citometría de flujo de este trabajo, sugiere que la variabilidad en la expresión de TLRs, aunque no afecta directamente a la activación de la subpoblación que lo expresa, puede tener efectos en otras subpoblaciones celulares. En particular, la expresión de TLRs en DC puede inducir su activación y la producción de diversas citocinas que tienen efectos en la respuesta antiviral de células NK y linfocitos T. Por otra parte, es importante considerar que las observaciones mencionadas se han hecho principalmente en células de tejido linfoide y los resultados que se presentan en esta tesis son de células de sangre periférica. Es muy posible que la diferencia en la ubicación anatómica de las células estudiadas en cada caso también afecte la expresión de los TLR en las diferentes subpoblaciones celulares estudiadas.

TLR2 y TLR4

Se ha reportado que la estimulación por TLR2 en PBMC totales de individuos con VIH-1 induce la producción de citocinas como MIP-1 α e IL-8 [218]. En mastocitos, la estimulación por TLR2 con peptidoglicano induce un aumento de la replicación de VIH-1 [222, 232]. Concretamente en linfocitos T, se ha reportado que TLR2 se expresa como una molécula co-estimuladora [225]. En un modelo de infección *in vitro* se observó que agonistas de TLR2 (zymosan y Pam3CSK4) inhiben la replicación de VIH-1 en macrófagos derivados de monocitos. Además, el tratamiento con los agonistas de TLR2 pre-infección

inhibe la infección de virus en macrófagos, e induce la producción de β -quimiocinas e IL-10. Estos resultados sugieren que la estimulación directa de TLR2 en macrófagos aumenta la resistencia a la infección por VIH-1 y controla la replicación viral [233]. Dado lo anterior, sería razonable esperar una mayor expresión de TLR2 en personas que controlan la infección (controladores virémicos y élite) como mecanismo de control de la viremia, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de este TLR en ninguna de las poblaciones celulares estudiadas, independientemente de su capacidad de control de la viremia o del TAR. Además, la frecuencia de células TLR2⁺ no se vio asociada con CV ni cuentas de linfocitos T CD4⁺, ni con otros marcadores inflamatorios, en concordancia con publicaciones anteriores [221]. Así, en este estudio no fue posible observar una asociación de la expresión de este receptor con la progresión de la infección, activación e inflamación. Sin embargo, es necesario considerar que en esta tesis solamente se midió la expresión de TLR2 en las poblaciones celulares, pero no su capacidad de respuesta a ligandos ni su vía de señalización. En las publicaciones mencionadas [218, 222, 225, 232], se asume expresión del receptor con base en la capacidad de respuesta de las células a sus ligandos. Sin embargo, el hecho de no haber encontrado diferencias entre grupos en la expresión de TLR2 en este estudio, no es necesariamente indicativo de que: 1) las células tengan la misma capacidad de respuesta ante los ligandos de TLR2 *in vivo*, aunque aparentemente tienen niveles de expresión similares, y 2) que aunque los niveles de expresión son similares, las vías de señalización se conservan intactas y permiten una adecuada respuesta al estímulo por este TLR.

Diversos estudios han propuesto la modulación de la expresión de TLRs como un mecanismo que promueve la replicación del VIH-1 o la progresión a SIDA en individuos con VIH-1 [221, 226]. Algunos trabajos muestran que la expresión de TLRs en células de la inmunidad innata se incrementa en individuos con VIH-1 con viremia alta y co-infectados con patógenos oportunistas [226]. Otros estudios reportan que las DC convencionales de individuos con VIH-1 tienen mayor expresión de TLR2 y TLR4 en comparación con donadores sin VIH-1 y estos porcentajes son menores que en las personas con TAR [221]. De acuerdo con este reporte, los resultados de citometría de flujo en este

trabajo muestran un incremento en la proporción de DC convencionales TLR4⁺ en progresores crónicos en comparación con donadores sin VIH-1, y este porcentaje disminuye con el TAR. Es interesante, sin embargo, que también en los controladores élite se observó un incremento en la frecuencia de las células que expresan TLR4, y estos individuos presentan características inmunológicas y virológicas muy diferentes al grupo de progresores. Un estudio mostró que la estimulación con agonistas de TLRs en células de tejido linfoide puede inducir la respuesta anti-VIH-1 mediante la producción de factores solubles (IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES) en la infección aguda o estimular la producción de nuevos viriones en células con infección latente [97]. Los resultados de este estudio indican que la respuesta a la estimulación por TLRs varía de acuerdo al estado de infección de las células, por lo que es razonable pensar que la expresión elevada de TLRs en controladores élite y progresores crónicos tiene un efecto diferente en la respuesta observada entre grupos de estudio. Cabe recalcar que la expresión de los TLRs 2 y 4 no correlacionó con citocinas inflamatorias, activación ni marcadores de progresión en ninguna de las subpoblaciones celulares estudiadas en esta tesis.

TLR4 es un receptor particularmente interesante durante la infección por VIH-1, debido a que su ligando LPS es uno de los principales productos bacterianos translocados [91]. Estudios en tejido gastrointestinal de ratones muestran que las DC de intestino expresan significativamente menos mRNA de TLR4 en comparación con otros TLRs, lo que las hace menos susceptibles a ser activadas por la estimulación de este receptor, fenómeno denominado “tolerancia al LPS/endotoxina” [234]. Por lo anterior, sería razonable esperar que los individuos con infección avanzada tuvieran una menor expresión de TLR 4, asociada al incremento de LPS en circulación (en este trabajo, medido indirectamente por sCD14 en plasma). Contrario a lo esperado, la frecuencia de DC convencionales TLR4⁺ se vio incrementada en los individuos en SIDA en comparación con los donadores sin VIH-1. Sin embargo, dado que la tolerancia al LPS es importante para la prevención de respuestas inflamatorias exacerbadas [235], es de esperarse que haya una señalización pro-inflamatoria disminuida cuando hay exposición repetida o crónica al LPS [220]. Por ello, es posible que aunque no se haya observado una disminución en la expresión de TLR4, la

respuesta al estímulo por este receptor no sea tan eficiente como en individuos sin VIH-1. Un ejemplo de esto es que la frecuencia de DC convencionales TLR4⁺ correlacionó negativamente con IL-1 β , una de las principales citocinas proinflamatorias. En el caso de las células NK disfuncionales CD56⁻ CD16⁺, a pesar de no encontrar diferencias entre las subpoblaciones, la frecuencia de células TLR4⁺ correlacionó positivamente con la cantidad de sCD14. Estos datos resultan interesantes ya que esta población está incrementada en individuos con infección avanzada -al igual que los niveles de sCD14- ambos fenómenos asociados con la progresión de la enfermedad por VIH-1.

La unión de TLR4 con su ligando induce la producción de citocinas pro- y anti-inflamatorias como TNF- α e IL-10 en monocitos de personas con VIH-1 [236]. Un hallazgo interesante es que la inducción de la producción de citocinas y activación inmunológica no solamente ocurre por la presencia del LPS translocado, sino como efecto directo de proteínas virales sobre los TLRs. Se ha reportado que la glicoproteína de VIH-1 gp120 induce la activación inmunológica a través de TLR2 y TLR4 en células epiteliales del aparato reproductor femenino [237]. Además, la proteína Tat de VIH-1 interactúa físicamente con alta afinidad con el complejo TLR4-MD2 promoviendo la producción de TNF- α e IL-10, citocinas involucradas en la desregulación inmunológica observada en la infección por VIH-1 y progresión a SIDA [238]. Por esto, sería razonable esperar que la expresión de TLR4 en las poblaciones celulares estudiadas podría estar asociada a las cantidades plasmáticas de sCD14 (como marcador indirecto de los niveles de LPS en circulación) y/o a la CV, como posibles inductores de la producción de las citocinas que se encontraron elevadas en personas con VIH-1 en infección avanzada. Solo en el caso de las células NK disfuncionales se encontró una asociación entre la expresión de TLR4 con LPS, y la expresión de este receptor no correlacionó con CV en ninguna de las subpoblaciones. Además, y contrario a lo esperado, la frecuencia de células TLR4⁺ no se asoció con las citocinas mencionadas en ninguna de las poblaciones celulares. Será interesante realizar análisis más detallados para cuantificar la producción de citocinas intracelulares específicamente para saber si las células que expresan este receptor son productoras de citocinas en los grupos estudiados, y si la CV y la translocación bacteriana afectan directamente su activación.

TLRs intracelulares

El caso de TLR3 resulta especialmente interesante, siendo que fue un receptor que se vio incrementado en DC convencionales y células NK CD56^{dim} CD16⁺ de individuos en SIDA. Aunque no se ha identificado un ligando específico para TLR3 en la infección por VIH-1, se sabe que TLR3 reconoce RNA de cadena doble, un intermediario generado durante la replicación viral [224]. Existen diversos trabajos que han estudiado el papel de la estimulación por TLR3 durante la infección por VIH-1. Se ha mostrado que el ligando artificial de TLR3 poly I:C estimula respuestas antivirales como la producción de IFN- α/β e induce la sobreexpresión del factor antiviral APOBEC3G [239-241]. Por otra parte, se ha observado que la activación de TLR3 inhibe diversas infecciones virales como herpes simplex [242], virus del West-Nile [243], hepatitis C [244] e influenza [245]. En un modelo de infección *in vitro* se encontró que el agregar agonistas de TLRs 3, 7, 8 y 9 redujo significativamente la infección en PBMC totales mediante la expresión de IFNs tipo I y tipo II. Sin embargo, el efecto anti-VIH-1 fue dirigido no solo por la activación de TLRs, sino por otros factores antivirales en las células infectadas [246]. Recientemente se demostró que la estimulación por TLR3 y 4 en macrófagos induce la expresión de microRNAs (factores restrictivos para la replicación del VIH-1) [224, 247]. Además, la estimulación con ligandos de TLRs (TLR3-RNA de cadena doble y TLR9-CpG) en DC y células NK inducen la activación inmunológica *bystander* de linfocitos T mediante la secreción de IFN- α/β e IFN- γ e inducen la producción de IFN- γ y TNF- α en células NK [248, 249]. Todos estos antecedentes muestran que la expresión de TLR3 en la infección por VIH-1 (y otras infecciones virales) juega un papel importante en la estimulación de la respuesta antiviral. La expresión de TLR3 en DC diferentes poblaciones celulares correlacionó con SCD14, citocinas inflamatorias y quimiocinas como IL-8, IL-12, IFN- γ , MIP-1 β , eotaxina y el TNF- β .

Se sabe que las células NK secretan grandes cantidades de IFN- γ en respuesta a estimulación con agonistas de TLR3 y TLR7 [250]. Aunque no se encontró una correlación entre la expresión de TLR3 en esta población y los niveles de IFN en plasma, sí se observó un incremento en la proporción de células NK CD56^{dim} CD16⁺ TLR3⁺ en personas en SIDA, así como una tendencia al incremento en las cantidades de IFN- γ en personas con infección avanzada. Esto resulta especialmente interesante porque esta subpoblación de

células NK es la más abundante en sangre periférica [110], y es la que se encuentra más activada en la infección avanzada por VIH-1. Además, la expresión de este receptor no solamente disminuyó con el TAR, sino que el porcentaje de células TLR3⁺ disminuyó con el tiempo de tratamiento en células citotóxicas (NK CD56^{dim} CD16⁺ y linfocitos T CD8⁺). Todos estos resultados sugieren que hay una asociación importante entre la expresión/estimulación de TLR3 con la viremia e inflamación observada durante la infección por VIH-1. Aunque no existen reportes en VIH-1, estudios en otras infecciones virales crónicas (HCV) muestran que el tratamiento y el control de la viremia induce la disminución de la expresión de TLRs en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ [251], similar a lo observado en linfocitos T CD8⁺ de personas con VIH-1. En este caso, también será necesario realizar estudios funcionales para analizar la capacidad de respuesta de diferentes poblaciones celulares de los individuos estudiados a la estimulación por TLRs y el efecto de estas respuestas en la activación inmunológica e inflamatoria. Otro estudio interesante será la identificación de los ligandos asociados a la infección por VIH-1, ya sean intermediarios de RNA de cadena doble producidos durante el ciclo de replicación o resultado de otro producto bacteriano o viral no descrito, que potencialmente están afectando la expresión y respuesta de TLR3.

El TLR9 reconoce DNA CpG bacteriano [84]. Se ha reportado su papel en la infección por VIH-1, implicado en el reconocimiento de motivos de DNA no metilado de virus y bacterias. Se ha identificado un polimorfismo de TLR9 que confiere protección ante la infección [100]. Además, se sabe que las DC plasmacitoides de controladores élite producen mayor cantidad de IFN- α al ser estimuladas con ligandos de TLR9 [252, 253]. De manera interesante, se encontró que los controladores élite tienen niveles similares de DC plasmacitoides TLR9⁺ a los de donadores sin VIH-1, y éstos son mayores a los que se observan en individuos crónicos y en SIDA. Además, la frecuencia de estas células correlacionó positivamente con las cantidades plasmáticas de IFN- α e IL-8 (citocinas proinflamatorias) y negativamente con IL-10 (anti-inflamatoria). Reportes indican que en células de tejido linfoide, la estimulación con el agonista de TLR9 (ODN M362) suprimió la replicación de VIH-1, mediante la inducción de MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IP-10 y

CXCL-12. [254]. De manera interesante, la frecuencia de DC plasmacitoides que expresan TLR9 y la cantidad de IP-10 en circulación correlacionaron negativamente en este trabajo. Sin embargo, es importante recalcar que las células utilizadas son de diferente origen, de tejido linfoide vs. sangre periférica. Por lo anterior, es posible que la alta frecuencia de células que expresan este receptor en controladores esté asociada con una mejor respuesta de estas células y a los efectos asociadas a la producción de IFNs tipo I.

TLR6

Finalmente, los resultados de expresión de TLR6 fueron interesantes debido a sus asociaciones con el entorno inflamatorio (correlaciones con citocinas y activación inmunológica). La única publicación que se refiere a este receptor en VIH-1 reporta un incremento generalizado en la expresión de mRNA de TLR6, e incorpora a PBMC totales [87], por lo que se incluyen otros tipos celulares que no fueron analizados por citometría de flujo en este trabajo. Los hallazgos en TLR6 resultan especialmente interesantes ya que no se ha descrito ningún ligando de este receptor asociado a la infección por VIH-1. Dadas las asociaciones encontradas con las citocinas plasmáticas, es posible que la expresión de este receptor sea una consecuencia indirecta del entorno inflamatorio. Además, TLR6 en diferentes poblaciones correlaciona negativamente con IL-1. Esto sugiere que pudiera ser un indicador más de la desregulación inmunológica observada en la infección por VIH-1, o que su expresión podría ser disminuida como efecto de regulación negativa ante el ambiente inflamatorio y así evitar que se continúe con la producción de citocinas proinflamatorias. De manera análoga a lo observado con TLR3, será necesario investigar la presencia de ligandos de TLR6 asociados a la infección por VIH-1 como potenciales causantes de activación *bystander* e inflamación.

Aunque se ha propuesto que la expresión y estimulación de TLRs es un posible factor determinante en la activación inmunológica generalizada observada en la infección avanzada por VIH-1 [92], los resultados de este trabajo no muestran una correlación directa entre cambios en la expresión de TLRs y la activación observada en la misma subpoblación y directamente sobre linfocitos T, ni con factores pro-inflamatorios determinantes.

Adicionalmente, el efecto del TAR contribuye al incremento de algunos TLRs y la disminución en otros dependiendo de la subpoblación estudiada. Sin embargo, y como se ha recalado antes, en esta tesis se analizó la expresión de los receptores sin medir su funcionalidad y la capacidad de respuesta de las células que los expresan. Entonces, los resultados obtenidos en este trabajo no soportan la hipótesis de que los TLRs están directamente asociados con la activación inmunológica observada durante la infección. Será necesario realizar más estudios que evalúen la capacidad de respuesta de diferentes poblaciones celulares ante ligandos de TLRs y si las citocinas producidas como consecuencia son suficientes para inducir un fenotipo activado en linfocitos T y otras células inmunológicas.

7.3 Activación inmunológica

Activación de células NK como un nuevo marcador progresión en la infección por VIH-1.

En este trabajo mostramos evidencias de que la activación de células NK, medida con CD38 y HLA-DR, es un fuerte parámetro predictivo de la progresión de la enfermedad por VIH. En particular, mostramos que la expresión de CD38 en células NK está asociada con marcadores de progresión a SIDA. Nuestros resultados sugieren que la activación de células NK es principalmente dirigida por el estado inmunológico del paciente (cuentas de linfocitos T CD4⁺), pero también está afectada por la viremia, inflamación y activación de otras poblaciones del sistema inmunológico (innato y adaptativo).

La mayoría de los estudios en células NK se han enfocado en la expresión de receptores de citotoxicidad natural (NKp44, NKp30, NKp46), CD94-NKG2A/C e inhibidores de citotoxicidad (KIR, por sus siglas en inglés) en diferentes etapas de la infección [42, 116, 156, 255-258]. Reportes más recientes han mostrado los cambios en la expresión de marcadores de activación, que normalmente se incrementan en los linfocitos T de progresores, en células NK [156, 255-260]. Estos estudios se han centrado en la expresión de CD69 y HLA-DR como marcadores de activación temprana o crónica, respectivamente, y no en CD38. Solamente Litchfuss y colaboradores analizaron la co-expresión de CD38 y HLA-DR en células NK de progresores. Nuestro estudio enfatiza el incremento en la expresión de CD38 en células NK, particularmente en la subpoblación CD56^{dim} CD16⁺, en

etapas avanzadas de la infección por VIH y su asociación con linfocitos T CD4⁺, el principal indicador de progresión de la enfermedad. Además, estudios previos han mostrado resultados contradictorios con respecto a las asociaciones entre la activación de células NK (frecuencia de células HLA-DR⁺ o CD38⁺ HLA-DR⁺), con la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺ y translocación bacteriana (LPS y SCD14) [191, 256, 260]. Es importante recalcar que estos estudios han analizado a individuos controladores y progresores de manera independiente, y que las características de las cohortes en cada estudio (incluyendo la etapa de la infección) varían considerablemente entre ellos y en comparación con el nuestro.

En este estudio se mostró que la subpoblación de células NK CD56^{dim} CD16⁺ tiene el mayor nivel de activación, alcanzando en algunos casos más del 99% de células CD38⁺, tanto en frecuencia como en cantidad de expresión. La activación de esta subpoblación correlacionó fuertemente con la progresión de la enfermedad, mediada por cuentas de linfocitos T CD4⁺ y CV, activación de linfocitos T, translocación bacteriana e inflamación. Aunque la subpoblación de células NK CD56^{bright} CD16⁻ también se encontró activada, el nivel de activación no fue tan alto como el observado en las CD56^{dim} CD16⁺ y las correlaciones fueron más débiles. Este fenómeno es similar a lo que se observa en la activación de linfocitos T, donde los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos están más activados y tienen correlaciones más fuertes con cuentas de linfocitos T CD4⁺ y CV, que los linfocitos T CD4⁺ inmunomoduladores [61]. Las frecuencias de células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺ y HLA-DR⁺ también fueron mayores en individuos con SIDA. Sin embargo, no se encontraron asociaciones entre la co-expresión de CD38 y HLA-DR con sCD14 de manera independiente ni en el modelo multivariado.

Aunque observamos una frecuencia elevada de células NK CD38⁺, la proporción de CD69⁺ (marcador de activación temprana) fue menor y no significativamente diferente. Esto sugiere que la activación de células NK podría resultar de la inflamación crónica derivada de la infección por VIH (causada por la viremia, ambiente inflamatorio, citocinas y translocación bacteriana) y no por una estimulación *de novo*, similar a lo que ocurre con la activación de linfocitos T. Como es bien conocido, la presencia crónica del VIH y la respuesta inmunológica continua induce un fenotipo de activación y agotamiento en

linfocitos T CD8⁺ citotóxicas. Sería interesante investigar si el fenotipo activado que se observa en células NK también está asociado con su disfuncionalidad (con respecto a producción de citocinas, citotoxicidad, capacidad de respuesta a estímulo por citocinas) que pudiera afectar el control de la viremia la progresión de la infección.

