



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EN PACIENTES
INFECTADOS CON EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA DE
PROGRESIÓN LENTA Y TÍPICOS PROGRESORES A SIDA**

TESIS

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

PRESENTA:

ROSA CAMACHO SANDOVAL

TUTOR: DRA. LAURA C. BONIFAZ ALFONZO

FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. GLADYS DEL C. FRAGOSO GONZALEZ. INST. DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

DR. GUSTAVO REYES TERAN. FACULTAD DE MEDICINA

MÉXICO D.F. JUNIO 2015



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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó como colaboración entre la Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Laura C. Bonifaz Alfonzo y el Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas", bajo la Codirección de la Dra. Perla M del Río Estrada.

El proyecto se realizó con financiamiento de la Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados, Fundación México Vivo y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, número de proyecto: 134511). Durante el desarrollo del proyecto de tesis la sustentante fue becario CONACYT con número de registro 232303.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser parte esencial de mi formación académica y personal. Por mostrarme el grandioso mundo de la Ciencia.

A la Dra. Laura C. Bonifaz Alfonzo por confiar en mí para la realización de este proyecto. Por sus enseñanzas, su asesoría, su compromiso incondicional para desarrollar el proyecto y mi formación profesional. Por ser mi guía en este camino de la Ciencia.

A la Dra. Perla M. del Río Estrada por su asesoría, apoyo y colaboración para el desarrollo del presente trabajo y lo aportado para mi formación. Por ayudarme a crecer.

Al Dr. Gustavo Reyes Terán por brindarme el apoyo necesario para realizar este proyecto y considerarme parte del CIENI.

A la Dra. Gladis del C. Fragoso González por todo el tiempo y asesoría dedicados a mejorar este trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Enrique Espinosa Arciniiega, Dra. Laura Bonifaz Alfonzo, Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Isabel Sada Ovalle y Dra. Patricia A. Volkow Fernández por el tiempo dedicado para conocer este trabajo y por cada una de sus aportaciones para enriquecer este manuscrito.

A Evangelina Vargas por su apoyo en cada trámite a lo largo de esta etapa académica.

A todos y cada uno de los integrantes del CIENI por brindarme su amistad, colaboración y apoyo para realizar este trabajo.

A los pacientes de la cohorte Mexicana por su participación en este estudio.

Hemos sido creados para grandes destinos, solo tenemos que comprenderlos.

Madre Teresa de Calcuta

En dos palabras puedo resumir cuanto he aprendido acerca de la vida: Sigue adelante.

Robert Frost

Lo que pensamos, lo que sabemos, lo que creemos, a fin de cuentas, es de poca importancia. Lo único realmente trascendente es lo que hacemos.

John Ruskin

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein

INDICE

Índice de figuras y tablas	iii
Abreviaturas y acrónimos	v
Resumen	viii
- Abstract	x
1. Antecedentes	
1.1. Generalidades de las células dendríticas	1
1.2. Infección por el VIH y su patogénesis	5
1.3. Células dendríticas en la infección por VIH	8
2. Planteamiento del problema	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivo General	20
5. Objetivos Particulares	20
6. Materiales y Métodos	
6.1. Población de estudio	21
6.2. Carga viral en plasma y conteo de células T CD4 ⁺	21
6.3. Determinación de la frecuencia y número de DC	22
6.4. Determinación de CD14 soluble	23
6.5. Activación de PBMC con ligandos de TLR	23
6.6. Determinación de marcadores de activación por citometría de flujo	23
6.7. Determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo	24
6.8. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo	25
6.9. Análisis estadístico	25

7.	Resultados	
7.1.	Apartado 1. Características de los individuos de estudio	26
7.2.	Apartado 2. La frecuencia y número de DC disminuye en individuos VIH ⁺ y la concentración de CD14 soluble en plasma correlaciona con la CVp	27
7.3.	Apartado 3. Células dendríticas convencionales (cDC)	
7.3.1.	Expresión diferencial de marcadores de activación en cDC de individuos virémicos y CTs, <i>ex vivo</i>	30
7.3.2.	Expresión diferencial de marcadores de superficie en cDC de individuos virémicos y CT en respuesta a ligandos de TLR	32
7.3.3.	Producción diferencial de TNF- α por las cDC de los individuos virémicos y CTs en respuesta a LPS y correlación con CVp	34
7.3.4.	Mayor concentración de TNF- α e IL-1 β en los sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos virémicos en comparación con CTs	38
7.3.5.	Las cDC son la principal población celular de los individuos virémicos que sobreexpresa TNF- α en respuesta a LPS	40
7.4.	Apartado 4. Células dendríticas plasmacitoides (pDC)	
7.4.1.	Expresión diferencial de marcadores de activación en pDC de individuos virémicos y CTs, <i>ex vivo</i>	44
7.4.2.	Expresión diferencial de marcadores de activación en pDC de individuos VIH ⁺ y VIH ⁻ después de estimulación con ligandos de TLR	46
7.4.3.	Producción diferencial de TNF- α por las pDC de los individuos virémicos y CTs en respuesta al estímulo de ssRNA40	48
7.4.4.	Menor concentración de TNF- α , IFN- α e IP-10 en sobrenadantes de cultivo de células de CTs	50
8.	Discusión	52
9.	Conclusiones	62
10.	Referencias	63
	Anexos	71