Estudios previos han mostrado que la infección virémica por VIH está asociada con cambios en las subpoblaciones de células NK y con el incremento en la actividad de estas células en presencia de células blanco [133]. Por ello, es posible que las células NK que tienen mayor expresión de marcadores de activación sean una consecuencia de la respuesta inmunológica persistente contra las células crónicamente infectadas por VIH. Además, las células NK de individuos con VIH pueden ser activadas *in vitro* por RNA derivado de VIH, lo que sugiere que su activación podría estar mediada por ligandos de TLRs [38]. Dado lo anterior, una posible explicación para el incremento en la activación de células NK en personas con VIH con infección avanzada es el efecto directo de la viremia alta. Si este es el caso, como la CV en controladores avirémicos, controladores virémicos y personas con TAR es significativamente menor que en progresores y SIDA, se esperaría que la activación de células NK en estos individuos también fuera significativamente menor.

Diversos trabajos han mostrado que solamente entre el 2-4% de las células NK de individuos con VIH son capaces de producir IFN- γ y del 1-25% tienen capacidad citotóxica contra células blanco [133, 153, 161, 213]. Nuestros resultados muestran que más del 50% de las células NK expresan CD38, lo que sugiere que la activación podría estar dada por efectos indirectos como la estimulación por citocinas y/o la translocación de productos bacterianos, y no por la respuesta directa a la infección por VIH. Además, nuestros resultados – y otros publicados previamente [256]– muestran que se mantiene la activación residual en las células NK aún después del control de la viremia con TAR, lo que sugiere que otros factores además de la viremia pueden causar la activación de células NK. En congruencia con esta hipótesis, encontramos que la cantidad plasmática de IL-15 e IP-10 (involucradas en activación y proliferación de células NK) y TNF- α (producido por células NK activadas y otras células inmunológicas), correlacionaba con la frecuencia de células NK CD38⁺. Asimismo, encontramos una asociación entre la cantidad de células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺ con la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, activación de linfocitos T

y SCD14 y las citocinas mencionadas. Es importante recalcar que estas asociaciones se mantuvieron independientemente de la presencia de otras infecciones virales (CMV y HHV-8), que también podrían afectar la activación de células NK. Estos resultados sugieren que existe una importante asociación entre el entorno inflamatorio elevado que se observa en los individuos con SIDA y la activación de células NK, de manera análoga a la activación indirecta observada en linfocitos T durante la infección por VIH [61, 91], independientemente de la presencia de co-infecciones. Interesantemente, cuando se consideraron todos los factores mencionados como posibles causas de la activación de células NK en un modelo multivariado, encontramos que las cuentas de linfocitos T CD4⁺ tienen el mayor efecto en dicha activación. Estos datos apoyan la hipótesis de que el estado inmunológico del paciente y el avance de la infección inducen la activación de las células NK. Esta observación también sugiere que la expresión de CD38 en células NK, en particular en la subpoblación citotóxica, podría considerarse como otro marcador de progresión de la infección.

No todos los marcadores de inflamación están asociados con la activación de células NK, como IL-6 (y otras citocinas producidas por células NK activadas), fibrinógeno y CRP, lo que sugiere que estos factores no participan en el proceso de activación indirecta de células NK. Sin embargo, esta información se debe interpretar cuidadosamente, ya que las citocinas fueron medidas en plasma y no indican si estas asociaciones son causa o consecuencia de la activación de células NK.

Es muy posible que la combinación de la respuesta inmunológica crónica a la viremia de VIH y efectos indirectos del entorno inflamatorio y translocación bacteriana afecte la activación de células NK. Sin embargo, hemos mostrado que la expresión de CD38 en células NK es un factor fuertemente asociado con la progresión de la enfermedad (principalmente determinado por las cuentas de linfocitos T CD4⁺) y se puede utilizar como un nuevo factor de predicción de la progresión.

Una limitante en este estudio es su carácter transversal. Un análisis longitudinal que incluya a individuos en la etapa aguda/temprana de la infección y la caracterización del cambio secuencial en la activación de células NK con el avance de la enfermedad proveería información adicional acerca de los factores involucrados en el incremento de la activación

inmunológica innata, tanto la respuesta “reciente” a la viremia (expresión de CD69) como el efecto de la inflamación y respuesta crónica al virus (expresión de CD38 y HLA-DR). Sin embargo, es importante resaltar que la realización de estos estudios es cada vez menos factible debido a las implicaciones éticas y las guías oficiales que indican el inicio temprano del TAR.

La activación inmunológica y la inflamación van de la mano con la viremia persistente y la disminución en las cuentas de linfocitos T CD4⁺, lo que define un fenómeno inmunológico característico de la infección por VIH. Hemos demostrado que la expresión generalizada de marcadores de activación aumenta en individuos con VIH con viremia alta y, especialmente, en personas con SIDA. En particular, se encontró que CD38 es el marcador de activación más relevante y se expresa predominantemente en las células NK CD56^{dim} CD16⁺, la población más abundante en sangre periférica (aunque también está incrementado en las subpoblaciones CD56^{bright} CD16⁻ y CD56⁻ CD16⁺). Además, CD38 se encontró incrementado tanto en frecuencia como en cantidad de expresión en individuos con VIH, y la frecuencia de células NK CD38⁺ correlacionó con marcadores de progresión de la infección de manera independiente y en un modelo multivariado. Estos resultados sugieren que la expresión de CD38 en células NK puede utilizarse como indicador confiable para el seguimiento clínico de personas con VIH, y como un nuevo marcador predictivo del avance de la enfermedad.

Asociación entre la activación de DC y estado inmunológico de personas con VIH-1

Diversos trabajos han reportado cambios en las frecuencias de DC en sangre periférica de personas con VIH-1 tanto por infección directa del virus como por migración a nódulos linfoides [170, 172, 175]. Tanto las DC convencionales como las DC plasmacitoides pueden ser infectadas por el VIH-1 [261-265]. Sin embargo, el porcentaje de células infectadas es muy pequeño (<5%). Es importante considerar que, aunque hay una reducción en el número de DC circulantes, aquéllas que se mantienen en la sangre periférica son hiperfuncionales, lo que implica un posible papel de las DC en la inducción de la activación inmunológica crónica [172].

Aún es controversial si las funciones de las DC están alteradas durante la infección por VIH-1. Estudios han reportado que la infección por VIH-1 interfiere con la maduración de las DC convencionales de sangre periférica [229, 266, 267], mientras que otros estudios reportan que la función de DC convencionales no está afectada durante la infección por VIH [172, 268]. En el caso de las DC plasmacitoides, existen reportes que indican que la producción de IFN tipo I en DC plasmacitoides de sangre periférica está disminuida durante la infección aguda y crónica [269, 270], mientras que otros reportan que la producción de IFN tipo I en pacientes con viremia elevada es normal [271]. En este trabajo se encontró que las frecuencias de ambas poblaciones de DC están afectadas. Además, se observó que las frecuencias de DC activadas son diferentes entre individuos con VIH-1 y el grupo control.

Se ha publicado que durante la infección aguda hay un incremento en la expresión de marcadores de activación en DC plasmacitoides [172]. De manera similar, nuestros resultados indican que la frecuencia de DC plasmacitoides que expresan marcadores de activación (tanto CD80 como CD86) está incrementada en individuos con VIH-1 con viremia alta o en SIDA, no así en controladores virémicos y élite. Es interesante que se ha reportado que hay una disminución en la expresión de CD80 y CD86 en monocitos de personas con VIH-1, lo que induce una activación poco eficiente de las respuestas de linfocitos T CD8⁺ [272-274]. También se ha publicado que en cultivos de DC de ganglios linfáticos en presencia de VIH-1, solo hay una expresión parcial de estas moléculas co-estimuladoras [181]. La infección de DC plasmacitoides puede inducir su activación, lo que resulta en la sobreexpresión de moléculas co-estimuladoras y la producción de grandes cantidades de IFN tipo I que inhiben la replicación del virus en linfocitos T [86, 275]. Por esto, una explicación para el incremento en DC plasmacitoides activadas en individuos virémicos es la infección directa de estas células por VIH-1. En particular, el incremento en la frecuencia de DC plasmacitoides CD86⁺ se ha reportado durante la infección aguda, pero no en individuos con infección crónica [173]. Los resultados de citometría de flujo en este trabajo sí muestran un incremento significativo en la proporción de DC plasmacitoides que expresan CD86. La diferencia de este resultado con respecto al reportado en la literatura puede deberse al tiempo de infección de los individuos en fase crónica (en el artículo de Fontaine *et al* se consideraron individuos crónicos con aproximadamente 24 meses post-

infección; en los individuos estudiados en este trabajo, el tiempo post-infección es muy variable y, en muchos casos, desconocido).

Es interesante que las DC de controladores tuvieran niveles de activación similares a los de personas sin VIH-1. Se sabe que las DC plasmacitoides de controladores son mejores inductoras de apoptosis en linfocitos T por TRAIL (ligando inductor de apoptosis inducida por TNF, por sus siglas en inglés) y mantienen la producción de IFN- α elevada en comparación con progresores típicos. Esta baja activación induce que haya menos migración a ganglios y, por lo tanto, no sea tan evidente la disminución de la frecuencia de estas células en sangre periférica [276-278]. También se ha reportado que las DC de tejido linfoide y de sangre periférica en personas que no progresan durante periodos prolongados expresan niveles más bajos de CD80 y CD86 que los progresores crónicos y en SIDA [173, 181]. De acuerdo con estas observaciones, los resultados obtenidos en este trabajo muestran bajos niveles de activación en controladores con respecto a los progresores e individuos en SIDA tanto para DC convencionales como para DC plasmacitoides. De manera interesante, y contrario a lo esperado, se encontró un aumento en la proporción de DC convencionales CD86⁺ en controladores elite en comparación con donadores sin VIH-1. Sin embargo, la dispersión en las frecuencias en este marcador es grande y, este resultado podría estar afectado por el bajo número de controladores elite analizados. También es posible que estos individuos tuvieran infecciones no aparentes en el momento de la toma de muestra que hubieran alterado la expresión de este marcador en DC convencionales.

Estudios anteriores han reportado que las DC convencionales siguen afectadas aún después del TAR [173]. En este trabajo se encontró que el TAR redujo la frecuencia de DC activadas, tanto convencionales como plasmacitoides, alcanzando niveles similares a los de individuos sin VIH-1. La discordancia entre los resultados obtenidos en esta tesis y los publicados puede deberse a las diferencias entre las cohortes, así como el tiempo de TAR y el nadir de linfocitos T CD4⁺ al inicio del tratamiento. En el artículo mencionado, la mediana de linfocitos T CD4⁺ de los individuos crónicos antes del TAR fue de 743 \pm 261 células/ μ l, mientras que la mediana en este trabajo fue de 394 células/ μ l. Adicionalmente, en la publicación de Fontaine *et al*, se consideró a los individuos a partir de 3 meses y se continuó su análisis hasta 12 meses después del inicio del tratamiento. Los individuos con

VIH-1 analizados en este estudio tuvieron una mediana de 22 meses con TAR, con un mínimo de 3 y máximo de 126 meses de tratamiento. Es posible que en el artículo mencionado, el tiempo de TAR no haya sido suficiente para alcanzar una disminución significativa en la activación de las DC similar a lo que se encontró en esta tesis.

En general, durante las infecciones virales agudas, los IFNs tipo I producidos por las DC plasmacitoides actúan como citocinas inmunomoduladoras que favorecen la maduración de DC convencionales [279] y como agentes antivirales que activan factores de restricción intracelulares, que inhiben la proliferación e inducen la proliferación de células blanco como los linfocitos T [280]. Contrariamente, en la infección sistémica, estudios en humanos y animales muestran que la activación crónica de DC plasmacitoides y la elevación crónica de IFN- α puede llevar a efectos deletéreos en inflamación y perturbación de la proliferación de linfocitos T, homeostasis y muerte celular, que contribuyen a la activación inmunológica e inmunopatogénesis del VIH/SIDA [278, 281-285]. De acuerdo con estos reportes, en este trabajo se encontró que la activación de DC plasmacitoides (CD80) correlaciona con activación de linfocitos T CD8⁺ y células NK, y con SCD14, un marcador de translocación bacteriana y de activación de monocitos/macrófagos [193].

Cada vez es más evidente que las DC juegan un papel importante en la desregulación que lleva al desarrollo de SIDA [170]. En particular, las DC plasmacitoides de sangre periférica se han correlacionado directamente con las cuentas de linfocitos T CD4⁺ e inversamente con la CV, lo que sugiere un papel en estas poblaciones y el control de la replicación [176, 286]. Además, junto con las cuentas de linfocitos T CD4, la disminución en la producción de IFN- α y la frecuencia de DC son predictores independientes de progresión clínica y aparición de enfermedades oportunistas [174-176, 212, 287, 288]. En concordancia con esto, los resultados de citometría de flujo muestran que la activación de DC plasmacitoides (CD80) correlaciona también con la CV, con las cuentas de linfocitos T CD4⁺, y con el nadir de linfocitos T CD4⁺. Es interesante, sin embargo, que la activación de estas células no correlacionó con la cantidad plasmática de IFN- α , pero tanto la frecuencia de DC plasmacitoides CD80⁺ como CD86⁺ sí correlacionaron con IP-10 (proteína inducida por

IFNs). Además, la frecuencia de DC plasmacitoides CD80⁺ también se asoció con citocinas proinflamatorias como IL-1 e IL-6.

Debido a las fuertes asociaciones que se encontraron entre la frecuencia de DC plasmacitoides y marcadores de progresión de la infección por VIH-1, inflamación y activación de linfocitos T y células NK, se realizó un modelo multivariado para analizar su potencial uso como marcador de progresión. A pesar de haber encontrado asociaciones significativas entre la activación de DC plasmacitoides y los marcadores mencionados, el análisis multivariado no fue significativo. Además, la activación de DC tampoco correlacionó con otros biomarcadores de inflamación como fibrinógeno y PCR, ni con la citocina pro-inflamatoria TNF- α . Debido al tipo de estudios realizados en este trabajo, no es posible saber si la activación que se observa en esta población celular es causa o consecuencia del estado inflamatorio generalizado que se encuentra en individuos con infección avanzada. Existen reportes que muestran una asociación inversa entre la secreción de IFN- α por DC plasmacitoides y la aparición de enfermedades oportunistas, y sugieren que el IFN- α induce respuestas eficientes de células NK que controlan estas enfermedades en pacientes asintomáticos [288-290]. Con este antecedente, y con los resultados del modelo multivariado, es razonable pensar que la activación de DC plasmacitoides está asociada al incremento en las respuestas de otras poblaciones inmunitarias, y no necesariamente se asemeja al fenómeno de activación inmunológica patogénica que se observa en células NK y linfocitos T. Sin embargo, es necesario realizar estudios para caracterizar la funcionalidad de las DC activadas y saber si éstas son capaces de producir las citocinas necesarias para inducir una respuesta inmunológica eficiente o para inducir la expresión de marcadores de activación *bystander*, en linfocitos T y células NK. Otro punto a considerar es que la frecuencia de DC en sangre es muy baja y disminuye con el avance de la infección. Aunque se encontró elevado el porcentaje de DC activadas, es posible que la fracción de estas células sea tan pequeña que no alcance a tener un efecto sistémico. Por otra parte, si es que la activación de las DC está asociada con mayor producción de IFN- α y éstas son capaces de producir más de 10 000 veces más de esta citocina que otros tipos celulares, aunque sea una población pequeña, el efecto activador potencial de estas células sería considerable en la estimulación de otras células inmunológicas.

La infección por VIH-1 está asociada con la secreción elevada de IL-10, que juega un papel central en el control de la respuesta inmune adaptativa [291, 292]. Se ha reportado que la IL-10 puede modular la maduración de las DC, generando DC tolerogénicas que resultan en la inducción ineficiente de las respuestas de células T [293-297]. La frecuencia de DC convencionales y plasmacitoides CD80⁺ correlacionó positivamente con la cantidad plasmática de IL-10. Siendo que tanto los niveles de IL-10 como las frecuencias de DC CD80⁺ en controladores elite y controladores virémicos son similares a los donadores sin VIH-1, y se encuentran elevados en individuos progresores y en SIDA, es posible que estas células no solo estén afectadas en número, sino que las células que quedan pueden ser tolerogénicas y, por lo tanto, no ser capaces de inducir respuestas inmunológicas adecuadas. Como se mencionó anteriormente, es necesario realizar más estudios para caracterizar la funcionalidad de estas poblaciones de DC activadas y su papel en la inmunopatogénesis de la infección por VIH-1.

7.4 Caracterización del estado inflamatorio en la infección por VIH-1: desregulación inmunológica

La desregulación inmunológica que ocurre durante la infección crónica por VIH-1 mediada por citocinas no resulta directamente por la interacción de componentes virales con células blanco, sino del ambiente inmunomodulador extracelular que asociado con la respuesta inmunológica ante la infección y a los productos bacterianos translocados [298].

Durante la fase aguda de la infección por VIH-1, el incremento en la viremia está asociado con el aumento en los niveles de citocinas y quimiocinas en la sangre. Los niveles de IL-15, IFNs tipo I, IP-10 se incrementan rápidamente y de manera transitoria para activar y atraer células NK y linfocitos T. La cantidad de IL-6, IL-8, IL-18, TNF, IFN- γ e IL-22 se incrementan rápidamente pero se mantienen elevados. El incremento de IL-10, IL-4 e IL-5 ocurre de manera retardada como control de la respuesta inflamatoria inicial [299, 300]. Sin embargo, cada vez existe más evidencia del efecto de estas citocinas en la inmunopatogénesis de la infección y en la desregulación de la respuesta inmunológica.

Biomarcadores de inflamación en la infección por VIH-1

Se sabe que biomarcadores de inflamación como IL-1 α , IL-6, fibrinógeno, proteína C Reactiva (CRP) y sCD14 están incrementados en individuos con VIH-1 [188-192, 301-303]. Además, los niveles elevados de estos biomarcadores se han asociado a alta mortalidad y riesgo elevado del desarrollo de SIDA [304-306]. Los resultados de este trabajo mostraron un incremento en PCR y sCD14 en todos los grupos de estudio en comparación con los donadores sin VIH-1. En concordancia con reportes anteriores, el TAR redujo parcialmente los niveles de sCD14 en personas con VIH-1 [307]. El TAR también disminuyó las cantidades de fibrinógeno en comparación con personas con SIDA y progresores crónicos, alcanzando niveles similares a los de controladores élite y donadores sin VIH-1. Sin embargo, no se encontraron asociaciones entre el tiempo de tratamiento y los niveles de estos biomarcadores. De manera interesante, la PCR correlacionó positivamente con las cantidades de IP-10 y MIP-1 β en plasma, pero no con IL-6 ni TNF- α , las principales citocinas proinflamatorias. La PCR se sintetiza primordialmente en el hígado como parte de la respuesta aguda [308, 309]. Los principales estímulos que inducen su producción son la IL-6 y la IL-1 [310-312]. Por ello, es interesante que no se hayan encontrado asociaciones con la cantidad plasmática de IL-6, a pesar de que ésta se encontró incrementada en individuos con VIH-1 en infección avanzada. Las cantidades de fibrinógeno no se encontraron asociadas a otros factores solubles ni a la activación de poblaciones leucocitarias. El nivel de IL-6 se asoció con la activación de DC plasmacitoides y de células NK inmunomoduladoras (CD56^{bright} CD16⁻). Aunque se ha reportado que los biomarcadores mencionados están elevados en individuos con VIH-1 en infección avanzada, en este trabajo no se encontraron correlaciones con marcadores de progresión ni con la expresión de TLRs. Es importante recalcar que estos biomarcadores se encuentran principalmente en la respuesta aguda, y los individuos estudiados en este trabajo se encuentran con infección crónica. Sería interesante estudiar la expresión de TLRs en células hepáticas de personas con VIH-1 y su capacidad de responder a las citocinas que generan biomarcadores inflamatorios, para entender con mayor profundidad si la variabilidad de los niveles de estas moléculas son causa o consecuencia de la infección crónica por VIH-1.

Por otra parte, se ha reportado que la proporción de células T reguladoras/Th17, la cantidad del receptor de IL-1 y sCD14 en infección primaria por VIH-1 predicen el *set point* en ausencia de translocación bacteriana [313]. Además, la IL-1 puede causar la depleción de CD4 en personas con VIH-1, como consecuencia de la inducción de piroptosis [314]. En este trabajo se encontró que las cantidades de IL-1 están fuertemente asociadas a la activación pero no a la expresión de TLRs en diferentes poblaciones. Esto podría sugerir que la presencia de IL-1 y sCD14 contribuyen al fenómeno inflamatorio observado en individuos con VIH-1 con infección avanzada, independientemente de la estimulación de TLRs por productos bacterianos translocados, y posiblemente pudiera afectar a los cambios en las frecuencias de linfocitos T CD4⁺. De manera interesante, esta citocina no se encontró elevada en controladores, que mantienen niveles bajos de activación y translocación bacteriana, así como de otras citocinas inflamatorias.

IP-10 como marcador de progresión a SIDA

Diversos reportes muestran que las citocinas juegan un papel importante en la modulación de la respuesta inmunológica y la progresión de la enfermedad por VIH-1 y SIV [315]. En particular, se ha visto que las concentraciones de IP-10 en diversos tejidos están fuertemente asociadas con la viremia y la activación inmunológica. Primero, estudios *in vitro* mostraron que la infección por VIH-1 genera un incremento en quimiocinas como MCP-1, IP-10, MIG, MIP-1 α e IL-1 β [316-320]. Posteriormente, se reportó que en líquido cefalorraquídeo (LCR) y cerebro de personas con VIH-1 hay niveles elevados de IP-10 inducidos directamente por la expresión de gp120 (e independientes de IFN), y están asociados con la patogénesis de la demencia asociada a SIDA [321]. Además, la concentración de IP-10 en LCR correlaciona con la CV y el conteo de células blancas en LCR, lo que sugiere que esta quimiocina contribuye a la respuesta inmunológica y la infección local [322]. En sangre periférica, se ha reportado que IP-10 estimula la replicación de VIH-1 en monocitos derivados de macrófagos y linfocitos T de sangre periférica [323], y la cantidad plasmática de IP-10 se asoció con progresión rápida en la infección por VIH-1, y se asoció con la caída de linfocitos T CD4⁺ durante la fase temprana de la enfermedad [315]. En concordancia con estos reportes, en este trabajo se encontró que

IP-10 está muy elevada en individuos con enfermedad avanzada y la cantidad plasmática de esta quimiocina se asoció fuertemente con marcadores clínicos de progresión de la infección y activación de linfocitos T, células NK y DC. El nivel de IP-10 se ha propuesto como un potencial marcador de inflamación en otras enfermedades y como indicador de recuperación post-tratamiento [324-326]. Recientemente, se ha reportado como un predictor de progresión rápida en infección aguda por VIH-1 [327] y como un factor determinantes en la progresión de la enfermedad en la co-infección de tuberculosis y VIH-1 [328].

En este trabajo y en reportes previos [211] se ha observado que los controladores (virémicos y élite) también tienen niveles elevados de IP-10, pero son menores que los de individuos progresores y en SIDA, y correlacionan con la activación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Además, en concordancia con estudios anteriores [321, 322], se encontró que el TAR redujo parcialmente los niveles de IP-10. En conjunto, estos datos sugieren que los niveles elevados de esta quimiocina contribuyen al reclutamiento y activación de células inmunológicas a nivel sistémico, de manera similar a lo que se observa localmente en tejido neurológico y mucosas. Las cargas virales bajas, controladas de manera natural o mediante TAR, se asocian fuertemente con una disminución en la cantidad circulante de IP-10.

Los resultados de la regresión múltiple mostraron una fuerte asociación significativa entre la cantidad de IP-10 en plasma y los marcadores de progresión e inflamación, que depende de la activación inmunológica generalizada de DC, linfocitos T y células NK, así como de otras citocinas como GM-CSF, IL-10, IL-12, IL-6 y TNF- α . De manera interesante, no se encontraron asociaciones entre la cantidad de IP-10 e IFN- α o IFN- γ en este estudio. Aunque se ha reportado que el IFN- α induce la producción de IP-10 en DC derivadas de monocitos, también se sabe que proteínas virales pueden estimular la producción de esta citocina en otros tipos celulares [321, 329]. Siendo que sí se encontró una correlación positiva entre la CV de los individuos con VIH-1 analizados y la cantidad de IP-10, una posible explicación de los niveles elevados en esta citocina es la presencia propia del virus, así como el entorno inflamatorio (correlación con otras citocinas proinflamatorias) derivado tanto del VIH-1 como de productos bacterianos translocados.

Por otra parte, se ha reportado que el incremento en la producción de IP-10 aumenta la capacidad de estimulación de linfocitos T CD8⁺ efectores [329]. Además, un estudio realizado en mucosa genital de personas con VIH-1 mostró que las cantidades bajas de IP-10 (y otras citocinas como MIG e IL-1) están asociadas con la protección de la infección por el virus [330]. Estos resultados indican que la baja presencia de IP-10 reduce la posibilidad de infección mediante un menor reclutamiento y activación de linfocitos. Estos resultados, aunados a las observaciones en personas con TAR y en controladores, enfatizan la importancia de IP-10 como una citocina fuertemente involucrada en los fenómenos de activación inmunológica generalizada e inflamación observados en la infección avanzada, y que están menos exacerbados en controladores.

Finalmente, es interesante recalcar la fuerte asociación que se encontró entre IP-10 (inflamatoria y quimiotáctica) e IL-10 (anti-inflamatoria). Ambas citocinas se encontraron incrementadas en infección avanzada, pero solamente IP-10 se encontró elevada también en controladores. IP-10 e IL-10 están asociadas con la activación de DC, células NK y linfocitos T de manera independiente, lo que sugiere que estas citocinas juegan un papel importante en la desregulación inmunológica observada en la progresión de la enfermedad por VIH-1.

IL-10 como principal citocina anti-inflamatoria en la infección por VIH-1

La IL-10 está producida principalmente por monocitos y, en menor medida, por linfocitos. Esta citocina tiene efectos pleiotrópicos en inmunomodulación e inflamación. Reduce la expresión de citocinas Th1, moléculas de HLA II y moléculas co-estimuladoras en macrófagos. Las mutaciones en el gen de *IL-10* pueden influenciar la tasa de progresión de la enfermedad por VIH-1 mediante la regulación de los niveles plasmáticos de IL-10 y la magnitud de las respuestas de linfocitos T CD8⁺ [331].

Se ha reportado que la cantidad de células T CD4⁺ reguladoras productoras de IL-10 está incrementadas en individuos con SIDA en edad avanzada y el bloqueo de esta citocina induce la replicación de VIH-1 *in vitro* [332]. Por otra parte, reportes indican que la estimulación por TLRs induce la producción de citocinas pro- y anti inflamatorias en

personas con VIH-1. Los monocitos aumentan la expresión de PD1 y producen IL-10 durante la infección crónica por VIH, posiblemente en respuesta a productos bacterianos translocados [267]. La estimulación por TLR4 induce la producción de TNF- α e IL-10 en monocitos de personas con VIH-1 [236]. Por otra parte, la estimulación directa con agonistas de TLR2 en macrófagos aumenta la resistencia a la infección por VIH-1 y controla la replicación viral mediante la producción de quimiocinas e IL-10 [233]. En este trabajo no se encontró asociación entre la cantidad plasmática de IL-10 y la expresión de TLRs, con la excepción de la frecuencia de DC plasmacitoides TLR9⁺. Sería interesante evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones estudiadas a la estimulación con diversos TLRs para evaluar el efecto de IL-10 en su estimulación y en el control de la viremia. Cabe recalcar que los individuos que no controlan la viremia tienen niveles bajos de IL-10, lo que podría sugerir que los niveles altos de IL-10 en plasma pueden estar asociados, directa o indirectamente, con el control de CV altas. Además, se sabe que estos individuos tienen menor cantidad de productos bacterianos translocados que pudieran estar estimulando TLRs *in vivo*, e induciendo la producción de esta citocina.

Estudios *in vitro* han mostrado que la estimulación de PBMC totales con ligandos de TLRs inducen la producción de IL-10 y esta está asociada con recuperación de linfocitos T CD4⁺ en personas con VIH-1 en TAR [333]. Sin embargo, en este trabajo no se encontró ninguna asociación entre la cantidad de IL-10 en circulación y los meses de TAR o cuentas de linfocitos T CD4⁺ en el grupo TAR⁺.

Los resultados de este trabajo muestran que la IL-10 está asociada marcadores clínicos de progresión a SIDA (Tabla 6.4, Figura 6.25), así como a activación de linfocitos T, DC y células NK de manera independiente. Además, la cantidad circulante de IL-10 también se asoció positivamente con citocinas proinflamatorias. El modelo de regresión múltiple fue significativo al considerar la activación inmunológica, inflamación, translocación bacteriana y marcadores clínicos de progresión. El modelo indicó que la cantidad de IL-10 depende de IL-1 α , IL-6 e IP-10, tres de las principales citocinas proinflamatorias, pero no de los niveles de TNF- α ni de la activación de poblaciones leucocitarias. Este resultado sugiere que el incremento en los niveles de IL-10 ocurre como un mecanismo para contrarrestar la acción inflamatoria inducida por IL-1 α , IL-6 e IP-10.

El papel de IL-10 es especialmente interesante en la interacción de células NK y DC. Se conoce que los virus pueden manipular la interacción de células NK y DC para evadir la respuesta inmunológica. Como se ha mencionado, la infección por VIH-1 (y otras infecciones virales crónicas) está asociada con la secreción elevada de IL-10, que juega un papel central en el control de la respuesta inmune adaptativa [291, 292]. La exposición de DC a IL-10 puede alterar la expresión de HLA I y ligandos de NKG2D. Esto hace que las DC maduras se vuelvan más susceptibles, y las DC inmaduras resistentes a la citotoxicidad mediada por células NK en el proceso de “edición” de DC [297, 334]. Por esto, la IL-10 es secretada normalmente de manera temporal después de una infección viral aguda, lo que limita el tiempo durante el cual las DC pueden migrar hacia ganglios donde las DC aberrantes son eliminadas por células NK [335]. Sin embargo, en el contexto de la infección crónica persistente con VIH-1, la secreción de IL-10 puede resultar en la edición alterada de DC (mediada por células NK), lo que lleva a la acumulación de DC tolerogénicas que son potencialmente responsables por la inducción de una respuesta inmunológica adaptativa disfuncional [335]. Como se mencionó anteriormente, será interesante evaluar si las DC que expresan marcadores de activación en la infección avanzada son inductoras de tolerancia y están asociadas a la disfuncionalidad de la respuesta de linfocitos T característica de la infección por VIH-1 como consecuencia (o en relación) con el incremento en la IL-10 circulante.

Finalmente, se sabe que la población de linfocitos T CD4⁺ Th17, productores de IL-17 e IL-22, pueden ser inducidas por IL-1 β y secretar IL-10 [336-339]. Esta población se encuentra disminuida en las personas con VIH-1 [340]. Resulta interesante que la cantidad de IL-17 circulante correlacionó positivamente con la cantidad de IL-1 β , lo que indica que a menor cantidad de IL-1 β en los individuos estudiados también ocurre una disminución de IL-17, posiblemente como consecuencia de la disminución en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ Th17 causada por la infección. En contraste, no se observó una asociación entre la cantidad de IL-10 e IL-17 en los individuos estudiados. Si se asume que la disminución de IL-17 es consecuencia de la disminución en la frecuencia de linfocitos T CD4⁺ Th17, sería razonable esperar que también hubiera una disminución en otras citocinas producidas por esta subpoblación como IL-10 e IL-22. Muchos tipos celulares tienen la capacidad de producir IL-10 como macrófagos, DC, células NK, linfocitos T CD4⁺ reguladores y otras

poblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ [110, 341-343], por lo que será interesante identificar el origen de esta citocina observado en las personas con infección avanzada. Dadas las asociaciones observadas entre la cantidad de IL-10 y la activación en DC, células NK y linfocitos T, es necesario caracterizar si estas células activadas son fuente productora de la citocina o si su fenotipo activado es una consecuencia de la estimulación por otras citocinas. Los resultados del modelo multivariado realizado en este trabajo (que sugiere que el incremento de IL-10 es dependiente de la cantidad de otras citocinas proinflamatorias) en combinación con el hecho de que la IL-10 es responsable de la disminución en la expresión de moléculas co-estimuladoras y HLA-II en monocitos/macrófagos [343], es más posible especular que el incremento en la cantidad de IL-10 en circulación ocurre como un mecanismo regulatorio de la activación generalizada tanto en la producción de otras citocinas como en la disminución de expresión de moléculas de activación en otras poblaciones celulares. Esto resulta especialmente interesante para estudiar ya que la activación de células NK, linfocitos T y DC y el incremento en IL-10 solamente se observan en individuos que progresan a SIDA, y no en personas que controlan la viremia, donde la inflamación generalizada es mucho menor.

Por último, los niveles de IL-10 en circulación correlacionaron con la cantidad de DC plasmacitoides TLR9⁺. Aunque las DC plasmacitoides no producen IL-10, pueden regular su producción en otras poblaciones celulares mediante la producción de IFN- α [344, 345]. Será interesante caracterizar si la producción de interferones como consecuencia de la estimulación por TLR9 en DC plasmacitoides contribuye al incremento de IL-10 en la infección por VIH-1.

8. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten identificar asociaciones importantes entre diferentes factores asociados con la progresión de la infección por VIH-1. Los análisis muestran una perspectiva generalizada del estado inmunológico/inflamatorio de las personas que viven con VIH-1 en diferentes fases de progresión de la infección, enfatizando la activación de poblaciones leucocitarias del sistema inmunológico innato y la asociación de la patogénesis de enfermedad con la presencia de marcadores inflamatorios en plasma.

Panorama global de activación e inflamación en la infección por VIH-1 en controladores y progresores

Este estudio permitió realizar una caracterización general del panorama inflamatorio y de activación en personas que viven con VIH-1, con diferentes grupos de progresión y el efecto del TAR. Por primera vez, hasta nuestro conocimiento, se realizó una caracterización simultánea de la expresión de TLRs y marcadores de activación en poblaciones de DC, células NK y linfocitos T paralelamente con la cuantificación de marcadores inflamatorios en plasma a partir de una muestra única. Este enfoque permite realizar un análisis de asociación que presenta un panorama global del estado en el que se encuentran las personas que viven con VIH-1 *ex vivo*, sin manipulación o estimulación para inducir la expresión de los marcadores de interés.

Con base en los resultados obtenidos y presentados a lo largo de esta tesis, se concluye que la expresión de TLRs parece no jugar un papel directo en la activación inmunológica ni en el ambiente inflamatorio generalizado observado en la infección por VIH-1. Será necesario realizar estudios específicos sobre cada receptor en la subpoblación de interés para continuar caracterizando mecanismos individuales característicos de cada TLR para poder descartar totalmente esta hipótesis. Por el contrario, los resultados obtenidos de expresión de marcadores de activación y marcadores inflamatorios en plasma/suero, muestran que sí existen perfiles inflamatorios característicos de los diferentes grupos de estudio. Además, los análisis multivariados realizados permiten encontrar ciertas relaciones de causalidad – adecuadas para este modelo con los resultados obtenidos en este trabajo – que podrían ayudar a identificar factores inflamatorios, como IL-10 e IP-10 y la activación de células

NK, que serán de utilidad para el seguimiento clínico de las personas que viven con VIH-1 así como para entender los mecanismos de la inmunopatogénesis de la infección.

Como primer resultado global, se propone un modelo en el que la infección por VIH-1 en individuos que progresan a SIDA causa la depleción de linfocitos T CD4⁺ en GALT y en circulación, así como la translocación de productos bacterianos. Esto tiene como consecuencia la estimulación de diferentes poblaciones inmunológicas que producen citocinas proinflamatorias y, tanto el entorno inflamatorio como la presencia directa del virus, causan la activación *bystander* no solo de linfocitos T, sino de células NK de manera exacerbada y, en menor medida, de DC plasmacitoides asociadas a la carga viral y al estado inmunológico de los individuos (Figura 8.1a). Con la administración del TAR, ocurre una disminución de la CV a niveles indetectables, disminuye la translocación de productos bacterianos y la activación de linfocitos T. En consecuencia, ocurre una disminución parcial en el entorno inflamatorio y en la activación de células NK, mientras que la frecuencia de DC plasmacitoides activadas regresa a niveles basales (Figura 8.1b).

Como segundo modelo general basado en los resultados de observados en este trabajo y derivado de los análisis multivariados (Figura 8.2), se propone que el entorno inflamatorio determinado por el incremento de GM-CSF, IL-12, IL-6 y TNF- α y la activación inmunológica generalizada (que incluye a DC, células NK y linfocitos T) inducen el aumento de la proteína inflamatoria, quimiotáctica y activadora de células citotóxicas IP-10 en la infección por VIH-1, independientemente de la CV y las cuentas de linfocitos T CD4⁺. A su vez, la cantidad elevada de IP-10 en combinación con GM-CSF, IL-12, IL-6 e IL-1 α – pero no TNF- α ni la activación celular- causan un incremento en la producción de IL-10 en individuos que progresan a SIDA. Como se ha discutido antes, se esperaría que el incremento en IL-10 tuviera un efecto de regulación de factores inflamatorios, sin embargo, en estos individuos progresores se mantiene la elevación tanto de marcadores inflamatorios como de la citocina anti-inflamatoria. Esto soporta la hipótesis de la desregulación inmunológica que ocurre durante la inmunopatogénesis de la infección por VIH-1. De manera contrastante, las personas que mantienen viremia baja o indetectable de manera natural (controladores élite y controladores virémicos) o mediante TAR no presentaron

incremento en IL-10 con respecto a donadores sanos. Este resultado sugiere que la infección persistente, la viremia elevada y el incremento en el entorno inflamatorio son determinantes de la desregulación. Dado que estos parámetros se encuentran similares o cercanos a los niveles basales en individuos con VIH-1 controladores o en personas bajo TAR, la desregulación no es tan evidente como en individuos progresores.

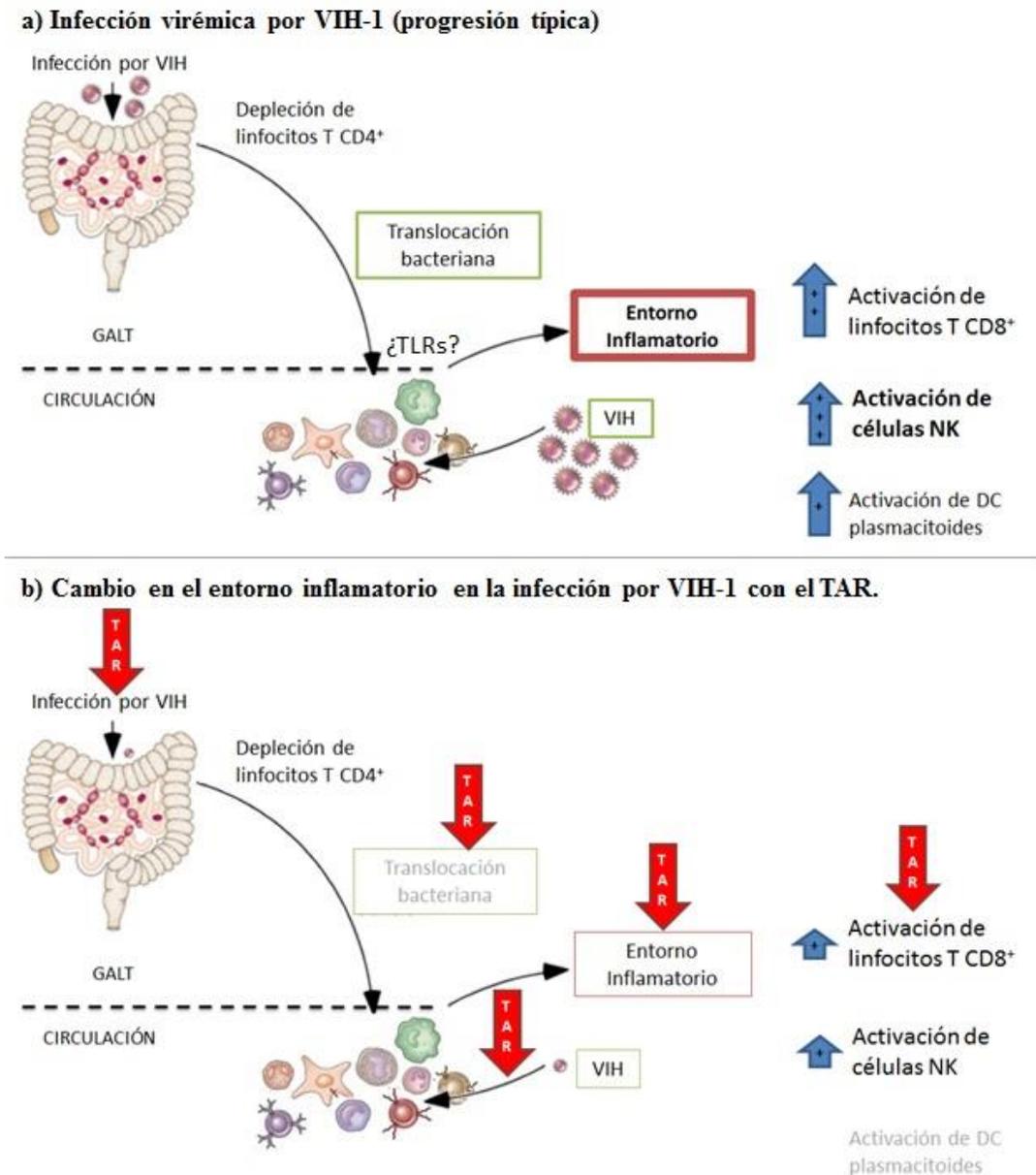


Figura 8.1. Modelo global de la infección por VIH-1 el efecto del TAR. a) Inflamación y activación generalizada en personas con VIH-1 que progresan a SIDA. b) Efecto del TAR sobre el entorno inflamatorio y de activación. Modificado de Brenchley *et al*, 2006 [346].