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Maduración de DC.	4
Figura 2. Participación de las DC en la infección por VIH.	10
Figura 3. Perfil transcripcional de la infección por SIV en hospederos naturales y no naturales.	16
Figura 4. Disminución de la frecuencia de DC en individuos VIH ⁺ y correlación de sCD14 con CVp.	29
Figura 5. Expresión diferencial de moléculas de activación, <i>ex vivo</i> , en cDC de individuos virémicos y controladores.	31
Figura 6. Correlación positiva de la expresión de CD86 y CD47 en cDC de individuos VIH ⁺ .	32
Figura 7. Expresión diferencial de moléculas de activación en cDC de individuos virémicos y controladores después de estimular con LPS o ssRNA40.	34
Figura 8. Producción diferencial de TNF- α por cDC de individuos virémicos y controladores en respuesta al estímulo de LPS.	36
Figura 9. Frecuencia de cDC IL-12 ⁺ en respuesta a ligandos de TLR es similar en individuos virémicos y controladores.	37
Figura 10. Mayor concentración de TNF- α en sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos virémicos estimulados con LPS.	39
Figura 11. Diferente concentración de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos virémicos y controladores estimuladas con LPS.	40
Figura 12. Detección intracelular de TNF- α en diferentes poblaciones celulares.	42
Figura 13. Frecuencia diferencial de cDC IL-1 β ⁺ en individuos virémicos y controladores después de estimular PBMC con LPS.	43
Figura 14. Expresión diferencial de moléculas de activación en pDC de individuos virémicos y controladores, <i>ex vivo</i> .	45
Figura 15. Expresión diferencial de moléculas de activación en pDC de individuos VIH ⁺ y VIH ⁻ después de estimular con CpG o ssRNA40.	47
Figura 16. Producción diferencial de TNF- α por pDC de individuos virémicos y controladores en respuesta al estímulo de ssRNA40.	49

Figura 17. Menor concentración de TNF- α , IFN- α e IP-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos controladores estimuladas con TLR. 51

Suplementarias

Figura I. Estrategia de análisis para la identificación de los subtipos de DC. 71

Figura II. Expresión de TLR-4 y TLR-8 en cDC. 72

Figura III. Estrategia de análisis para identificar células B, células NK, células T CD4+ y monocitos. 73

Tabla 1. Características de los subtipos de DC en humano. 3

Tabla 2. Características de la cohorte de individuos VIH+. 27

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AGM - monos verdes africanos (del inglés African green monkey)

APC - Células presentadora de antígenos (del inglés Antigen presenting cells)

BDCA-2 – antígeno de células dendríticas en sangre 2 (del inglés blood DC antigen -2)

CD – marcador de diferenciación (del inglés cluster of differentiation)

cDC – Células dendríticas convencionales (del inglés conventional dendritic cells)

CpG – regiones de DNA, nucleótidos citosina-guanina enlazados por un fosfato

CTs – controladores

CVp – carga viral en plasma

DC - células dendríticas (del inglés Dendritic cells)

DCIR - inmunoreceptor de DC (del inglés Dendritic cells immunoreceptor)

DC-SIGN – del inglés Dendritic cell-specific intercellular adhesión molecule-3-grabbing non integrin (CD209)

DNA – ácido desoxirribonucleico (del inglés deoxyribonucleic acid)

EndoCAb – del inglés Endogenous endotoxin-core antibody

FMO – control de fluorescencia menos uno (del inglés fluorescence minus one)

HLA-DR – antígeno leucocitario humano (del inglés human leukocyte antigen- DR)

IDO - indoleamina 2,3 dioxigenasa

IFN- α/β – interferón alfa / interferón beta

IL - interleucina

IP-10 – proteína inducible por el interferón γ (del inglés interferon gamma-inducible protein 10)

ISG – gen de respuesta a IFN (del inglés interferon stimulated gene)

LBP – proteína de unión a LPS (del inglés Lipopolysaccharide binding protein)

LC – células de Langerhans (del inglés Langerhans cells)

LPS – lipopolisacárido

MAMP - patrones moleculares asociados a microorganismos (del inglés *microbe associated molecular pattern*)

MFI – mediana de la intensidad de fluorescencia (del inglés *median fluorescence intensity*)

MHC - Complejo principal de histocompatibilidad (del inglés *Major histocompatibility complex*)

miRNA – micro RNA (del inglés *micro ribonucleic acid*)

mRNA – ácido ribonucleico mensajero (del inglés *messenger ribonucleic acid*)

NK – del inglés *natural killer*

PAMP - patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *pathogen associated molecular pattern*)

PBMC – células mononucleares de sangre periférica (del inglés *peripheral blood mononuclear cells*)

pDC – células dendrítica plasmacitoide (del inglés *plasmacytoid dendritic cells*)

PD-L1 – ligando de muerte programada 1 (del inglés *programmed death ligand 1*; también conocido como CD274 o B7-H1)

PD-L2 – ligando de muerte programada 2 (del inglés *programmed death ligand 2*; también conocido como CD273 o B7-DC)

RNA – ácido ribonucleico (del inglés *ribonucleic acid*)

PRR – receptores de reconocimiento de patrón (del inglés *pattern recognition receptors*)

RI – respuesta inmune

RM – macacos rhesus (del inglés *rhesus macaques*)

rpm – revoluciones por minuto

sCD14 – CD14 soluble

SIDA – síndrome de inmunodeficiencia adquirida

SIV – virus de inmunodeficiencia de simios (del inglés *simian immunodeficiency virus*)

SM - sooty mangabey

ssRNA40 - del inglés *single stranded RNA rico en U*

TCR – receptor de células T (del inglés T cell receptor)

TGF- β 1 – factor de crecimiento transformante beta (del inglés transforming growth factor beta).