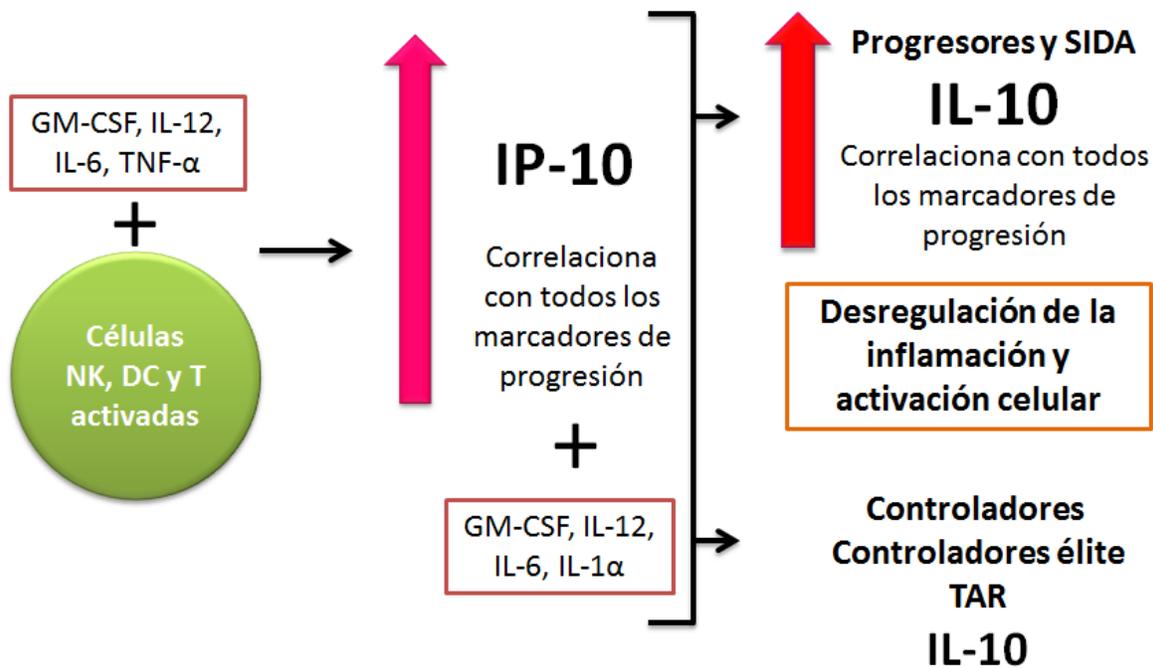


Figura 8.2. Papel de IP-10 e IL-10 como indicadores de desregulación inmunológica en la inmunopatogénesis de la infección por VIH-1.

Finalmente, se sabe que los marcadores clínicos más utilizados para vigilar la progresión de la infección por VIH-1 son la CV, las cuentas de linfocitos T CD4⁺ y la activación de linfocitos T, particularmente de los CD8⁺. Con base en los resultados de este trabajo, las asociaciones encontradas en los análisis multivariados y en el *heat map*, se proponen otros factores que podrían ser considerados como indicativos de progresión de la infección y que podrían contribuir a un mejor seguimiento clínico de las personas que viven con VIH-1 (Figura 8.3).

Utilizando un modelo de balanza, se propone muestra cuáles parámetros se encuentran elevados de manera importante en personas que progresan a SIDA y no en personas que controlan la infección. La consideración de los cambios en la frecuencia en poblaciones leucocitarias, además de las cuentas de linfocitos T CD4⁺ como blanco directo de la infección, es indicativo de enfermedad avanzada y progresión. Igualmente, los controladores presentan niveles de marcadores inflamatorios en plasma y de activación de células NK y DC similares a los de donadores sin VIH-1, mientras que niveles elevados de estos indicadores se encuentran en enfermedad progresiva. Dada la naturaleza transversal de este estudio, sería necesario realizar un análisis longitudinal y considerar individuos en

infección temprana/aguda para completar y validar el panorama que aquí se presenta. Sin embargo, debido a las consideraciones éticas y el inicio temprano del TAR sugerido por los lineamientos internacionales, la realización de estos estudios es difícil.

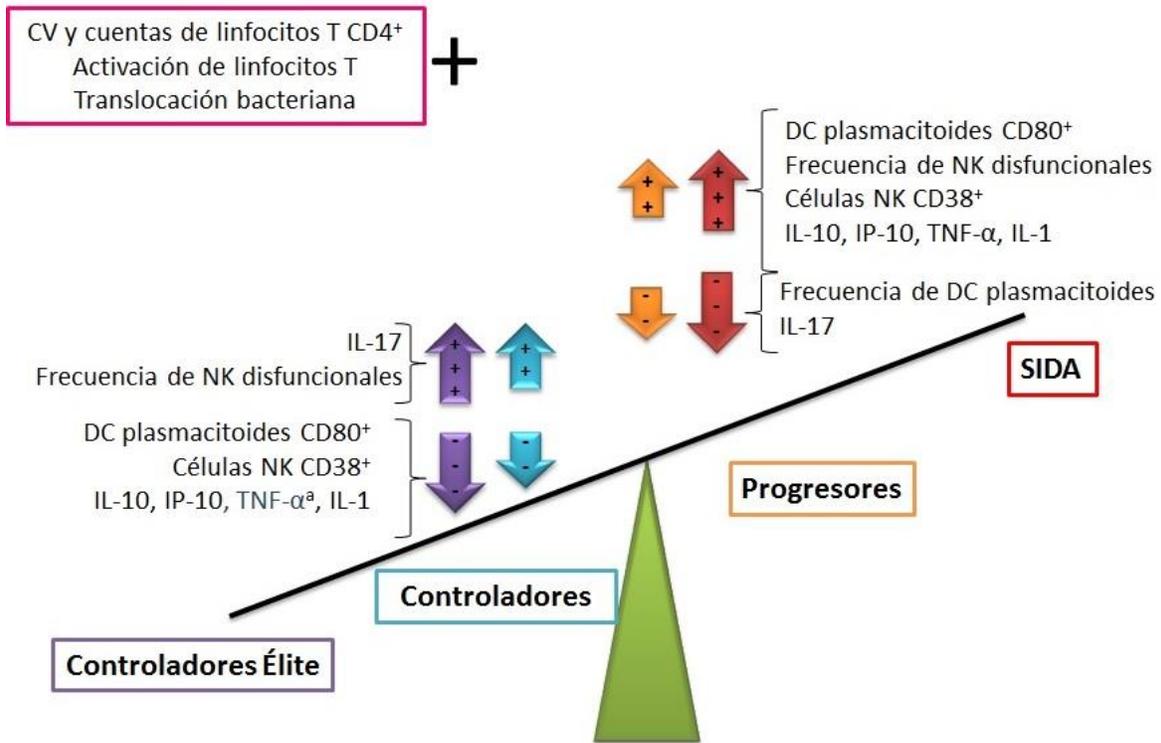


Figura 8.3. Marcadores asociados al control o progresión de la infección por VIH-1. ^aTNF- α únicamente se encuentra elevada en controladores virémicos, los controladores élite mantienen niveles similares a los de individuos sin VIH-1.

El desarrollo de este trabajo: 1) abre preguntas interesantes que permitirán conocer más detalladamente la inmunopatogénesis de la infección por VIH-1, 2) muestra asociaciones importantes entre variables clínicas e inmunológicas que podrán permitir un mejor seguimiento y, posiblemente, una mejora en la calidad de vida de las personas que viven con VIH-1 y, 3) refuta parcialmente la hipótesis de una asociación entre la expresión de TLRs y la activación inmunológica observada en la infección avanzada por VIH-1 e invita a una investigación más detallada de estos receptores en poblaciones celulares específicas.

9. PERSPECTIVAS

Este trabajo muestra resultados de muchos aspectos asociados a la inmunopatogénesis de la infección por VIH-1. A lo largo de los resultados y la discusión se han mencionado diversos aspectos que será interesante investigar más a fondo. Se abren diversas preguntas que dan oportunidad a nuevas áreas de investigación hacia:

- Realizar estudios longitudinales que respalden los resultados de asociación de marcadores de activación (CD38⁺ en células NK) e inflamatorios (IP-10) como marcadores de progresión a SIDA.
- Identificación de ligandos de TLR2, TLR3 y TLR6 en la infección por VIH-1 como posibles productos de translocación bacteriana que podrían contribuir a la activación inmunológica generalizada.
- Caracterización de la expresión de TLRs en otras poblaciones celulares productoras de citocinas como monocitos/macrófagos y linfocitos B que podrían inducir activación inmunológica.
- Realizar estudios de estimulación de células inmunológicas *ex vivo* y medir capacidad de respuesta ante ligandos, producción de citocinas y efecto directo en la activación de esa u otras poblaciones celulares. Algunos casos que resultaron especialmente interesantes son:
 - TLR3 en DC convencionales
 - Efecto del TAR en la expresión de TLR3 de personas con TAR
 - TLR9 en DC plasmacitoides
 - TLR6 en células NK disfuncionales CD56⁻ CD16⁺
- Realizar estudios funcionales para identificar las posibles causas del incremento en la expresión de moléculas co-estimuladores en DC, en particular CD80 en DC plasmacitoides.

- Realizar estudios funcionales para identificar las posibles causas del incremento en la expresión de marcadores de activación en células NK.
- Dada la similitud entre la activación de células NK y linfocitos T que se encontró en este trabajo, caracterizar si las células NK que presentan un fenotipo activado son “funcionalmente normales” o disfuncionales como los linfocitos T. En este caso, se deberá estudiar en células NK activadas:
 - Los perfiles de expresión de receptores asociados con citotoxicidad: NCRs, KIRs y tipo lectina C (NKG2A/C, NKG2D).
 - Su capacidad de responder a estimulación mediante la ligación de los receptores de citotoxicidad mencionados.
 - La capacidad de respuesta ante estimulación por citocinas.
 - Su funcionalidad en términos de: producción de citocinas, degranulación y capacidad citolítica.
- Estudiar a detalle la causa y efecto del incremento/disminución de las citocinas en las que se encontraron diferencias significativas. De manera especialmente interesante, será importante estudiar a IL-10, IP-10, eotaxina, GM-CSF, IL-15, IL-17, IL-6, IL-8, MCP-1, MIP-1 β y TNF- α .
 - En particular, continuar con la caracterización del papel de IL-10 e IP-10 en la desregulación inmunológica en la infección avanzada.

Algunos de estos puntos ya han comenzado a abordarse en nuestro grupo, y se ha iniciado el planteamiento de nuevos proyectos y colaboraciones para dilucidar otros.

10. REFERENCIAS

1. Coffin, J., Haase, A., Levy, J. A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., Temin, H., Toyoshima, K., Varmus, H., Vogt, P., et al. (1986) What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 10.
2. Heeney, J. L., Dalgleish, A. G., Weiss, R. A. (2006) Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 313, 462-6.
3. Rowland-Jones, S. L. and Whittle, H. C. (2007) Out of Africa: what can we learn from HIV-2 about protective immunity to HIV-1? *Nature immunology* 8, 329-31.
4. Peterlin, B. M. and Trono, D. (2003) Hide, shield and strike back: how HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nature reviews. Immunology* 3, 97-107.
5. Wain-Hobson, S., Sonigo, P., Danos, O., Cole, S., Alizon, M. (1985) Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell* 40, 9-17.
6. Greene, W. C. and Peterlin, B. M. (2002) Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature medicine* 8, 673-80.
7. Turner, B. G. and Summers, M. F. (1999) Structural biology of HIV. *Journal of molecular biology* 285, 1-32.
8. Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., Hendrickson, W. A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393, 648-59.
9. Caffrey, M., Cai, M., Kaufman, J., Stahl, S. J., Wingfield, P. T., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. (1997) Determination of the secondary structure and global topology of the 44 kDa ectodomain of gp41 of the simian immunodeficiency virus by multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of molecular biology* 271, 819-26.
10. Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A., Littman, D. R. (2002) DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* 16, 135-44.
11. Kong, L. B., An, D., Ackerson, B., Canon, J., Rey, O., Chen, I. S., Krogstad, P., Stewart, P. L. (1998) Cryoelectron microscopic examination of human immunodeficiency virus type 1 virions with mutations in the cyclophilin A binding loop. *Journal of virology* 72, 4403-7.
12. Doms, R. W. and Trono, D. (2000) The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes & development* 14, 2677-88.
13. Bukrinskaya, A., Brichacek, B., Mann, A., Stevenson, M. (1998) Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcription complex involves the cytoskeleton. *The Journal of experimental medicine* 188, 2113-25.
14. Fackler, O. T. and Peterlin, B. M. (2000) Endocytic entry of HIV-1. *Current biology : CB* 10, 1005-8.
15. Miller, M. D., Farnet, C. M., Bushman, F. D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *Journal of virology* 71, 5382-90.
16. Chen, H. and Engelman, A. (1998) The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15270-4.
17. Simon, V., Ho, D. D., Abdool Karim, Q. (2006) HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *Lancet* 368, 489-504.
18. Fauci, A. S., Pantaleo, G., Stanley, S., Weissman, D. (1996) Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Annals of internal medicine* 124, 654-63.
19. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E., Picker, L. J. (2006) Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nature medicine* 12, 289-95.
20. Douek, D. C., Picker, L. J., Koup, R. A. (2003) T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annual review of immunology* 21, 265-304.
21. Pantaleo, G. and Fauci, A. S. (1996) Immunopathogenesis of HIV infection. *Annual review of microbiology* 50, 825-54.
22. Fauci, A. S. (1993) Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 262, 1011-8.
23. Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T., Douek, D. C. (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* 200, 749-59.

24. Haase, A. T. (2005) Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts. *Nature reviews. Immunology* 5, 783-92.
25. Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., Markowitz, M. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *The Journal of experimental medicine* 200, 761-70.
26. Kunkel, E. J., Boisvert, J., Murphy, K., Vierra, M. A., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Greenberg, H. B., Hodge, M. R., Wu, L., Butcher, E. C., Campbell, J. J. (2002) Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes. *The American journal of pathology* 160, 347-55.
27. Mattapallil, J. J., Douek, D. C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., Roederer, M. (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434, 1093-7.
28. Doms, R. W. (2001) Chemokine receptors and HIV entry. *AIDS* 15 Suppl 1, S34-5.
29. Connor, R. I., Sheridan, K. E., Ceradini, D., Choe, S., Landau, N. R. (1997) Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals. *The Journal of experimental medicine* 185, 621-8.
30. Steinman, R. M., Granelli-Piperno, A., Pope, M., Trumpfheller, C., Ignatius, R., Arrode, G., Racz, P., Tenner-Racz, K. (2003) The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Current topics in microbiology and immunology* 276, 1-30.
31. Wu, L. and KewalRamani, V. N. (2006) Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nature reviews. Immunology* 6, 859-68.
32. de Witte, L., Nabatov, A., Geijtenbeek, T. B. (2008) Distinct roles for DC-SIGN--dendritic cells and Langerhans cells in HIV-1 transmission. *Trends in molecular medicine* 14, 12-9.
33. Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., Salazar-Mather, T. P. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology* 17, 189-220.
34. Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., Berger, E. A. (1996) CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-8.
35. Alter, G. and Altfeld, M. (2009) NK cells in HIV-1 infection: evidence for their role in the control of HIV-1 infection. *Journal of internal medicine* 265, 29-42.
36. Levy, J. A. (2001) The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends in immunology* 22, 312-6.
37. Graziosi, C., Gantt, K. R., Vaccarezza, M., Demarest, J. F., Daucher, M., Saag, M. S., Shaw, G. M., Quinn, T. C., Cohen, O. J., Welbon, C. C., Pantaleo, G., Fauci, A. S. (1996) Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 4386-91.
38. Alter, G., Suscovich, T. J., Teigen, N., Meier, A., Streeck, H., Brander, C., Altfeld, M. (2007) Single-stranded RNA derived from HIV-1 serves as a potent activator of NK cells. *J Immunol* 178, 7658-66.
39. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., Oldstone, M. B. (1994) Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of virology* 68, 6103-10.
40. Stevenson, M. (2003) HIV-1 pathogenesis. *Nature medicine* 9, 853-60.
41. Appay, V. and Sauce, D. (2008) Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *The Journal of pathology* 214, 231-41.
42. Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M. A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., Fauci, A. S. (2005) Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2886-91.
43. De Maria, A. and Moretta, L. (2008) NK cell function in HIV-1 infection. *Current HIV research* 6, 433-40.
44. De Maria, A. and Moretta, L. (2000) HLA-class I-specific inhibitory receptors in HIV-1 infection. *Human immunology* 61, 74-81.

45. Kottlilil, S., Jackson, J. O., Reitano, K. N., O'Shea, M. A., Roby, G., Lloyd, M., Yang, J., Hallahan, C. W., Rehm, C. A., Arthos, J., Lempicki, R., Fauci, A. S. (2007) Innate immunity in HIV infection: enhanced susceptibility to CD95-mediated natural killer cell death and turnover induced by HIV viremia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 46, 151-9.
46. Kovacs, J. A., Lempicki, R. A., Sidorov, I. A., Adelsberger, J. W., Herpin, B., Metcalf, J. A., Sereti, I., Polis, M. A., Davey, R. T., Tavel, J., Falloon, J., Stevens, R., Lambert, L., Dewar, R., Schwartzentruber, D. J., Anver, M. R., Baseler, M. W., Masur, H., Dimitrov, D. S., Lane, H. C. (2001) Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *The Journal of experimental medicine* 194, 1731-41.
47. Badley, A. D., McElhinny, J. A., Leibson, P. J., Lynch, D. H., Alderson, M. R., Paya, C. V. (1996) Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *Journal of virology* 70, 199-206.
48. Boasso, A. and Shearer, G. M. (2008) Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol* 126, 235-42.
49. Bangs, S. C., Baban, D., Cattan, H. J., Li, C. K., McMichael, A. J., Xu, X. N. (2009) Human CD4+ memory T cells are preferential targets for bystander activation and apoptosis. *J Immunol* 182, 1962-71.
50. Picker, L. J. (2006) Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Current opinion in immunology* 18, 399-405.
51. Tilton, J. C., Manion, M. M., Luskin, M. R., Johnson, A. J., Patamawenu, A. A., Hallahan, C. W., Cogliano-Shutta, N. A., Mican, J. M., Davey, R. T., Jr., Kottlilil, S., Lifson, J. D., Metcalf, J. A., Lempicki, R. A., Connors, M. (2008) Human immunodeficiency virus viremia induces plasmacytoid dendritic cell activation in vivo and diminished alpha interferon production in vitro. *Journal of virology* 82, 3997-4006.
52. Douek, D. C., Roederer, M., Koup, R. A. (2009) Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annual review of medicine* 60, 471-84.
53. Langford, S. E., Ananworanich, J., Cooper, D. A. (2007) Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS research and therapy* 4, 11.
54. Deeks, S. G. and Walker, B. D. (2007) Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27, 406-16.
55. Walker, B. D. (2007) Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA* 15, 134-6.
56. Carrington, M., Martin, M. P., van Bergen, J. (2008) KIR-HLA intercourse in HIV disease. *Trends in microbiology* 16, 620-7.
57. Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L. G., Zhang, L., Perelson, A. S., Ho, D. D. (1999) Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *The Journal of experimental medicine* 189, 991-8.
58. Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Santra, S., Sasseville, V. G., Simon, M. A., Lifton, M. A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B. J., Ghayeb, J., Forman, M. A., Montefiori, D. C., Rieber, E. P., Letvin, N. L., Reimann, K. A. (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 283, 857-60.
59. Martin, M. P., Gao, X., Lee, J. H., Nelson, G. W., Detels, R., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Hoots, K., Vlahov, D., Trowsdale, J., Wilson, M., O'Brien, S. J., Carrington, M. (2002) Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS. *Nature genetics* 31, 429-34.
60. Goulder, P. J. and Watkins, D. I. (2008) Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nature reviews. Immunology* 8, 619-30.
61. Giorgi, J. V., Hultin, L. E., McKeating, J. A., Johnson, T. D., Owens, B., Jacobson, L. P., Shih, R., Lewis, J., Wiley, D. J., Phair, J. P., Wolinsky, S. M., Detels, R. (1999) Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *The Journal of infectious diseases* 179, 859-70.
62. Liu, Z., Cumberland, W. G., Hultin, L. E., Prince, H. E., Detels, R., Giorgi, J. V. (1997) Elevated CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4+ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *Journal of acquired*

- immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association 16, 83-92.
63. Silvestri, G., Paiardini, M., Pandrea, I., Lederman, M. M., Sodora, D. L. (2007) Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *The Journal of clinical investigation* 117, 3148-54.
 64. Paiardini, M., Pandrea, I., Apetrei, C., Silvestri, G. (2009) Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses. *Annual review of medicine* 60, 485-95.
 65. Hunt, P. W., Brenchley, J., Sinclair, E., McCune, J. M., Roland, M., Page-Shafer, K., Hsue, P., Emu, B., Krone, M., Lampiris, H., Douek, D., Martin, J. N., Deeks, S. G. (2008) Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *The Journal of infectious diseases* 197, 126-33.
 66. Resino, S., Seoane, E., Gutierrez, M. D., Leon, J. A., Munoz-Fernandez, M. A. (2006) CD4(+) T-cell immunodeficiency is more dependent on immune activation than viral load in HIV-infected children on highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 42, 269-76.
 67. Deeks, S. G., Kitchen, C. M., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narvaez, A. B., Hunt, J. N., Kahn, J. O., Levy, J., McGrath, M. S., Hecht, F. M. (2004) Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 104, 942-7.
 68. Silvestri, G., Sodora, D. L., Koup, R. A., Paiardini, M., O'Neil, S. P., McClure, H. M., Staprans, S. I., Feinberg, M. B. (2003) Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity* 18, 441-52.
 69. Leligodowicz, A., Yindom, L. M., Onyango, C., Sarge-Njie, R., Alabi, A., Cotten, M., Vincent, T., da Costa, C., Aaby, P., Jaye, A., Dong, T., McMichael, A., Whittle, H., Rowland-Jones, S. (2007) Robust Gag-specific T cell responses characterize viremia control in HIV-2 infection. *The Journal of clinical investigation* 117, 3067-74.
 70. Sousa, A. E., Carneiro, J., Meier-Schellersheim, M., Grossman, Z., Victorino, R. M. (2002) CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol* 169, 3400-6.
 71. Hazenberg, M. D., Stuart, J. W., Otto, S. A., Borleffs, J. C., Boucher, C. A., de Boer, R. J., Miedema, F., Hamann, D. (2000) T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* 95, 249-55.
 72. Hellerstein, M., Hanley, M. B., Cesar, D., Siler, S., Papageorgopoulos, C., Wieder, E., Schmidt, D., Hoh, R., Neese, R., Macallan, D., Deeks, S., McCune, J. M. (1999) Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nature medicine* 5, 83-9.
 73. Valdez, H. and Lederman, M. M. (1997) Cytokines and cytokine therapies in HIV infection. *AIDS clinical review*, 187-228.
 74. Lane, H. C., Masur, H., Edgar, L. C., Whalen, G., Rook, A. H., Fauci, A. S. (1983) Abnormalities of B-cell activation and immunoregulation in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *The New England journal of medicine* 309, 453-8.
 75. Okoye, A., Meier-Schellersheim, M., Brenchley, J. M., Hagen, S. I., Walker, J. M., Rohankhedkar, M., Lum, R., Edgar, J. B., Planer, S. L., Legasse, A., Sylwester, A. W., Piatak, M., Jr., Lifson, J. D., Maino, V. C., Sodora, D. L., Douek, D. C., Axthelm, M. K., Grossman, Z., Picker, L. J. (2007) Progressive CD4+ central memory T cell decline results in CD4+ effector memory insufficiency and overt disease in chronic SIV infection. *The Journal of experimental medicine* 204, 2171-85.
 76. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A. E., Victorino, R. M., Paul, W. E. (2002) CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nature medicine* 8, 319-23.
 77. Brenchley, J. M., Karandikar, N. J., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Crotty, L. E., Casazza, J. P., Kuruppu, J., Migueles, S. A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D. C., Koup, R. A. (2003) Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells. *Blood* 101, 2711-20.
 78. Douek, D. C., McFarland, R. D., Keiser, P. H., Gage, E. A., Massey, J. M., Haynes, B. F., Polis, M. A., Haase, A. T., Feinberg, M. B., Sullivan, J. L., Jamieson, B. D., Zack, J. A., Picker, L. J., Koup, R. A. (1998) Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396, 690-5.

79. Schacker, T. W., Nguyen, P. L., Beilman, G. J., Wolinsky, S., Larson, M., Reilly, C., Haase, A. T. (2002) Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *The Journal of clinical investigation* 110, 1133-9.
80. Estes, J. D., Wietgreffe, S., Schacker, T., Southern, P., Beilman, G., Reilly, C., Milush, J. M., Lifson, J. D., Sodora, D. L., Carlis, J. V., Haase, A. T. (2007) Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *The Journal of infectious diseases* 195, 551-61.
81. Grossman, Z., Feinberg, M. B., Paul, W. E. (1998) Multiple modes of cellular activation and virus transmission in HIV infection: a role for chronically and latently infected cells in sustaining viral replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 6314-9.
82. Douek, D. (2007) HIV disease progression: immune activation, microbes, and a leaky gut. *Topics in HIV medicine : a publication of the International AIDS Society, USA* 15, 114-7.
83. Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., Hartmann, G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168, 4531-7.
84. Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
85. Kawai, T. and Akira, S. (2006) Innate immune recognition of viral infection. *Nature immunology* 7, 131-7.
86. Beignon, A. S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D. G., Larsson, M., Gorelick, R. J., Lifson, J. D., Bhardwaj, N. (2005) Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *The Journal of clinical investigation* 115, 3265-75.
87. Lester, R. T., Yao, X. D., Ball, T. B., McKinnon, L. R., Kaul, R., Wachihi, C., Jaoko, W., Plummer, F. A., Rosenthal, K. L. (2008) Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection. *AIDS* 22, 685-94.
88. Beutler, B., Jiang, Z., Georgel, P., Crozat, K., Croker, B., Rutschmann, S., Du, X., Hoebe, K. (2006) Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annual review of immunology* 24, 353-89.
89. Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-31.
90. Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-9.
91. Brenchley, J. M., Price, D. A., Schacker, T. W., Asher, T. E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., Blazar, B. R., Rodriguez, B., Teixeira-Johnson, L., Landay, A., Martin, J. N., Hecht, F. M., Picker, L. J., Lederman, M. M., Deeks, S. G., Douek, D. C. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nature medicine* 12, 1365-71.
92. Funderburg, N., Luciano, A. A., Jiang, W., Rodriguez, B., Sieg, S. F., Lederman, M. M. (2008) Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PloS one* 3, e1915.
93. Mandl, J. N., Barry, A. P., Vanderford, T. H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F. J., Coffman, R. L., Staprans, S. I., Feinberg, M. B. (2008) Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nature medicine* 14, 1077-87.
94. Meier, A., Alter, G., Frahm, N., Sidhu, H., Li, B., Bagchi, A., Teigen, N., Streeck, H., Stellbrink, H. J., Hellman, J., van Lunzen, J., Altfeld, M. (2007) MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *Journal of virology* 81, 8180-91.
95. Meier, A. and Altfeld, M. (2007) Toll-like receptor signaling in HIV-1 infection: a potential target for therapy? *Expert review of anti-infective therapy* 5, 323-6.
96. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and biophysical research communications* 388, 621-5.

97. Schlaepfer, E., Audige, A., Joller, H., Speck, R. F. (2006) TLR7/8 triggering exerts opposing effects in acute versus latent HIV infection. *J Immunol* 176, 2888-95.
98. Schlaepfer, E. and Speck, R. F. (2008) Anti-HIV activity mediated by natural killer and CD8+ cells after toll-like receptor 7/8 triggering. *PLoS one* 3, e1999.
99. Oh, D. Y., Taube, S., Hamouda, O., Kucherer, C., Poggensee, G., Jessen, H., Eckert, J. K., Neumann, K., Storek, A., Pouliot, M., Borgeat, P., Oh, N., Schreier, E., Pruss, A., Hattermann, K., Schumann, R. R. (2008) A functional toll-like receptor 8 variant is associated with HIV disease restriction. *The Journal of infectious diseases* 198, 701-9.
100. Mackelprang, R. D., Bigham, A. W., Celum, C., de Bruyn, G., Beima-Sofie, K., John-Stewart, G., Ronald, A., Mugo, N. R., Buckingham, K. J., Bamshad, M. J., Mullins, J. I., McElrath, M. J., Lingappa, J. R. (2014) Toll-like Receptor Polymorphism Associations With HIV-1 Outcomes Among Sub-Saharan Africans. *The Journal of infectious diseases*.
101. Oh, D. Y., Baumann, K., Hamouda, O., Eckert, J. K., Neumann, K., Kucherer, C., Bartmeyer, B., Poggensee, G., Oh, N., Pruss, A., Jessen, H., Schumann, R. R. (2009) A frequent functional toll-like receptor 7 polymorphism is associated with accelerated HIV-1 disease progression. *AIDS* 23, 297-307.
102. Bochud, P. Y., Hersberger, M., Taffe, P., Bochud, M., Stein, C. M., Rodrigues, S. D., Calandra, T., Francioli, P., Telenti, A., Speck, R. F., Aderem, A. (2007) Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 21, 441-6.
103. Trinchieri, G. (1989) Biology of natural killer cells. *Advances in immunology* 47, 187-376.
104. Herberman, R. B. and Ortaldo, J. R. (1981) Natural killer cells: their roles in defenses against disease. *Science* 214, 24-30.
105. Bonaparte, M. I. and Barker, E. (2004) Killing of human immunodeficiency virus-infected primary T-cell blasts by autologous natural killer cells is dependent on the ability of the virus to alter the expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Blood* 104, 2087-94.
106. Yokoyama, W. M. and Scalzo, A. A. (2002) Natural killer cell activation receptors in innate immunity to infection. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 1513-21.
107. French, A. R. and Yokoyama, W. M. (2003) Natural killer cells and viral infections. *Current opinion in immunology* 15, 45-51.
108. Robertson, M. J., Caligiuri, M. A., Manley, T. J., Levine, H., Ritz, J. (1990) Human natural killer cell adhesion molecules. Differential expression after activation and participation in cytolysis. *J Immunol* 145, 3194-201.
109. Koo, G. C. and Peppard, J. R. (1984) Establishment of monoclonal anti-Nk-1.1 antibody. *Hybridoma* 3, 301-3.
110. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Caligiuri, M. A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 22, 633-40.
111. Fauci, A. S., Mavilio, D., Kottlilil, S. (2005) NK cells in HIV infection: paradigm for protection or targets for ambush. *Nature reviews. Immunology* 5, 835-43.
112. Campbell, J. J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K. E., Hodge, M. R., Wu, L., Butcher, E. C. (2001) Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 166, 6477-82.
113. Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., Caligiuri, M. A. (2003) CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101, 3052-7.
114. Zanoni, I., Granucci, F., Foti, M., Ricciardi-Castagnoli, P. (2007) Self-tolerance, dendritic cell (DC)-mediated activation and tissue distribution of natural killer (NK) cells. *Immunology letters* 110, 6-17.
115. Moretta, L., Bottino, C., Pende, D., Castriconi, R., Mingari, M. C., Moretta, A. (2006) Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Seminars in immunology* 18, 151-8.
116. Mavilio, D., Benjamin, J., Daucher, M., Lombardo, G., Kottlilil, S., Planta, M. A., Marcenaro, E., Bottino, C., Moretta, L., Moretta, A., Fauci, A. S. (2003) Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15011-6.
117. Biron, C. A. (1997) Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Current opinion in immunology* 9, 24-34.
118. Bancroft, G. J. (1993) The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Current opinion in immunology* 5, 503-10.

119. Lanier, L. L. (1998) NK cell receptors. *Annual review of immunology* 16, 359-93.
120. Lanier, L. L. (2001) On guard--activating NK cell receptors. *Nature immunology* 2, 23-7.
121. Moser, J. M., Byers, A. M., Lukacher, A. E. (2002) NK cell receptors in antiviral immunity. *Current opinion in immunology* 14, 509-16.
122. Lodoen, M. B. and Lanier, L. L. (2005) Viral modulation of NK cell immunity. *Nature reviews. Microbiology* 3, 59-69.
123. Cheent, K. and Khakoo, S. I. (2009) Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* 126, 449-57.
124. Karlhofer, F. M., Ribaldo, R. K., Yokoyama, W. M. (1992) MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. *Nature* 358, 66-70.
125. Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L., McMichael, A. J. (1998) HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-9.
126. Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyan, D., Lanier, L. L., Parham, P. (1997) Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7, 753-63.
127. Chang, C., Rodriguez, A., Carretero, M., Lopez-Botet, M., Phillips, J. H., Lanier, L. L. (1995) Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily. *European journal of immunology* 25, 2433-7.
128. Cohen, G. B., Gandhi, R. T., Davis, D. M., Mandelboim, O., Chen, B. K., Strominger, J. L., Baltimore, D. (1999) The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 10, 661-71.
129. Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., Kiessling, R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-8.
130. Stern, P., Gidlund, M., Orn, A., Wigzell, H. (1980) Natural killer cells mediate lysis of embryonal carcinoma cells lacking MHC. *Nature* 285, 341-2.
131. (1997) National AIDS Malignancy Conference. Bethesda, Maryland, April 28-30, 1997. Abstracts. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* 14, A1-54.
132. Iannello, A., Debbeche, O., Samarani, S., Ahmad, A. (2008) Antiviral NK cell responses in HIV infection: II. viral strategies for evasion and lessons for immunotherapy and vaccination. *Journal of leukocyte biology* 84, 27-49.
133. Alter, G., Malenfant, J. M., Delabre, R. M., Burgett, N. C., Yu, X. G., Lichterfeld, M., Zaunders, J., Altfeld, M. (2004) Increased natural killer cell activity in viremic HIV-1 infection. *J Immunol* 173, 5305-11.
134. Kottlil, S., Shin, K., Planta, M., McLaughlin, M., Hallahan, C. W., Ghany, M., Chun, T. W., Sneller, M. C., Fauci, A. S. (2004) Expression of chemokine and inhibitory receptors on natural killer cells: effect of immune activation and HIV viremia. *The Journal of infectious diseases* 189, 1193-8.
135. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., Paxton, W. A. (1996) HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-73.
136. Fehniger, T. A., Herbein, G., Yu, H., Para, M. I., Bernstein, Z. P., O'Brien, W. A., Caligiuri, M. A. (1998) Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol* 161, 6433-8.
137. Goodier, M. R., Imami, N., Moyle, G., Gazzard, B., Gotch, F. (2003) Loss of the CD56hiCD16- NK cell subset and NK cell interferon-gamma production during antiretroviral therapy for HIV-1: partial recovery by human growth hormone. *Clinical and experimental immunology* 134, 470-6.
138. Klotman, M. E., Rapista, A., Teleshova, N., Micsenyi, A., Jarvis, G. A., Lu, W., Porter, E., Chang, T. L. (2008) *Neisseria gonorrhoeae*-induced human defensins 5 and 6 increase HIV infectivity: role in enhanced transmission. *J Immunol* 180, 6176-85.
139. Doss, M., White, M. R., Tecle, T., Hartshorn, K. L. (2010) Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *Journal of leukocyte biology* 87, 79-92.
140. Yang, O. O., Nguyen, P. T., Kalams, S. A., Dorfman, T., Gottlinger, H. G., Stewart, S., Chen, I. S., Threlkeld, S., Walker, B. D. (2002) Nef-mediated resistance of human immunodeficiency virus type 1 to antiviral cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology* 76, 1626-31.

141. Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D., Baltimore, D. (1998) HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 391, 397-401.
142. Bonaparte, M. I. and Barker, E. (2003) Inability of natural killer cells to destroy autologous HIV-infected T lymphocytes. *AIDS* 17, 487-94.
143. Ward, J. and Barker, E. (2008) Role of natural killer cells in HIV pathogenesis. *Current HIV/AIDS reports* 5, 44-50.
144. Martin, M. P., Qi, Y., Gao, X., Yamada, E., Martin, J. N., Pereyra, F., Colombo, S., Brown, E. E., Shupert, W. L., Phair, J., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Kirk, G. D., Telenti, A., Connors, M., O'Brien, S. J., Walker, B. D., Parham, P., Deeks, S. G., McVicar, D. W., Carrington, M. (2007) Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nature genetics* 39, 733-40.
145. Qi, Y., Martin, M. P., Gao, X., Jacobson, L., Goedert, J. J., Buchbinder, S., Kirk, G. D., O'Brien, S. J., Trowsdale, J., Carrington, M. (2006) KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections. *PLoS pathogens* 2, e79.
146. Chehimi, J., Starr, S. E., Frank, I., D'Andrea, A., Ma, X., MacGregor, R. R., Sennelier, J., Trinchieri, G. (1994) Impaired interleukin 12 production in human immunodeficiency virus-infected patients. *The Journal of experimental medicine* 179, 1361-6.
147. Ahmad, R., Sindhu, S. T., Toma, E., Morisset, R., Ahmad, A. (2003) Studies on the production of IL-15 in HIV-infected/AIDS patients. *Journal of clinical immunology* 23, 81-90.
148. Andre, P., Brunet, C., Guia, S., Gallais, H., Sampol, J., Vivier, E., Dignat-George, F. (1999) Differential regulation of killer cell Ig-like receptors and CD94 lectin-like dimers on NK and T lymphocytes from HIV-1-infected individuals. *European journal of immunology* 29, 1076-85.
149. Holm, G. H. and Gabuzda, D. (2005) Distinct mechanisms of CD4+ and CD8+ T-cell activation and bystander apoptosis induced by human immunodeficiency virus type 1 virions. *Journal of virology* 79, 6299-311.
150. Sun, J. C. and Lanier, L. L. (2009) Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *European journal of immunology* 39, 2059-64.
151. Sun, J. C., Beilke, J. N., Lanier, L. L. (2009) Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 457, 557-61.
152. Valentin, A., Rosati, M., Patenaude, D. J., Hatzakis, A., Kostrikis, L. G., Lazanas, M., Wyvill, K. M., Yarchoan, R., Pavlakis, G. N. (2002) Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7015-20.
153. Kottlil, S., Shin, K., Jackson, J. O., Reitano, K. N., O'Shea, M. A., Yang, J., Hallahan, C. W., Lempicki, R., Arthos, J., Fauci, A. S. (2006) Innate immune dysfunction in HIV infection: effect of HIV envelope-NK cell interactions. *J Immunol* 176, 1107-14.
154. Kawasaki, A., Shinkai, Y., Kuwana, Y., Furuya, A., Iigo, Y., Hanai, N., Itoh, S., Yagita, H., Okumura, K. (1990) Perforin, a pore-forming protein detectable by monoclonal antibodies, is a functional marker for killer cells. *International immunology* 2, 677-84.
155. Ballan, W. M., Vu, B. A., Long, B. R., Loo, C. P., Michaelsson, J., Barbour, J. D., Lanier, L. L., Wiznia, A. A., Abadi, J., Fennelly, G. J., Rosenberg, M. G., Nixon, D. F. (2007) Natural killer cells in perinatally HIV-1-infected children exhibit less degranulation compared to HIV-1-exposed uninfected children and their expression of KIR2DL3, NKG2C, and NKp46 correlates with disease severity. *J Immunol* 179, 3362-70.
156. Mela, C. M., Burton, C. T., Imami, N., Nelson, M., Steel, A., Gazzard, B. G., Gotch, F. M., Goodier, M. R. (2005) Switch from inhibitory to activating NKG2 receptor expression in HIV-1 infection: lack of reversion with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 19, 1761-9.
157. De Maria, A., Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Puppo, F., Mavilio, D., Moretta, A., Moretta, L. (2003) The impaired NK cell cytolytic function in viremic HIV-1 infection is associated with a reduced surface expression of natural cytotoxicity receptors (NKp46, NKp30 and NKp44). *European journal of immunology* 33, 2410-8.
158. Goodier, M. R., Mela, C. M., Steel, A., Gazzard, B., Bower, M., Gotch, F. (2007) NKG2C+ NK cells are enriched in AIDS patients with advanced-stage Kaposi's sarcoma. *Journal of virology* 81, 430-3.
159. Conry, S. J., Milkovich, K. A., Yonkers, N. L., Rodriguez, B., Bernstein, H. B., Asaad, R., Heinzl, F. P., Tary-Lehmann, M., Lederman, M. M., Anthony, D. D. (2009) Impaired plasmacytoid dendritic cell (PDC)-NK cell activity in viremic human immunodeficiency virus infection attributable to impairments in both PDC and NK cell function. *Journal of virology* 83, 11175-87.