TLR - Receptores tipo Toll (del inglés Toll like receptors)

TNF- α – factor de necrosis tumoral alfa (del inglés tumor necrosis factor alpha)

TRAIL – ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF (del inglés TNF-related apoptosis inducing ligand)

Treg – T reguladoras

V – virémicos

VIH - virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

Las células dendríticas (DC, del inglés Dendritic cells) son células del sistema inmune innato que en sangre periférica se dividen en DC convencionales (cDC) y DC plasmacitoides (pDC). Las DC expresan una gran variedad de receptores para reconocer componentes bacterianos y virales, entre los que se encuentran los receptores tipo toll (TLR). Al recibir señales a través de TLR las DC se activan y esto tiene como consecuencia un aumento en la expresión de marcadores de activación (CD86, CD80 y CD40) importantes en la interacción con los linfocitos T, además de la producción de citocinas proinflamatorias. En el plasma de los individuos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) adicional a la presencia del virus se ha descrito que existen productos bacterianos circulantes, indicadores del proceso de translocación microbiana del lumen intestinal a la circulación, los cuales favorecen la activación crónica del sistema inmune y progresión de la infección. Se ha descrito que los individuos VIH⁺ capaces de controlar la replicación del virus en ausencia de tratamiento antirretroviral, tienen menor concentración de productos bacterianos en comparación con los individuos progresores los cuales además tienen alta carga viral en circulación. De esta forma es posible que la presencia de productos bacterianos y virales impacte de forma diferente la función de las DC en estos dos grupos de individuos VIH⁺.

Para determinar si la función de las DC se afecta diferencialmente por la presencia de productos bacterianos y virales en los individuos VIH⁺, en el presente trabajo se evaluó si las DC de los individuos VIH⁺ controladores y virémicos tienen diferencias en la expresión de marcadores de activación y capacidad de respuesta a estímulos de activación, como los ligandos de TLR-4/8/9.

Los individuos VIH⁺ se clasificaron en dos grupos de acuerdo a su carga viral en plasma (CVp): controladores (CTs) y virémicos. Se incluyeron como controles individuos no infectados (VIH⁻). La frecuencia y fenotipo de las DC de estos individuos se determinó por citometría de flujo multiparamétrica. Adicionalmente, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se estimularon con ligandos de TLR y se evaluó el cambio en

la expresión de marcadores de activación y la producción intracelular de citocinas en las DC.

Se encontró que las DC de individuos VIH⁺ CTs y virémicos tienen un fenotipo de activación parcial distinto, *ex vivo*. Los individuos virémicos se caracterizaron por la mayor expresión de CD40 en sus cDC y pDC, en tanto que los CTs se diferenciaron por la mayor expresión de CD86 y CD47 en cDC, y sólo CD47 en las pDC. Se encontró que las cDC y pDC de los individuos virémicos en respuesta a LPS y a ssRNA40, respectivamente, presentaron mayor capacidad de producir TNF- α que las DC de los CTs. De forma interesante se encontró que la frecuencia de cDC TNF- α ⁺ correlaciona positivamente con la CVp, lo que sugiere que la producción de TNF- α ⁺ por las cDC pudieran participar en la progresión de la infección.

La activación parcial de las DC y la sobreproducción de TNF- α en los individuos virémicos sugieren que estas células contribuyen a la activación crónica descrita en estos individuos. En contraste, las DC de los CTs parecen tener una respuesta regulada a la activación por TLR, indicando que estos individuos responden de manera diferente a la activación inmune crónica. Estos resultados pueden ser relevantes para el desarrollo de vacunas y terapias contra el VIH en que se propone el uso de DC.

ABSTRACT

Dendritic cells (DC) are cells of the innate immune system, which in peripheral blood are divided in conventional DC (cDC) and plasmacytoid DC (pDC). DC have a large number of receptors that recognize bacterial and viral components, among them Toll-like receptors (TLR). DC's activation through TLR causes the expression of activation markers (CD86, CD80 and CD40) and proinflammatory cytokine production. It has been described that bacterial products circulate in plasma of individuals infected with the human immunodeficiency virus (HIV), may be due to the microbial translocation, which promotes the chronic immune activation and progression of HIV infection. It has been reported that HIV⁺ individuals that partially control virus replication without antiretroviral therapy, have lower concentration of bacterial products than progressing individuals, with high plasma viral load. In this way, it is possible that the presence of bacterial and viral products may have a differential impact on DC function in these two groups of HIV⁺ individuals.

To determine if bacterial and viral products affect DC function in HIV⁺ individuals, we asked if DC from HIV⁺ viremic and controller individuals have a different expression of activation markers and responses to stimulation with TLR ligands (TLR-4/8/9).

We classified HIV⁺ individuals in two groups according to their plasma viral load (pVL): controllers (CTs) and viremics. HIV⁻ individuals were included as controls. The frequency and phenotype of DC were evaluated by multiparametric flow cytometry. In addition, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the different study groups were stimulated with TLR ligands, and the phenotype and intracellular production of cytokines by DC were evaluated.

We found that DC from HIV⁺ viremic and CT individuals showed a differential partially activated phenotype *ex vivo*. The cDC and pDC from viremic individuals were characterized by CD40 expression. In contrast, cDC from CT individuals were characterized by the expression of CD86 and CD47, and pDC only by CD47. After TLR activation the DC showed also different features. cDC and pDC from the viremic individuals produced more TNF- α in response to LPS and ssRNA40 respectively,

compared to cDC and pDC from CTs. However, the percentage of TNF- α ⁺ cDC correlates positively with pVL, which suggests that the increased production of TNF- α ⁺ by cDC might participate in the progression of infection.

The partial activation of DC and the overproduction of TNF- α in response to TLR ligands in HIV⁺ viremic individuals might contribute to the increased chronic activation described in these individuals. In contrast, DC from CTs seem to have a regulated response to TLR activation, indicating that these cells may respond differently to chronic activation. These results may have implications in the development of HIV therapies and vaccines using DC.

1. ANTECEDENTES

Para iniciar una respuesta inmune adaptativa es necesario que los linfocitos T reconozcan a través de su receptor de células T (TCR) péptidos específicos unidos a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), además de señales adicionales dadas por moléculas coestimuladoras y citocinas, indispensables para su activación, expansión y diferenciación. Se ha propuesto que las células dendríticas (DC, del inglés Dendritic cells) pueden ser las células presentadoras de antígeno (APC del inglés antigen presenting cells) más importantes en el inicio de una respuesta inmune (RI) (Bennett et al., 2005; Jung et al., 2002; Muraille et al., 2005). Inclusive dependiendo de las condiciones de su activación pueden polarizar la RI, pero también participar en la inducción de tolerancia inmunológica. De esta forma se propone que una adecuada activación y función de las DC es crucial para inducir una respuesta inmune capaz de controlar una infección y/o favorecer mecanismos de homeostasis, para evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

1.1 Generalidades de las Células Dendríticas

Las DC son una población celular heterogénea (Shortman and Liu, 2002). Todas las DC son capaces de capturar antígenos, procesarlos y presentarlos a linfocitos T "naive", pero difieren en su localización, rutas de migración, función inmunológica y dependencia de infección o estímulo inflamatorio para su generación. Las DC en humanos se han clasificado en dos grupos principales: DC plasmacitoides (pDC) y DC convencionales (cDC).

Las pDC son células redondas, sin morfología de dendrítica, relativamente de larga vida y circulantes, las cuales después de un estímulo viral o infección microbiana producen grandes cantidades de interferones tipo I (IFN- α e IFN- β). El mismo estímulo inflamatorio también inicia la conversión de DC plasmacitoides a una forma dendrítica y la célula adquiere algunas propiedades de procesamiento y presentación de antígenos de DC (Liu, 2005; O'Keeffe et al., 2002; Yoneyama et al., 2004). Se distinguen por la





expresión en su membrana celular de B220, CD123 y niveles intermedios de CD11c (Barchet et al., 2005a).

Las cDC tienen morfología de dendrítica y son eficientes al realizar su función de APC. Esta subpoblación de DC se han dividido en DC migratorias y DC residentes de tejido linfoide. Las cDC migratorias tienen la función de centinelas, capturan antígenos de la periferia y migran a través de la linfa a los ganglios linfáticos en respuesta a estímulos inflamatorios, dicha migración también ocurre en ausencia de inflamación aunque a una menor tasa de migración (Huang and MacPherson, 2001).

Las células de Langerhans (LC) de la epidermis son el modelo de cDC migratorias (Romani et al., 2003; Schuler and Steinman, 1985). En contraste, las cDC residentes no migran a través de la linfa, su función e historia de vida está restringida a un órgano linfoide donde presentan antígenos propios y extraños (Shortman and Naik, 2007).

En humanos las DC que mejor se han estudiado son las que se encuentran en sangre periférica, debido a la fácil disponibilidad de estas muestras y se han clasificado en dos subtipos principalmente: las cDC, que comparten algunos marcadores con las DC migratorias, y las pDC. En la siguiente tabla se resumen algunos marcadores que caracterizan a los diferentes subtipos de DC.

Tabla 1. Características de los subtipos de DC migratorias y de sangre periférica en humano. (Barchet et al., 2005b; Iwasaki and Medzhitov, 2004; Ueno et al., 2007)

	DC migratorias		DC en sangre periférica	
	Epidermis Células de Langerhans	Dermis DC intersticiales	DC convencionales (cDC)	DC plasmacitoides (pDC)
				
Receptores tipo lectina-C	Langerina	DC-SIGN Receptor de manosa	DC-SIGN Receptor de manosa DEC-205	BDCA-2
Moléculas específicas	CD11c CD1a E-caderina	CD11c CD1a/CD14 CD11b CD36 Factor XIIIa	CD11c CD1a ILT1	CD123 ILT7 BDCA-4
TLRs	1, 2, 3, 6, (7), (10)	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	1, 2, 3, 4, 5, 6, (7), 8, 10	1, 6, 7, 9, 10

En la mayoría de tejidos las DC se encuentran en lo que se denomina estado inmaduro, en este estado no son capaces de estimular linfocitos T. Ya que estas células carecen de moléculas accesorias requeridas para la activación de linfocitos T, como CD40, CD80 y CD86; pero se encuentran equipadas para capturar antígenos. Las DC inmaduras pueden identificar patógenos directamente por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) usando receptores de reconocimiento de patrones (PRR) altamente conservados como los receptores tipo Toll (TLR) (Medzhitov et al., 1997). Las cDC y pDC de humanos tienen expresión diferencial de TLR (Gilliet et al., 2008; Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001; Takeuchi and Akira, 2010; Ueno et al., 2007), como se observa en la tabla 1, y se ha sugerido que por

esta expresión diferencial las cDC podrían ser más efectivas en el control de bacterias y las pDC en respuesta a virus.