160. Fogli, M., Costa, P., Murdaca, G., Setti, M., Mingari, M. C., Moretta, L., Moretta, A., De Maria, A. (2004) Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *European journal of immunology* 34, 2313-21.
161. Azzoni, L., Papasavvas, E., Chehimi, J., Kostman, J. R., Mounzer, K., Ondercin, J., Perussia, B., Montaner, L. J. (2002) Sustained impairment of IFN-gamma secretion in suppressed HIV-infected patients despite mature NK cell recovery: evidence for a defective reconstitution of innate immunity. *J Immunol* 168, 5764-70.
162. Weber, K., Meyer, D., Grosse, V., Stoll, M., Schmidt, R. E., Heiken, H. (2000) Reconstitution of NK cell activity in HIV-1 infected individuals receiving antiretroviral therapy. *Immunobiology* 202, 172-8.
163. Sirianni, M. C., Ensoli, F., Alario, C., Fiorelli, V., Sacco, G., Topino, S., Iebba, F., Mezzaroma, I., Aiuti, F. (2001) Distribution of the natural killer-related receptor for HLA-C during highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *Human immunology* 62, 1328-34.
164. Wille-Reece, U., Flynn, B. J., Lore, K., Koup, R. A., Miles, A. P., Saul, A., Kedl, R. M., Mattapallil, J. J., Weiss, W. R., Roederer, M., Seder, R. A. (2006) Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *The Journal of experimental medicine* 203, 1249-58.
165. Schwarz, K., Storni, T., Manolova, V., Didierlaurent, A., Sirard, J. C., Rothlisberger, P., Bachmann, M. F. (2003) Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *European journal of immunology* 33, 1465-70.
166. Chang, J. J. and Altfield, M. (2009) TLR-mediated immune activation in HIV. *Blood* 113, 269-70.
167. Emu, B., Sinclair, E., Hatano, H., Ferre, A., Shacklett, B., Martin, J. N., McCune, J. M., Deeks, S. G. (2008) HLA class I-restricted T-cell responses may contribute to the control of human immunodeficiency virus infection, but such responses are not always necessary for long-term virus control. *Journal of virology* 82, 5398-407.
168. Okulicz, J. F., Marconi, V. C., Landrum, M. L., Wegner, S., Weintrob, A., Ganesan, A., Hale, B., Crum-Cianflone, N., Delmar, J., Barthel, V., Quinnan, G., Agan, B. K., Dolan, M. J. (2009) Clinical outcomes of elite controllers, viremic controllers, and long-term nonprogressors in the US Department of Defense HIV natural history study. *The Journal of infectious diseases* 200, 1714-23.
169. Lee, P. K., Kieffer, T. L., Siliciano, R. F., Nettles, R. E. (2006) HIV-1 viral load blips are of limited clinical significance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 57, 803-5.
170. Altfield, M., Fadda, L., Frlata, D., Bhardwaj, N. (2011) DCs and NK cells: critical effectors in the immune response to HIV-1. *Nature reviews. Immunology* 11, 176-86.
171. Liu, Y. J. (2001) Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106, 259-62.
172. Sabado, R. L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K. V., Siegal, F., Shodell, M., Shah, K., Larsson, M., Lifson, J., Nadas, A., Marmor, M., Hutt, R., Margolis, D., Garmon, D., Markowitz, M., Valentine, F., Borrow, P., Bhardwaj, N. (2010) Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* 116, 3839-52.
173. Fontaine, J., Coutlee, F., Tremblay, C., Routy, J. P., Poudrier, J., Roger, M. (2009) HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *The Journal of infectious diseases* 199, 1007-18.
174. Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M., Hosmalin, A. (2001) Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 98, 3016-21.
175. Chehimi, J., Campbell, D. E., Azzoni, L., Bacheller, D., Papasavvas, E., Jerandi, G., Mounzer, K., Kostman, J., Trinchieri, G., Montaner, L. J. (2002) Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 168, 4796-801.
176. Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., Patterson, S. (2001) Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 98, 2574-6.
177. Soumelis, V., Scott, I., Gheyas, F., Bouhour, D., Cozon, G., Cotte, L., Huang, L., Levy, J. A., Liu, Y. J. (2001) Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98, 906-12.

178. Hong, H. S., Eberhard, J. M., Keudel, P., Bollmann, B. A., Ballmaier, M., Bhatnagar, N., Zielinska-Skowronek, M., Schmidt, R. E., Meyer-Olson, D. (2010) HIV infection is associated with a preferential decline in less-differentiated CD56dim CD16+ NK cells. *Journal of virology* 84, 1183-8.
179. Biswas, S. K. and Lopez-Collazo, E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends in immunology* 30, 475-87.
180. Sailaja, G., Skountzou, I., Quan, F. S., Compans, R. W., Kang, S. M. (2007) Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. *Virology* 362, 331-41.
181. Lore, K., Sonnerborg, A., Brostrom, C., Goh, L. E., Perrin, L., McDade, H., Stellbrink, H. J., Gazzard, B., Weber, R., Napolitano, L. A., van Kooyk, Y., Andersson, J. (2002) Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 16, 683-92.
182. Benlahrech, A., Donaghy, H., Rozis, G., Goodier, M., Klavinskis, L., Gotch, F., Patterson, S. (2009) Human NK Cell Up-regulation of CD69, HLA-DR, Interferon gamma Secretion and Cytotoxic Activity by Plasmacytoid Dendritic Cells is Regulated through Overlapping but Different Pathways. *Sensors (Basel)* 9, 386-403.
183. Borrego, F., Robertson, M. J., Ritz, J., Pena, J., Solana, R. (1999) CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology* 97, 159-65.
184. Gregson, J. N., Steel, A., Bower, M., Gazzard, B. G., Gotch, F. M., Goodier, M. R. (2009) Elevated plasma lipopolysaccharide is not sufficient to drive natural killer cell activation in HIV-1-infected individuals. *AIDS* 23, 29-34.
185. Mallone, R., Funaro, A., Zubiaur, M., Baj, G., Ausiello, C. M., Tacchetti, C., Sancho, J., Grossi, C., Malavasi, F. (2001) Signaling through CD38 induces NK cell activation. *International immunology* 13, 397-409.
186. Mehta, K., Shahid, U., Malavasi, F. (1996) Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10, 1408-17.
187. Hanna, J., Gonen-Gross, T., Fitchett, J., Rowe, T., Daniels, M., Arnon, T. I., Gazit, R., Joseph, A., Schjetne, K. W., Steinle, A., Porgador, A., Mevorach, D., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., LaBarre, M. J., Buckner, J. H., Mandelboim, O. (2004) Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *The Journal of clinical investigation* 114, 1612-23.
188. Boulware, D. R., Meya, D. B., Bergemann, T. L., Wiesner, D. L., Rhein, J., Musubire, A., Lee, S. J., Kambugu, A., Janoff, E. N., Bohjanen, P. R. (2010) Clinical features and serum biomarkers in HIV immune reconstitution inflammatory syndrome after cryptococcal meningitis: a prospective cohort study. *PLoS medicine* 7, e1000384.
189. Eastburn, A., Scherzer, R., Zolopa, A. R., Benson, C., Tracy, R., Do, T., Bacchetti, P., Shlipak, M., Grunfeld, C., Tien, P. C. (2011) Association of low level viremia with inflammation and mortality in HIV-infected adults. *PloS one* 6, e26320.
190. Madden, E., Lee, G., Kotler, D. P., Wanke, C., Lewis, C. E., Tracy, R., Heymsfield, S., Shlipak, M. G., Bacchetti, P., Scherzer, R., Grunfeld, C. (2008) Association of antiretroviral therapy with fibrinogen levels in HIV-infection. *AIDS* 22, 707-15.
191. Neuhaus, J., Jacobs, D. R., Jr., Baker, J. V., Calmy, A., Duprez, D., La Rosa, A., Kuller, L. H., Pett, S. L., Ristola, M., Ross, M. J., Shlipak, M. G., Tracy, R., Neaton, J. D. (2010) Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 201, 1788-95.
192. Lau, B., Sharrett, A. R., Kingsley, L. A., Post, W., Palella, F. J., Visscher, B., Gange, S. J. (2006) C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression. *Archives of internal medicine* 166, 64-70.
193. Gioannini, T. L. and Weiss, J. P. (2007) Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunologic research* 39, 249-60.
194. Triantafilou, M. and Triantafilou, K. (2002) Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends in immunology* 23, 301-4.
195. Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A., Colonna, M. (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature medicine* 5, 919-23.

196. Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., Liu, Y. J. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284, 1835-7.
197. McKenna, K., Beignon, A. S., Bhardwaj, N. (2005) Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *Journal of virology* 79, 17-27.
198. Meier, A., Chang, J. J., Chan, E. S., Pollard, R. B., Sidhu, H. K., Kulkarni, S., Wen, T. F., Lindsay, R. J., Orellana, L., Mildvan, D., Bazner, S., Streeck, H., Alter, G., Lifson, J. D., Carrington, M., Bosch, R. J., Robbins, G. K., Altfeld, M. (2009) Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nature medicine* 15, 955-9.
199. Giorgi, J. V., Lyles, R. H., Matud, J. L., Yamashita, T. E., Mellors, J. W., Hultin, L. E., Jamieson, B. D., Margolick, J. B., Rinaldo, C. R., Jr., Phair, J. P., Detels, R. (2002) Predictive value of immunologic and virologic markers after long or short duration of HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 29, 346-55.
200. Hunt, P. W. (2007) Role of immune activation in HIV pathogenesis. *Current HIV/AIDS reports* 4, 42-7.
201. Sodora, D. L. and Silvestri, G. (2008) Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS* 22, 439-46.
202. Kuri-Cervantes, L., de Oca, G. S., Avila-Rios, S., Hernandez-Juan, R., Reyes-Teran, G. (2014) Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. *Journal of leukocyte biology*.
203. Saez-Cirion, A., Pancino, G., Sinet, M., Venet, A., Lambotte, O. (2007) HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends in immunology* 28, 532-40.
204. Fellay, J., Shianna, K. V., Telenti, A., Goldstein, D. B. (2010) Host genetics and HIV-1: the final phase? *PLoS pathogens* 6, e1001033.
205. Telenti, A. and Ioannidis, J. P. (2006) Susceptibility to HIV infection--disentangling host genetics and host behavior. *The Journal of infectious diseases* 193, 4-6.
206. Blankson, J. N., Bailey, J. R., Thayil, S., Yang, H. C., Lassen, K., Lai, J., Gandhi, S. K., Siliciano, J. D., Williams, T. M., Siliciano, R. F. (2007) Isolation and characterization of replication-competent human immunodeficiency virus type 1 from a subset of elite suppressors. *Journal of virology* 81, 2508-18.
207. Migueles, S. A., Sabbaghian, M. S., Shupert, W. L., Bettinotti, M. P., Marincola, F. M., Martino, L., Hallahan, C. W., Selig, S. M., Schwartz, D., Sullivan, J., Connors, M. (2000) HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2709-14.
208. Saez-Cirion, A., Lacabartz, C., Lambotte, O., Versmisse, P., Urrutia, A., Boufassa, F., Barre-Sinoussi, F., Delfraissy, J. F., Sinet, M., Pancino, G., Venet, A. (2007) HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6776-81.
209. Flores-Villanueva, P. O., Yunis, E. J., Delgado, J. C., Vittinghoff, E., Buchbinder, S., Leung, J. Y., Ugliarolo, A. M., Clavijo, O. P., Rosenberg, E. S., Kalams, S. A., Braun, J. D., Boswell, S. L., Walker, B. D., Goldfeld, A. E. (2001) Control of HIV-1 viremia and protection from AIDS are associated with HLA-Bw4 homozygosity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5140-5.
210. Tilton, J. C., Luskin, M. R., Johnson, A. J., Manion, M., Hallahan, C. W., Metcalf, J. A., McLaughlin, M., Davey, R. T., Jr., Connors, M. (2007) Changes in paracrine interleukin-2 requirement, CCR7 expression, frequency, and cytokine secretion of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells are a consequence of antigen load. *Journal of virology* 81, 2713-25.
211. Noel, N., Boufassa, F., Lecuroux, C., Saez-Cirion, A., Bourgeois, C., Dunyach-Remy, C., Goujard, C., Rouzioux, C., Meyer, L., Pancino, G., Venet, A., Lambotte, O. (2014) Elevated IP10 levels are associated with immune activation and low CD4+ T-cell counts in HIV controller patients. *AIDS* 28, 467-76.
212. Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., Denny, T., Garcia, Z., Kloser, P., Sun, Y., Megjugorac, N., Fitzgerald-Bocarsly, P. (2001) Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin Immunol* 101, 201-10.

213. Alter, G., Teigen, N., Davis, B. T., Addo, M. M., Suscovich, T. J., Waring, M. T., Streeck, H., Johnston, M. N., Staller, K. D., Zaman, M. T., Yu, X. G., Lichterfeld, M., Basgoz, N., Rosenberg, E. S., Altfeld, M. (2005) Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106, 3366-9.
214. Beutler, B. (2004) Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-63.
215. Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., Delneste, Y. (2005) Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol* 175, 1551-7.
216. Pasare, C. and Medzhitov, R. (2004) Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. *Immunity* 21, 733-41.
217. Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 168, 554-61.
218. Heggelund, L., Damas, J. K., Yndestad, A., Holm, A. M., Muller, F., Lien, E., Espevik, T., Aukrust, P., Froland, S. S. (2004) Stimulation of toll-like receptor 2 in mononuclear cells from HIV-infected patients induces chemokine responses: possible pathogenic consequences. *Clinical and experimental immunology* 138, 116-21.
219. Thibault, S., Fromentin, R., Tardif, M. R., Tremblay, M. J. (2009) TLR2 and TLR4 triggering exerts contrasting effects with regard to HIV-1 infection of human dendritic cells and subsequent virus transfer to CD4+ T cells. *Retrovirology* 6, 42.
220. Lester, R. T., Yao, X. D., Ball, T. B., McKinnon, L. R., Omange, W. R., Kaul, R., Wachih, C., Jaoko, W., Rosenthal, K. L., Plummer, F. A. (2009) HIV-1 RNA dysregulates the natural TLR response to subclinical endotoxemia in Kenyan female sex-workers. *PloS one* 4, e5644.
221. Hernandez, J. C., Stevenson, M., Latz, E., Urcuqui-Inchima, S. (2012) HIV type 1 infection up-regulates TLR2 and TLR4 expression and function in vivo and in vitro. *AIDS research and human retroviruses* 28, 1313-28.
222. Bafica, A., Scanga, C. A., Schito, M., Chaussabel, D., Sher, A. (2004) Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J Immunol* 172, 7229-34.
223. Baenziger, S., Heikenwalder, M., Johansen, P., Schlaepfer, E., Hofer, U., Miller, R. C., Diemand, S., Honda, K., Kundig, T. M., Aguzzi, A., Speck, R. F. (2009) Triggering TLR7 in mice induces immune activation and lymphoid system disruption, resembling HIV-mediated pathology. *Blood* 113, 377-88.
224. Zhou, Y., Wang, X., Liu, M., Hu, Q., Song, L., Ye, L., Zhou, D., Ho, W. (2010) A critical function of toll-like receptor-3 in the induction of anti-human immunodeficiency virus activities in macrophages. *Immunology* 131, 40-9.
225. Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G. S., Xu, D., Liew, F. Y. (2004) TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3029-34.
226. Hernandez, J. C., Arteaga, J., Paul, S., Kumar, A., Latz, E., Urcuqui-Inchima, S. (2011) Up-regulation of TLR2 and TLR4 in dendritic cells in response to HIV type 1 and coinfection with opportunistic pathogens. *AIDS research and human retroviruses* 27, 1099-109.
227. Sanders, C. M., Cruse, J. M., Lewis, R. E. (2008) Toll-like receptors, cytokines and HIV-1. *Experimental and molecular pathology* 84, 31-6.
228. Yonkers, N. L., Rodriguez, B., Asaad, R., Lederman, M. M., Anthony, D. D. (2011) Systemic immune activation in HIV infection is associated with decreased MDC responsiveness to TLR ligand and inability to activate naive CD4 T-cells. *PloS one* 6, e23884.
229. Martinson, J. A., Roman-Gonzalez, A., Tenorio, A. R., Montoya, C. J., Gichinga, C. N., Rugeles, M. T., Tomai, M., Krieg, A. M., Ghanekar, S., Baum, L. L., Landay, A. L. (2007) Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cellular immunology* 250, 75-84.
230. Marcondes, M. C., Spina, C., Bustamante, E., Fox, H. (2013) Increased toll-like receptor signaling pathways characterize CD8+ cells in rapidly progressive SIV infection. *BioMed research international* 2013, 796014.

231. Lore, K., Betts, M. R., Brechley, J. M., Kuruppu, J., Khojasteh, S., Perfetto, S., Roederer, M., Seder, R. A., Koup, R. A. (2003) Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol* 171, 4320-8.
232. Sundstrom, J. B., Little, D. M., Villinger, F., Ellis, J. E., Ansari, A. A. (2004) Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. *J Immunol* 172, 4391-401.
233. Victoria, S., Temerozo, J. R., Gobbo, L., Pimenta-Inada, H. K., Bou-Habib, D. C. (2013) Activation of Toll-like receptor 2 increases macrophage resistance to HIV-1 infection. *Immunobiology* 218, 1529-36.
234. Cerovic, V., Jenkins, C. D., Barnes, A. G., Milling, S. W., MacPherson, G. G., Klavinskis, L. S. (2009) Hyporesponsiveness of intestinal dendritic cells to TLR stimulation is limited to TLR4. *J Immunol* 182, 2405-15.
235. Cavaillon, J. M. and Adib-Conquy, M. (2006) Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care* 10, 233.
236. Badou, A., Bennasser, Y., Moreau, M., Leclerc, C., Benkirane, M., Bahraoui, E. (2000) Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway. *Journal of virology* 74, 10551-62.
237. Nazli, A., Kafka, J. K., Ferreira, V. H., Anipindi, V., Mueller, K., Osborne, B. J., Dizzell, S., Chauvin, S., Mian, M. F., Ouellet, M., Tremblay, M. J., Mossman, K. L., Ashkar, A. A., Kovacs, C., Bowdish, D. M., Snider, D. P., Kaul, R., Kaushic, C. (2013) HIV-1 gp120 induces TLR2- and TLR4-mediated innate immune activation in human female genital epithelium. *J Immunol* 191, 4246-58.
238. Ben Haij, N., Leghmari, K., Planes, R., Thieblemont, N., Bahraoui, E. (2013) HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF-alpha and IL-10. *Retrovirology* 10, 123.
239. Abrahams, V. M., Schaefer, T. M., Fahey, J. V., Visintin, I., Wright, J. A., Aldo, P. B., Romero, R., Wira, C. R., Mor, G. (2006) Expression and secretion of antiviral factors by trophoblast cells following stimulation by the TLR-3 agonist, Poly(I : C). *Hum Reprod* 21, 2432-9.
240. Trapp, S., Derby, N. R., Singer, R., Shaw, A., Williams, V. G., Turville, S. G., Bess, J. W., Jr., Lifson, J. D., Robbiani, M. (2009) Double-stranded RNA analog poly(I:C) inhibits human immunodeficiency virus amplification in dendritic cells via type I interferon-mediated activation of APOBEC3G. *Journal of virology* 83, 884-95.
241. Wang, Y. J., Wang, X., Zhang, H., Zhou, L., Liu, S., Kolson, D. L., Song, L., Ye, L., Ho, W. Z. (2009) Expression and regulation of antiviral protein APOBEC3G in human neuronal cells. *Journal of neuroimmunology* 206, 14-21.
242. Zhou, Y., Ye, L., Wan, Q., Zhou, L., Wang, X., Li, J., Hu, S., Zhou, D., Ho, W. (2009) Activation of Toll-like receptors inhibits herpes simplex virus-1 infection of human neuronal cells. *Journal of neuroscience research* 87, 2916-25.
243. Daffis, S., Samuel, M. A., Suthar, M. S., Gale, M., Jr., Diamond, M. S. (2008) Toll-like receptor 3 has a protective role against West Nile virus infection. *Journal of virology* 82, 10349-58.
244. Broering, R., Wu, J., Meng, Z., Hilgard, P., Lu, M., Tripler, M., Szczeponek, A., Gerken, G., Schlaak, J. F. (2008) Toll-like receptor-stimulated non-parenchymal liver cells can regulate hepatitis C virus replication. *Journal of hepatology* 48, 914-22.
245. Lau, Y. F., Tang, L. H., Ooi, E. E. (2009) A TLR3 ligand that exhibits potent inhibition of influenza virus replication and has strong adjuvant activity has the potential for dual applications in an influenza pandemic. *Vaccine* 27, 1354-64.
246. Buitendijk, M., Eszterhas, S. K., Howell, A. L. (2014) Toll-Like Receptor Agonists Are Potent Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus-Type 1 Replication in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *AIDS research and human retroviruses*.
247. Swaminathan, G., Rossi, F., Sierra, L. J., Gupta, A., Navas-Martin, S., Martin-Garcia, J. (2012) A role for microRNA-155 modulation in the anti-HIV-1 effects of Toll-like receptor 3 stimulation in macrophages. *PLoS pathogens* 8, e1002937.
248. Kamath, A. T., Sheasby, C. E., Tough, D. F. (2005) Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN-alpha beta and IFN-gamma. *J Immunol* 174, 767-76.
249. Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., Moretta, A. (2004) CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine

- release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10116-21.
250. Girart, M. V., Fuertes, M. B., Domaica, C. I., Rossi, L. E., Zwirner, N. W. (2007) Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. *J Immunol* 179, 3472-9.
 251. Hammond, T., Lee, S., Watson, M. W., Flexman, J. P., Cheng, W., Fernandez, S., Price, P. (2010) Toll-like receptor (TLR) expression on CD4+ and CD8+ T-cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Cellular immunology* 264, 150-5.
 252. Barblu, L., Machmach, K., Gras, C., Delfraissy, J. F., Boufassa, F., Leal, M., Ruiz-Mateos, E., Lambotte, O., Herbeuval, J. P. (2012) Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon-alpha and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *The Journal of infectious diseases* 206, 790-801.
 253. Machmach, K., Leal, M., Gras, C., Viciani, P., Genebat, M., Franco, E., Boufassa, F., Lambotte, O., Herbeuval, J. P., Ruiz-Mateos, E. (2012) Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *Journal of virology* 86, 4245-52.
 254. Brichacek, B., Vanpouille, C., Kiselyeva, Y., Biancotto, A., Merbah, M., Hirsch, I., Lisco, A., Grivel, J. C., Margolis, L. (2010) Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis. *PloS one* 5.
 255. Bisio, F., Bozzano, F., Marras, F., Di Biagio, A., Moretta, L., De Maria, A. (2013) Successfully treated HIV-infected patients have differential expression of NK cell receptors (NKp46 and NKp30) according to AIDS status at presentation. *Immunology letters* 152, 16-24.
 256. Lichtfuss, G. F., Cheng, W. J., Farsakoglu, Y., Paukovics, G., Rajasuriar, R., Velayudham, P., Kramski, M., Hearps, A. C., Cameron, P. U., Lewin, S. R., Crowe, S. M., Jaworowski, A. (2012) Virologically suppressed HIV patients show activation of NK cells and persistent innate immune activation. *J Immunol* 189, 1491-9.
 257. Marras, F., Nicco, E., Bozzano, F., Di Biagio, A., Dentone, C., Pontali, E., Boni, S., Setti, M., Orofino, G., Mantia, E., Bartolacci, V., Bisio, F., Riva, A., Biassoni, R., Moretta, L., De Maria, A. (2013) Natural killer cells in HIV controller patients express an activated effector phenotype and do not up-regulate NKp44 on IL-2 stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 11970-5.
 258. Naranbhai, V., Abdool Karim, S. S., Altfeld, M., Samsunder, N., Durgiah, R., Sibeko, S., Abdool Karim, Q., Carr, W. H. (2012) Innate immune activation enhances hiv acquisition in women, diminishing the effectiveness of tenofovir microbicide gel. *The Journal of infectious diseases* 206, 993-1001.
 259. Naranbhai, V., Samsunder, N., Sandler, N. G., Roque, A., Abdool Karim, Q., Ndung'u, T., Carr, W. H., Altfeld, M., Douek, D. C., Abdool Karim, S. S. (2013) Neither microbial translocation nor TLR responsiveness are likely explanations for preexisting immune activation in women who subsequently acquired HIV in CAPRISA 004. *J Acquir Immune Defic Syndr* 63, 294-8.
 260. Naranbhai, V., Altfeld, M., Karim, S. S., Ndung'u, T., Karim, Q. A., Carr, W. H. (2013) Changes in Natural Killer cell activation and function during primary HIV-1 Infection. *PloS one* 8, e53251.
 261. Cimarelli, A., Zambruno, G., Marconi, A., Girolomoni, G., Bertazzoni, U., Giannetti, A. (1994) Quantitation by competitive PCR of HIV-1 proviral DNA in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7, 230-5.
 262. Colonna, M., Trinchieri, G., Liu, Y. J. (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature immunology* 5, 1219-26.
 263. Frankel, S. S., Wenig, B. M., Burke, A. P., Mannan, P., Thompson, L. D., Abbondanzo, S. L., Nelson, A. M., Pope, M., Steinman, R. M. (1996) Replication of HIV-1 in dendritic cell-derived syncytia at the mucosal surface of the adenoid. *Science* 272, 115-7.
 264. Macatonia, S. E., Lau, R., Patterson, S., Pinching, A. J., Knight, S. C. (1990) Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology* 71, 38-45.
 265. Rinfret, A., Latendresse, H., Lefebvre, R., St-Louis, G., Jolicoeur, P., Lamarre, L. (1991) Human immunodeficiency virus-infected multinucleated histiocytes in oropharyngeal lymphoid tissues from two asymptomatic patients. *The American journal of pathology* 138, 421-6.
 266. Granelli-Piperno, A., Golebiowska, A., Trumpfheller, C., Siegal, F. P., Steinman, R. M. (2004) HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10

- production and T cell regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7669-74.
267. Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., Hill, B. J., Noto, A., Ancuta, P., Peretz, Y., Fonseca, S. G., Van Grevenynghe, J., Boulassel, M. R., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Routy, J. P., Douek, D. C., Haddad, E. K., Sekaly, R. P. (2010) Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. *Nature medicine* 16, 452-9.
268. Smed-Sorensen, A., Lore, K., Vasudevan, J., Louder, M. K., Andersson, J., Mascola, J. R., Spetz, A. L., Koup, R. A. (2005) Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Journal of virology* 79, 8861-9.
269. Kanga, I., Kahi, S., Develioglu, L., Lichtner, M., Maranon, C., Deveau, C., Meyer, L., Goujard, C., Lebon, P., Sinet, M., Hosmalin, A. (2005) Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *The Journal of infectious diseases* 192, 303-10.
270. Sachdeva, N., Asthana, V., Brewer, T. H., Garcia, D., Asthana, D. (2008) Impaired restoration of plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected patients with poor CD4 T cell reconstitution is associated with decrease in capacity to produce IFN-alpha but not proinflammatory cytokines. *J Immunol* 181, 2887-97.
271. Lehmann, C., Harper, J. M., Taubert, D., Hartmann, P., Fatkenheuer, G., Jung, N., van Lunzen, J., Stellbrink, H. J., Gallo, R. C., Romerio, F. (2008) Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48, 522-30.
272. Kumar, A., Angel, J. B., Aucoin, S., Creery, W. D., Daftarian, M. P., Cameron, D. W., Filion, L., Diaz-Mitoma, F. (1999) Dysregulation of B7.2 (CD86) expression on monocytes of HIV-infected individuals is associated with altered production of IL-2. *Clinical and experimental immunology* 117, 84-91.
273. Dudhane, A., Conti, B., Orlikowsky, T., Wang, Z. Q., Mangla, N., Gupta, A., Wormser, G. P., Hoffmann, M. K. (1996) Monocytes in HIV type 1-infected individuals lose expression of costimulatory B7 molecules and acquire cytotoxic activity. *AIDS research and human retroviruses* 12, 885-92.
274. Barker, E., Bossart, K. N., Fujimura, S. H., Levy, J. A. (1999) The role of CD80 and CD86 in enhancing CD8(+) cell suppression of HIV replication. *Cellular immunology* 196, 95-103.
275. Groot, F., van Capel, T. M., Kapsenberg, M. L., Berkhout, B., de Jong, E. C. (2006) Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood* 108, 1957-64.
276. Herbeuval, J. P., Hardy, A. W., Boasso, A., Anderson, S. A., Dolan, M. J., Dy, M., Shearer, G. M. (2005) Regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand on primary CD4⁺ T cells by HIV-1: role of type I IFN-producing plasmacytoid dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13974-9.
277. Herbeuval, J. P., Smith, N., Theze, J. (2012) Characteristics of plasmacytoid dendritic cell and CD4⁺ T cell in HIV elite controllers. *Clinical & developmental immunology* 2012, 869505.
278. von Sydow, M., Sonnerborg, A., Gaines, H., Strannegard, O. (1991) Interferon-alpha and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients in various stages of HIV-1 infection. *AIDS research and human retroviruses* 7, 375-80.
279. Fonteneau, J. F., Larsson, M., Beignon, A. S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y. J., Lifson, J. D., Littman, D. R., Bhardwaj, N. (2004) Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *Journal of virology* 78, 5223-32.
280. Barber, G. N. (2001) Host defense, viruses and apoptosis. *Cell death and differentiation* 8, 113-26.
281. Herbeuval, J. P., Grivel, J. C., Boasso, A., Hardy, A. W., Chougnat, C., Dolan, M. J., Yagita, H., Lifson, J. D., Shearer, G. M. (2005) CD4⁺ T-cell death induced by infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood* 106, 3524-31.
282. Herbeuval, J. P., Nilsson, J., Boasso, A., Hardy, A. W., Kruhlak, M. J., Anderson, S. A., Dolan, M. J., Dy, M., Andersson, J., Shearer, G. M. (2006) Differential expression of IFN-alpha and TRAIL/DR5 in lymphoid tissue of progressor versus nonprogressor HIV-1-infected patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7000-5.

283. Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A. S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M. A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., Giavedoni, L. D., Lebon, P., Barre-Sinoussi, F., Benecke, A., Muller-Trutwin, M. C. (2009) Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *The Journal of clinical investigation* 119, 3544-55.
284. Manion, M., Rodriguez, B., Medvik, K., Hardy, G., Harding, C. V., Schooley, R. T., Pollard, R., Asmuth, D., Murphy, R., Barker, E., Brady, K. E., Landay, A., Funderburg, N., Sieg, S. F., Lederman, M. M. (2012) Interferon-alpha administration enhances CD8+ T cell activation in HIV infection. *PloS one* 7, e30306.
285. Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R., Aguzzi, A. (2004) Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nature medicine* 10, 187-92.
286. Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F., Patterson, S. (2003) Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 101, 4505-11.
287. Barron, M. A., Blyveis, N., Palmer, B. E., MaWhinney, S., Wilson, C. C. (2003) Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *The Journal of infectious diseases* 187, 26-37.
288. Lopez, C., Fitzgerald, P. A., Siegal, F. P. (1983) Severe acquired immune deficiency syndrome in male homosexuals: diminished capacity to make interferon-alpha in vitro associated with severe opportunistic infections. *The Journal of infectious diseases* 148, 962-6.
289. Siegal, F. P., Lopez, C., Fitzgerald, P. A., Shah, K., Baron, P., Leiderman, I. Z., Imperato, D., Landesman, S. (1986) Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity. *The Journal of clinical investigation* 78, 115-23.
290. Lopez, C., Fitzgerald, P. A., Siegal, F. P., Landesman, S., Gold, J., Krown, S. E. (1984) Deficiency of interferon-alpha generating capacity is associated with susceptibility to opportunistic infections in patients with AIDS. *Annals of the New York Academy of Sciences* 437, 39-48.
291. Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B., Oldstone, M. B. (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature medicine* 12, 1301-9.
292. Brooks, D. G., Lee, A. M., Elsaesser, H., McGavern, D. B., Oldstone, M. B. (2008) IL-10 blockade facilitates DNA vaccine-induced T cell responses and enhances clearance of persistent virus infection. *The Journal of experimental medicine* 205, 533-41.
293. Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., O'Garra, A. (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146, 3444-51.
294. de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., de Vries, J. E. (1991) Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *The Journal of experimental medicine* 174, 915-24.
295. Willems, F., Marchant, A., Delville, J. P., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M., Goldman, M. (1994) Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *European journal of immunology* 24, 1007-9.
296. Steinbrink, K., Wolf, M., Jonuleit, H., Knop, J., Enk, A. H. (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159, 4772-80.
297. Alter, G., Kavanagh, D., Rihn, S., Luteijn, R., Brooks, D., Oldstone, M., van Lunzen, J., Altfeld, M. (2010) IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *The Journal of clinical investigation* 120, 1905-13.
298. Miller, E. and Bhardwaj, N. (2013) Dendritic cell dysregulation during HIV-1 infection. *Immunological reviews* 254, 170-89.
299. McMichael, A. J., Borrow, P., Tomaras, G. D., Goonetilleke, N., Haynes, B. F. (2010) The immune response during acute HIV-1 infection: clues for vaccine development. *Nature reviews. Immunology* 10, 11-23.
300. Stacey, A. R., Norris, P. J., Qin, L., Haygreen, E. A., Taylor, E., Heitman, J., Lebedeva, M., DeCamp, A., Li, D., Grove, D., Self, S. G., Borrow, P. (2009) Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in

- contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *Journal of virology* 83, 3719-33.
301. Krishnan, S., Wilson, E. M., Sheikh, V., Rupert, A., Mendoza, D., Yang, J., Lempicki, R., Migueles, S. A., Sereti, I. (2013) Evidence for Innate Immune System Activation in HIV Type 1-Infected Elite Controllers. *The Journal of infectious diseases*.
 302. Funderburg, N. T., Mayne, E., Sieg, S. F., Asaad, R., Jiang, W., Kalinowska, M., Luciano, A. A., Stevens, W., Rodriguez, B., Brenchley, J. M., Douek, D. C., Lederman, M. M. (2010) Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to in vivo coagulation and immune activation. *Blood* 115, 161-7.
 303. Deeks, S. G. and Phillips, A. N. (2009) HIV infection, antiretroviral treatment, ageing, and non-AIDS related morbidity. *BMJ* 338, a3172.
 304. Boulware, D. R., Hullsiek, K. H., Puro, C. E., Rupert, A., Baker, J. V., French, M. A., Bohjanen, P. R., Novak, R. M., Neaton, J. D., Sereti, I. (2011) 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. *The Journal of infectious diseases* 203, 1637-46.
 305. Kuller, L. H., Tracy, R., Bellosso, W., De Wit, S., Drummond, F., Lane, H. C., Ledergerber, B., Lundgren, J., Neuhaus, J., Nixon, D., Paton, N. I., Neaton, J. D. (2008) Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS medicine* 5, e203.
 306. Sandler, N. G., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M. C., Nixon, D. E., Pedersen, C., Ruxrungtham, K., Lewin, S. R., Emery, S., Neaton, J. D., Brenchley, J. M., Deeks, S. G., Sereti, I., Douek, D. C. (2011) Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 203, 780-90.
 307. Mendez-Lagares, G., Romero-Sanchez, M. C., Ruiz-Mateos, E., Genebat, M., Ferrando-Martinez, S., Munoz-Fernandez, M. A., Pacheco, Y. M., Leal, M. (2013) Long-term suppressive combined antiretroviral treatment does not normalize the serum level of soluble CD14. *The Journal of infectious diseases* 207, 1221-5.
 308. Hurlimann, J., Thorbecke, G. J., Hochwald, G. M. (1966) The liver as the site of C-reactive protein formation. *The Journal of experimental medicine* 123, 365-78.
 309. Du Clos, T. W. and Mold, C. (2004) C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunologic research* 30, 261-77.
 310. Mackiewicz, A., Speroff, T., Ganapathi, M. K., Kushner, I. (1991) Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines. *J Immunol* 146, 3032-7.
 311. Weinhold, B. and Ruther, U. (1997) Interleukin-6-dependent and -independent regulation of the human C-reactive protein gene. *The Biochemical journal* 327 (Pt 2), 425-9.
 312. Li, S. P., Liu, T. Y., Goldman, N. D. (1990) cis-acting elements responsible for interleukin-6 inducible C-reactive protein gene expression. *The Journal of biological chemistry* 265, 4136-42.
 313. Chevalier, M. F., Petitjean, G., Dunyach-Remy, C., Didier, C., Girard, P. M., Manea, M. E., Campa, P., Meyer, L., Rouzioux, C., Lavigne, J. P., Barre-Sinoussi, F., Scott-Algara, D., Weiss, L. (2013) The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation. *PLoS pathogens* 9, e1003453.
 314. Doitsh, G., Galloway, N. L., Geng, X., Yang, Z., Monroe, K. M., Zepeda, O., Hunt, P. W., Hatano, H., Sowinski, S., Munoz-Arias, I., Greene, W. C. (2014) Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature* 505, 509-14.
 315. Jiao, Y., Zhang, T., Wang, R., Zhang, H., Huang, X., Yin, J., Zhang, L., Xu, X., Wu, H. (2012) Plasma IP-10 is associated with rapid disease progression in early HIV-1 infection. *Viral immunology* 25, 333-7.
 316. McManus, C. M., Weidenheim, K., Woodman, S. E., Nunez, J., Hesselgesser, J., Nath, A., Berman, J. W. (2000) Chemokine and chemokine-receptor expression in human glial elements: induction by the HIV protein, Tat, and chemokine autoregulation. *The American journal of pathology* 156, 1441-53.
 317. Peterson, K. E., Robertson, S. J., Portis, J. L., Chesebro, B. (2001) Differences in cytokine and chemokine responses during neurological disease induced by polytropic murine retroviruses Map to separate regions of the viral envelope gene. *Journal of virology* 75, 2848-56.
 318. Potash, M. J., Chao, W., Bentsman, G., Paris, N., Saini, M., Nitkiewicz, J., Belem, P., Sharer, L., Brooks, A. I., Volsky, D. J. (2005) A mouse model for study of systemic HIV-1 infection, antiviral

- immune responses, and neuroinvasiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 3760-5.
319. Wang, E. J., Sun, J., Pettoello-Mantovani, M., Anderson, C. M., Osiecki, K., Zhao, M. L., Lopez, L., Lee, S. C., Berman, J. W., Goldstein, H. (2003) Microglia from mice transgenic for a provirus encoding a monocyte-tropic HIV type 1 isolate produce infectious virus and display in vitro and in vivo upregulation of lipopolysaccharide-induced chemokine gene expression. *AIDS research and human retroviruses* 19, 755-65.
 320. Asensio, V. C., Maier, J., Milner, R., Boztug, K., Kincaid, C., Moulard, M., Phillipson, C., Lindsley, K., Krucker, T., Fox, H. S., Campbell, I. L. (2001) Interferon-independent, human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated induction of CXCL10/IP-10 gene expression by astrocytes in vivo and in vitro. *Journal of virology* 75, 7067-77.
 321. Carsenti-Dellamonica, H., Saidi, H., Ticchioni, M., Guillouet de Salvador, F., Dufayard Cottalorda, J., Garraffo, R., Dellamonica, P., Durant, J., Gougeon, M. L. (2011) The suppression of immune activation during enfuvirtide-based salvage therapy is associated with reduced CCR5 expression and decreased concentrations of circulating interleukin-12 and IP-10 during 48 weeks of longitudinal follow-up. *HIV medicine* 12, 65-77.
 322. Cinque, P., Bestetti, A., Marenzi, R., Sala, S., Gisslen, M., Hagberg, L., Price, R. W. (2005) Cerebrospinal fluid interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) in HIV-1 infection. *Journal of neuroimmunology* 168, 154-63.
 323. Lane, B. R., King, S. R., Bock, P. J., Strieter, R. M., Coffey, M. J., Markovitz, D. M. (2003) The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication. *Virology* 307, 122-34.
 324. Grebely, J., Feld, J. J., Applegate, T., Matthews, G. V., Hellard, M., Sherker, A., Petoumenos, K., Zang, G., Shaw, I., Yeung, B., George, J., Teutsch, S., Kaldor, J. M., Cherepanov, V., Bruneau, J., Shoukry, N. H., Lloyd, A. R., Dore, G. J. (2013) Plasma interferon-gamma-inducible protein-10 (IP-10) levels during acute hepatitis C virus infection. *Hepatology* 57, 2124-34.
 325. Teruya-Feldstein, J., Jaffe, E. S., Burd, P. R., Kanegane, H., Kingma, D. W., Wilson, W. H., Longo, D. L., Tosato, G. (1997) The role of Mig, the monokine induced by interferon-gamma, and IP-10, the interferon-gamma-inducible protein-10, in tissue necrosis and vascular damage associated with Epstein-Barr virus-positive lymphoproliferative disease. *Blood* 90, 4099-105.
 326. Strzelak, A., Komorowska-Piotrowska, A., Ziolkowski, J. (2012) [CXCL10/IP-10 as a new biomarker for Mycobacterium tuberculosis infection]. *Polski merkuriusz lekarski : organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego* 33, 342-5.
 327. Liovat, A. S., Rey-Cuille, M. A., Lecuroux, C., Jacquelin, B., Girault, I., Petitjean, G., Zitoun, Y., Venet, A., Barre-Sinoussi, F., Lebon, P., Meyer, L., Sinet, M., Muller-Trutwin, M. (2012) Acute plasma biomarkers of T cell activation set-point levels and of disease progression in HIV-1 infection. *PLoS one* 7, e46143.
 328. Djoba Siawaya, J. F., Ruhwald, M., Eugen-Olsen, J., Walzl, G. (2007) Correlates for disease progression and prognosis during concurrent HIV/TB infection. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 11, 289-99.
 329. Padovan, E., Spagnoli, G. C., Ferrantini, M., Heberer, M. (2002) IFN-alpha2a induces IP-10/CXCL10 and MIG/CXCL9 production in monocyte-derived dendritic cells and enhances their capacity to attract and stimulate CD8+ effector T cells. *Journal of leukocyte biology* 71, 669-76.
 330. Lajoie, J., Juno, J., Burgener, A., Rahman, S., Mogk, K., Wachihi, C., Mwanjewe, J., Plummer, F. A., Kimani, J., Ball, T. B., Fowke, K. R. (2012) A distinct cytokine and chemokine profile at the genital mucosa is associated with HIV-1 protection among HIV-exposed seronegative commercial sex workers. *Mucosal immunology* 5, 277-87.
 331. Naicker, D. D., Wang, B., Losina, E., Zupkosky, J., Bryan, S., Reddy, S., Jaggernath, M., Mokgoro, M., Goulder, P. J., Kaufmann, D. E., Ndung'u, T. (2012) Association of IL-10-promoter genetic variants with the rate of CD4 T-cell loss, IL-10 plasma levels, and breadth of cytotoxic T-cell lymphocyte response during chronic HIV-1 infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 54, 294-302.
 332. Andrade, R. M., Hygino, J., Kasahara, T. M., Vieira, M. M., Xavier, L. F., Blanco, B., Damasco, P. V., Silva, R. M., Lima, D. B., Oliveira, A. L., Lemos, A. S., Andrade, A. F., Bento, C. A. (2012) High IL-10 production by aged AIDS patients is related to high frequency of Tr-1 phenotype and low in vitro viral replication. *Clin Immunol* 145, 31-43.