Una vez que las DC reciben señales de activación, se inicia el proceso de maduración, que tiene como consecuencia la modificación de sus marcadores de superficie, especialmente de moléculas que participan en la activación de los linfocitos T (MHC clase II, CD80, CD86, CD40), además de la secreción de citocinas (IL-12, TNF- α , IFN-I) cruciales para la inducción de respuesta inmune y su polarización. Así también el proceso de maduración de las DC puede inducir tolerancia inmune propiciando la diferenciación a linfocitos Treg. La maduración de las DC se ha asociado también con un aumento en su capacidad de procesar y presentar antígenos, principalmente de origen exógeno por moléculas de MHC clase I (transpresentación) (Gil-Torregrosa et al., 2004).

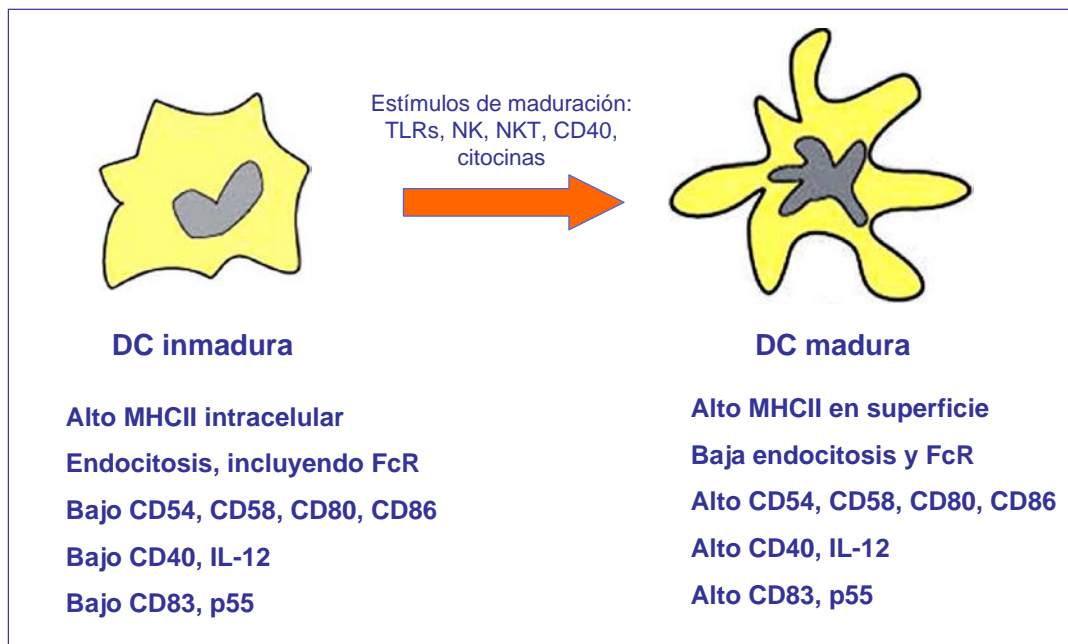


Figura 1. Maduración de DC (Basado en Banchereau & Steinman, 1998).

De acuerdo con lo descrito, las DC son células importantes en el inicio de la respuesta inmune adaptativa, y es posible que tanto las cDC como las pDC tengan un papel

crucial en la infección por VIH para inducir una respuesta de células T específicas contra el virus. Además se ha propuesto que las DC debido a su ubicación y capacidad de migración pueden ser usadas por el VIH para llegar a órganos linfoides, sitios donde el virus se replica e infecta a sus células blanco.

1.2 Infección por el VIH y su Patogénesis

El virus de inmunodeficiencia humana (VIH) infecta principalmente a linfocitos T CD4⁺, dando como resultado pérdida de su función y muerte celular. La pérdida gradual de estas células aumenta la susceptibilidad a infecciones oportunistas y eventualmente culmina en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

El tiempo de progresión hacia la fase de SIDA en los individuos infectados con VIH es variable, y se han categorizado en: progresores típicos, que son la mayoría de los individuos (70-80%), sus linfocitos CD4⁺ disminuyen gradualmente y de no tomar tratamiento desarrollan SIDA en un periodo de entre 6-10 años después de infectarse; rápidos progresores, representan el 10-15% de los individuos con VIH, sus linfocitos T CD4⁺ disminuyen rápidamente y desarrollan SIDA en un periodo de 2 a 3 años después de infectarse y progresores lentos o no progresores de largo plazo que son aquellos individuos (menos del 5%) que permanecen por más de 10 años con las cuentas de linfocitos CD4⁺ en parámetros normales y en general baja carga viral (Langford et al., 2007; Pantaleo and Fauci, 1996). Existe un grupo privilegiado de individuos con VIH que son capaces de controlar la replicación viral de forma natural, por al menos un año, en ausencia de terapia antirretroviral, a estos se les ha denominado controladores virémicos, este grupo mantiene cargas virales en plasma de 50 a 2000 copias de RNA/mL y controladores elite si su carga viral se encuentra indetectable, por debajo de 50 copias de RNA/mL (Walker, 2007). Se sabe que estos individuos mantienen relativamente estable la cuenta de linfocitos T CD4⁺ y que estas células son capaces de proliferar y activarse bajo estimulación con RNA del VIH (Emu et al., 2005). Esto también se ha observado en linfocitos T CD8⁺ (Blankson, 2010; Emu et al., 2005;

Friedrich et al., 2007), la adecuada función de estas células explica al menos parcialmente la contención de la infección.

Adicional a la pérdida de células T CD4⁺, se ha descrito que la activación crónica del sistema inmune en la infección por VIH puede favorecer y predecir la progresión hacia la etapa de SIDA. Lo anterior, debido a que incluye procesos moleculares y celulares (activación de células, proliferación, muerte celular y secreción de moléculas) que trae como consecuencia un estado inflamatorio crónico y daño del tejido linfoide (Appay and Sauce, 2008; Brenchley et al., 2006; Hazenberg et al., 2003; Paiardini and Muller-Trutwin, 2013).

La activación inmune crónica se manifiesta por mayor frecuencia de marcadores de activación (HLA-DR, CD38) y de proliferación (Ki-67) en células T CD4⁺ y CD8⁺, esta activación no se restringe a células específicas contra determinantes del VIH o SIV (virus de inmunodeficiencia en simios), sino involucra la activación de linfocitos T no específicos contra VIH, activados por reactividad cruzada o por citocinas (Paiardini and Muller-Trutwin, 2013). El aumento en el número de linfocitos T CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ se ha asociado con la disminución en la cuenta de células T CD4⁺ y el desarrollo de SIDA (Giorgi and Detels, 1989). Incluso se ha encontrado que la expresión de CD38 en linfocitos T CD8⁺ predice el avance de la enfermedad mejor que la cuenta de células T CD4 y la CVp (Giorgi et al., 1999; Giorgi et al., 2002). Además, se ha documentado que existe un aumento en la concentración de marcadores inmunes en el plasma de los individuos infectados por VIH, entre los primeros que se describieron se encuentran neopterina, beta2 microglobulina, el receptor de TNF II soluble (sTNF-RII), IL-2R (Aziz et al., 1999; Fuchs et al., 1988). Citocinas como factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), IL-1 β e interferón-alfa y gama (IFN- α y IFN- γ) (Barcellini et al., 1996; Jacquelin et al., 2009; Manches and Bhardwaj, 2009b; Rizzardi et al., 1996; Sinicco et al., 1993) y citocinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β 1 (Wiercinska-Drapalo et al., 2004) se encuentran aumentadas en el plasma de individuos infectados con VIH y se han asociado con la progresión a la etapa de SIDA.

También se ha descrito que dentro de las primeras semanas de la infección por VIH o SIV existe una depleción masiva de las células T CD4⁺ de memoria, intraepiteliales y de

lámina propia (Grossman et al., 2006); el número de estas células permanece bajo durante la progresión de la infección. La pérdida de estas células se ha vinculado con el proceso de translocación de productos bacterianos del lumen intestinal a la circulación, favoreciendo la activación crónica del sistema inmune y la progresión de la infección (Brenchley et al., 2006).

Es posible que la muerte celular en el tejido intestinal y mediadores inflamatorios dañen la integridad de las mucosas, lo cual favorezca la translocación de productos bacterianos como el peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos, LPS, flagelina, RNA ribosomal y RNA con repeticiones CpG hipometilado. Estas moléculas son ligandos de receptores tipo Toll (TLR) y pueden participar en la activación de varias poblaciones celulares del sistema inmune e inducir la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IFN-I (Birx 1990, Molina 1989). La presencia de citocinas también promueve el daño a las mucosas volviéndose un ciclo crónico, por ejemplo la sobreproducción de TNF daña la integridad de las barreras epiteliales del tracto gastrointestinal debido a que induce la apoptosis de los enterocitos, favoreciendo la translocación de productos bacterianos (Ruemmele et al., 2002).

Brenchley y colaboradores demostraron que en individuos infectados con VIH y animales susceptibles infectados con SIV hay mayor concentración de LPS en plasma en comparación con individuos no infectados, así como también CD14 soluble (sCD14) y proteína de unión a LPS (LBP) (marcadores indirectos de la presencia de LPS en plasma). La concentración de LPS se encontró asociada positivamente con la concentración de IFN- α y la frecuencia de células T CD8⁺ que expresan los marcadores CD38⁺ y HLA-DR⁺, marcadores de activación crónica. Así mismo, los individuos controladores elite tienen mayor concentración de LPS y sCD14 que los individuos sin VIH pero menor que los individuos que progresan, lo que sugiere que en estos individuos hay translocación de productos bacterianos a pesar de tener cargas virales indetectables. En este trabajo mostraron que los CTs elite tienen mayor concentración de EndoCAb que los individuos progresores, EndoCAb son anticuerpos que se une a LPS y lo elimina de la circulación, lo cual sugiere que los CTs mantienen mecanismos

que atenúan al LPS, disminuyen la activación inmune y la progresión de la infección. Así también los individuos con terapia antirretroviral (carga viral indetectable) disminuye la concentración de LPS en plasma, pero aun así mantienen niveles por arriba de los individuos sin infección. Estos resultados sugieren que el incremento en la translocación de productos bacterianos contribuye directamente a la activación crónica del sistema inmune y determinan la progresión a la etapa de SIDA. (Brenchley et al., 2006).