333. Villacres, M. C., Kono, N., Mack, W. J., Nowicki, M. J., Anastos, K., Augenbraun, M., Liu, C., Landay, A., Greenblatt, R. M., Gange, S. J., Levine, A. M. (2012) Interleukin 10 responses are associated with sustained CD4 T-cell counts in treated HIV infection. *The Journal of infectious diseases* 206, 780-9.
334. Scalzo, A. A., Lyons, P. A., Fitzgerald, N. A., Forbes, C. A., Yokoyama, W. M., Shellam, G. R. (1995) Genetic mapping of Cmv1 in the region of mouse chromosome 6 encoding the NK gene complex-associated loci Ly49 and musNKR-P1. *Genomics* 27, 435-41.
335. Alter, G. and Altfeld, M. (2011) Mutiny or scrutiny: NK cell modulation of DC function in HIV-1 infection. *Trends in immunology* 32, 219-24.
336. Cosmi, L., De Palma, R., Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Rodolico, G., Querci, V., Abbate, G., Angeli, R., Berrino, L., Fambrini, M., Caproni, M., Tonelli, F., Lazzeri, E., Parronchi, P., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2008) Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *The Journal of experimental medicine* 205, 1903-16.
337. Santarlasci, V., Maggi, L., Capone, M., Frosali, F., Querci, V., De Palma, R., Liotta, F., Cosmi, L., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2009) TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *European journal of immunology* 39, 207-15.
338. Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S. (2008) The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *International immunology* 20, 1361-8.
339. Annunziato, F. and Romagnani, S. (2010) The transient nature of the Th17 phenotype. *European journal of immunology* 40, 3312-6.
340. Klatt, N. R. and Brenchley, J. M. (2010) Th17 cell dynamics in HIV infection. *Current opinion in HIV and AIDS* 5, 135-40.
341. Carson, W. E., Lindemann, M. J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J. C., Chou, C. C., Narula, S., Caligiuri, M. A. (1995) The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood* 85, 3577-85.
342. Couper, K. N., Blount, D. G., Riley, E. M. (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180, 5771-7.
343. Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* 19, 683-765.
344. Kassner, N., Krueger, M., Yagita, H., Dzionek, A., Hutloff, A., Kroczeck, R., Scheffold, A., Rutz, S. (2010) Cutting edge: Plasmacytoid dendritic cells induce IL-10 production in T cells via the Delta-like-4/Notch axis. *J Immunol* 184, 550-4.
345. Boonstra, A., Rajsbaum, R., Holman, M., Marques, R., Asselin-Paturel, C., Pereira, J. P., Bates, E. E., Akira, S., Vieira, P., Liu, Y. J., Trinchieri, G., O'Garra, A. (2006) Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals. *J Immunol* 177, 7551-8.
346. Brenchley, J. M., Price, D. A., Douek, D. C. (2006) HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nature immunology* 7, 235-9.

APÉNDICES.

Tabla A1. Análisis multivariado considerando el **porcentaje de DC plasmacitoides TLR9⁺** como variable dependiente y el porcentaje de linfocitos T CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, porcentaje células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺, porcentaje células NK CD56⁻ CD16⁺ CD38⁺, cantidad de IL-10, IFN- α , IL-12, IP-10, TNF- α e IL-8 como variables independientes en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.

% DC plasmacitoides TLR9⁺

R=0.444, R²=0.666, **p=0.0009**

Variables Independientes	Coefficiente	Error Estándar	p
% CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	0.169	1.052	0.8733
% NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺	-0.807	0.247	0.0022
% NK CD56 ⁻ CD16 ⁺ CD38 ⁺	-0.087	0.187	0.6442
IL-10 (pg/ml)	-0.293	0.385	0.4501
IFN- α (pg/ml)	0.036	0.018	0.0534
IP-10 (pg/ml)	0.003	0.003	0.3374
IL-12 (pg/ml)	-0.467	0.256	0.075
IL-8 (pg/ml)	0.913	0.54	0.0983
TNF- α (pg/ml)	0.254	0.342	0.4614

Tabla A2. Análisis multivariado considerando el **porcentaje de células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺** como variable dependiente y como variables dependientes a la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, cantidad de sCD14, porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, porcentaje de DC plasmacitoides CD80⁺, IL-1 α , IP-10, TNF- α , IL-10, IL-12 y MCP-1 α , y negativa con IL-17 en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.

% Células NK CD56^{dim} CD16⁺ CD38⁺

R=0.753, R²=0.568, **p=0.001**

Variables Independientes	Coefficiente	Error Estándar	P
CV (copias/ml)	2.97 X 10 ⁻⁵	2.27 X 10 ⁻⁵	0.1022
# linfocitos T CD4 ⁺ (cels/ μ l)	-0.016	0.007	0.0368
sCD14 (pg/ml)	-1.08 X 10 ⁻⁵	6.4 X 10 ⁻⁶	0.1022
% CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	0.440	0.705	0.537
% CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	2.63	1.437	0.0767
% DC plasmacitoides CD80 ⁺	-0.001	0.181	0.9952
IL-1 α (pg/ml)	-0.045	0.205	0.8285
IP-10 (pg/ml)	0.001	0.004	0.7814
TNF- α (pg/ml)	0.192	0.247	0.4417
IL-12 (pg/ml)	0.083	0.184	0.6547
IL-10 (pg/ml)	0.011	0.181	0.9685
MCP-1 (pg/ml)	0.03	0.014	0.0371
IL-17 (pg/ml)	0.07	0.224	0.7573

Tabla A3. Análisis multivariado considerando la cantidad de **IP-10** (pg/ml) como variable dependiente y la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, cantidad de sCD14, cantidad de PCR, porcentaje DC plasmacitoides CD80⁺, porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, porcentaje células NK CD38⁺ y 12 citocinas asociadas como variables independientes en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.

IP-10

R=0.999, **R²=0.998**, **p=0.0021**

Variables Independientes	Coefficiente	Error Estándar	p
CV (copias/ml)	-0.002	0.001	0.197
# linfocitos T CD4 ⁺ (cels/ μ l)	-0.031	0.001	0.9444
sCD14 (pg/ml)	-3.44 X 10 ⁻⁴	4.3 X 10 ⁻⁴	0.4755
PCR (mg/dl)	-235.8	118.45	0.1406
% DC plasmacitoides CD80 ⁺	54.5	13.5	0.0273
% CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	636.8	192.5	0.0455
% CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	-149.8	36.5	0.0262
% NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺	22.5	7.7	0.0317
% NK CD56 ^{bright} CD16 ⁻ CD38 ⁺	-11.9	5.5	0.1175
% NK CD56 ⁻ CD16 ⁺ CD38 ⁺	-48.9	13.5	0.0363
Eotaxina (pg/ml)	-1.89	0.791	0.097
GM-CSF (pg/ml)	-328.8	60.11	0.0120
IL-10 (pg/ml)	167.6	18.8	0.003
IL-12 (pg/ml)	98.8	13.1	0.0049
IL-15 (pg/ml)	311.8	118.4	0.0781
IL-1 α (pg/ml)	11.5	7.6	0.2286
IL-2 (pg/ml)	5.04	3.18	0.2111
IL-6 (pg/ml)	-178.9	37.17	0.0184
MCP-1 (pg/ml)	0.065	0.571	0.9162
MIP-1 α (pg/ml)	15.37	34.67	0.6876
MIP-1 β (pg/ml)	12.97	8.9	0.2403
TNF- α (pg/ml)	-92.16	25.4	0.0362

Tabla A4. Análisis multivariado considerando la cantidad de **IL-10** (pg/ml) como variable dependiente y la CV, cuentas de linfocitos T CD4⁺, cantidad de sCD14, porcentaje DC plasmacitoides CD80⁺, porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ CD38⁺ HLA-DR⁺, porcentaje células NK CD38⁺ y 11 citocinas asociadas como variables independientes en un modelo de regresión múltiple en individuos con VIH-1 sin TAR.

IL-10

R=0.964, **R²=0.929**, **p<0.001**

Variables Independientes	Coefficiente	Error Estándar	P
CV (copias/ml)	-8.16 X 10 ⁻⁶	1.01 X 10 ⁻⁶	0.4654
# linfocitos T CD4 ⁺ (cels/μl)	-0.007	0.003	0.0619
sCD14 (pg/ml)	-3.19 X 10 ⁻⁶	3.6 X 10 ⁻⁶	0.3995
% DC plasmacitoides CD80 ⁺	-0.122	0.085	0.1731
% CD4 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	0.107	0.667	0.8743
% CD8 ⁺ CD38 ⁺ HLA-DR ⁺	0.319	0.357	0.3855
% NK CD56 ^{dim} CD16 ⁺ CD38 ⁺	0.016	0.88	0.8565
% NK CD56 ^{bright} CD16 ⁻ CD38 ⁺	0.073	0.071	0.3289
% NK CD56 ⁻ CD16 ⁺ CD38 ⁺	-0.83	0.083	0.3289
G-CSF	0.027	0.036	0.4711
GM-CSF (pg/ml)	1.18	0.463	0.0215
IL-12 (pg/ml)	-0.423	0.104	0.001
IL-15 (pg/ml)	-0.326	1.3	0.801
IL-1 α (pg/ml)	-0.226	0.103	0.0439
IL-6 (pg/ml)	1.89	0.473	0.0012
IP-10 (pg/ml)	0.007	0.002	0.0021
MCP-1 (pg/ml)	-0.003	0.008	0.7262
MIP-1α (pg/ml)	0.126	0.298	0.6781
MIP-1β (pg/ml)	-0.024	0.097	0.8118
TNF-α (pg/ml)	0.270	0.187	0.1689

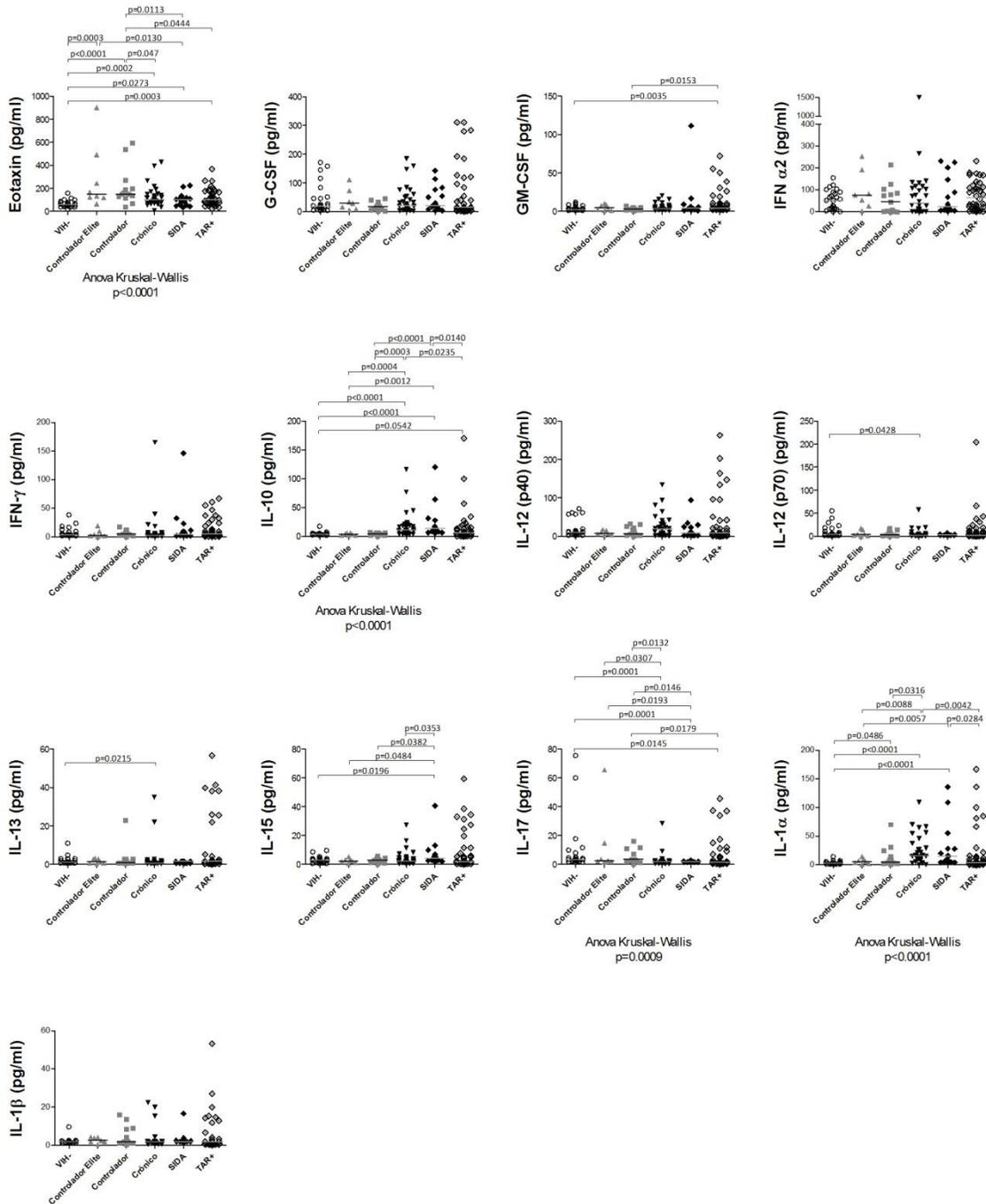
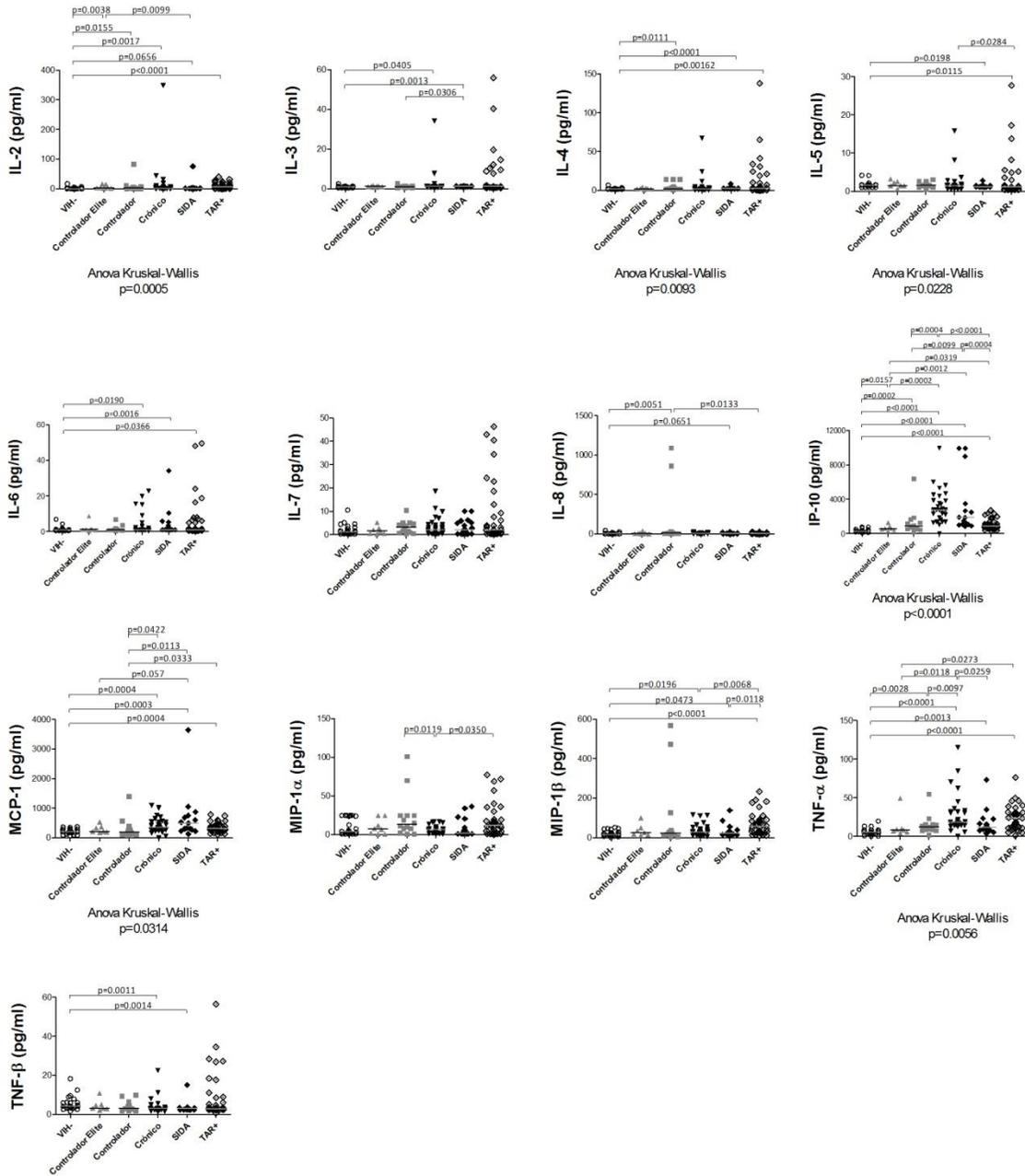


Figura A1. Niveles de citocinas en plasma de individuos infectados con VIH-1 vs. donadores sin VIH-1. Se cuantificaron los niveles citocinas por Luminex a partir de muestras de plasma congelado. Las cajas muestran los valores dentro del rango intercuartil (percentiles 25-75) y los bigotes representan los percentiles 10-90. La línea indica la mediana del grupo.



Continuación Figura A1. Niveles de citocinas en plasma de individuos infectados con VIH-1 vs donadores sin VIH-1.