1.3 Células Dendríticas en la infección por VIH

De acuerdo con la descripción anterior la infección por VIH también involucra factores celulares y moleculares que pueden afectar la función de las DC de estos individuos, lo cual podría ser crucial para inducir una respuesta adaptativa específica contra el VIH.

El VIH potencialmente puede infectar a subpoblaciones de DC, debido a que estas expresan marcadores como CD4, CCR5 y CXCR4, que son proteínas usadas por el VIH para infectar a las células. Varios estudios han demostrado que las DC son susceptibles a ser infectadas por el VIH *in vitro* (Langhoff et al., 1991; Lore et al., 2005; Patterson and Knight, 1987; Smed-Sorensen et al., 2005; Yonezawa et al., 2003) pero la infección de estas células *in vivo* aún está en discusión (Cameron et al., 1992; Donaghy, 2003). Así también se ha reportado que las DC no son el mejor reservorio del VIH *in vivo* (Otero et al., 2003). De igual forma existe controversia en la capacidad de las DC de individuos VIH⁺ para estimular la proliferación de los linfocitos T. Mientras que en algunos trabajos reportan una capacidad baja de las DC para estimular células T alogénicas (Donaghy, 2003), otros reportan que no hay diferencia con sujetos sanos en inducir dicha respuesta (Cameron et al., 1992; Chehimi et al., 2002).

Las DC se encuentran ampliamente distribuidas en todo el organismo y debido a su localización se ha propuesto que son las primeras células que entran en contacto con el VIH, éstas pueden migrar e iniciar la respuesta inmune pero también se sugiere que median la diseminación del virus a las células T en órganos linfoides *in vivo* (Geijtenbeek et al., 2000). Esto se debe a que las DC además de expresar los receptores primarios de unión al VIH (CCR5 y CXCR4) expresan varios receptores

lectina tipo C que pueden unirse a la glicoproteína gp120 de la envoltura del VIH, entre estos receptores se encuentran: langerina (CD207) en las células de Langerhans, el inmunoreceptor de DC (DCIR) en cDC del subepitelio y lamina propia, DC-SIGN y receptor de manosa en DC dérmicas y antígeno de células dendríticas en sangre (BDCA-2) en pDC (Manches et al., 2014). Se ha propuesto que el destino del VIH depende del receptor al que se une, el subtipo de DC, estado de maduración e interacción con otras células. Se ha demostrado que la unión del VIH a DC-SIGN favorece que el virus se mantenga en compartimentos endosomales y no se degrade, así al llegar a órganos linfoides el virus intacto puede entregarse a las células T y llevarse a cabo una sinapsis infecciosa (Geijtenbeek et al., 2000). En cambio la captura del VIH a través de Langerina direcciona los viriones a compartimentos ácidos donde son rápidamente degradados (de Witte et al., 2007). Se ha descrito que las pDC pueden endocitar al VIH y lo mantienen en endosomas tempranos, para favorecer la producción sostenida de interferones tipo I a través de señalización que involucra TLR (O'Brien et al., 2011).

Como se mencionó, la translocación de los productos microbianos puede ser uno de los principales contribuyentes de la activación del sistema inmune innato y por lo tanto de las DC. Los TLR tienen un papel importante en la activación de dichas células ya que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos o microorganismos (PAMP o MAMP). En la figura 2 se propone que, de acuerdo a las funciones descritas de las DC, ambas cDC y pDC pueden contribuir a la eliminación de células infectadas por el VIH al presentar antígenos y activar a las células T CD8⁺, permitiendo su diferenciación a células T citotóxicas. Por la secreción de citocinas inflamatorias, entre ellas IFN-I, las DC pueden inducir la activación de las células NK, las cuales contribuyen a la eliminación de las células infectadas por el VIH. Los IFN-I pueden actuar directamente sobre células infectadas para activar rutas antivirales intrínsecas o pueden inducir la expresión de ligandos como TRAIL para inducir la apoptosis de células infectadas. Las DC también pueden participar en la activación inmune patogénica de la infección por VIH, pues además de trasladar el virus a órganos linfoides, las citocinas proinflamatorias e IFN-I contribuyen a la alteración de la frecuencia de células Th17/Treg en el intestino. Dicho proceso se favorece por la expresión de la enzima

indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO). Este desbalance de células T fomenta la translocación microbiana y la activación crónica de las células del sistema inmune. La persistente inflamación, producción de citocinas e IFN-I pueden favorecer que las células T CD4⁺ de memoria central proliferen y se diferencien a células T de memoria efectora, lo cual aumenta el número de células blanco para el virus y se favorece su depleción. El IFN-I puede inducir la expresión de PD-L1 en la superficie de las DC, inhibiendo la respuesta inmune antiviral (revisado por (Manches et al., 2014)).

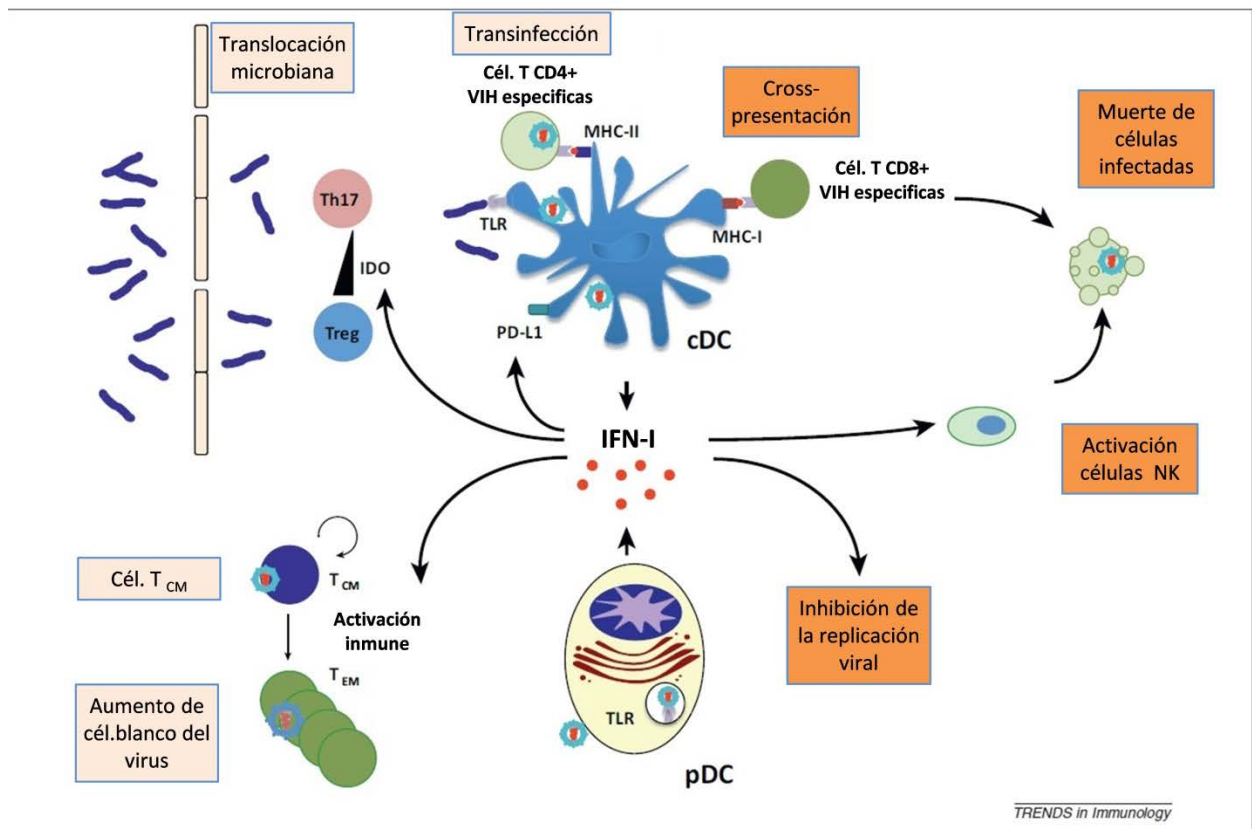


Figura 2. Participación de las DC en la infección por VIH. Las cDC y pDC contribuyen en la eliminación de células infectadas por VIH, pero al mismo tiempo participan en la inmunopatogénesis de la infección. (Modificada de (Manches et al., 2014)).

De acuerdo con la información anterior, una respuesta específica contra el VIH inducida por las cDC y pDC favorecería la eliminación de las células infectadas. Sin embargo, se ha descrito que en los individuos progresores hay una respuesta deficiente de células T

específica contra el VIH (Appay et al., 2000; Appay et al., 2002; Betts et al., 2006). Contrario a lo que se ha observado en los individuos controladores, quienes tienen una respuesta de células T CD4⁺ y CD8⁺ específica contra el VIH (Blankson, 2010; Emu et al., 2005; Friedrich et al., 2007). La diferencia en la respuesta de las células T en estos dos grupos de individuos VIH⁺ podría deberse al estado de activación de las DC y a su capacidad de respuesta a estímulos de activación.

La mayoría de los trabajos reportan que la frecuencia de las cDC y pDC en sangre periférica disminuye en los individuos infectados con VIH (Chehimi et al., 2002; Pacanowski et al., 2001; Sabado et al., 2010) desde la etapa aguda de la infección hasta la etapa crónica, incluyendo a individuos con tratamiento antirretroviral y controladores de la infección, aunque también se ha propuesto que la frecuencia y el número de las pDC en individuos controladores elite son similares a los individuos no infectados (Machmach et al., 2012).

La disminución de las DC se ha asociado con alta carga viral y con cuentas bajas de linfocitos T CD4⁺ (Killian et al., 2006; Lehmann et al., 2008). De acuerdo con esto, se ha propuesto que la disminución de DC en la sangre periférica puede deberse a que estas células mueren o están migrando a otros sitios anatómicos como los órganos linfoides; sitio principal de replicación del VIH (Biancotto et al., 2007; Lehmann et al., 2008; Lehmann et al., 2010).

Se ha demostrado *in vitro* que el VIH puede inducir la maduración de las pDC y favorecer la producción de IFN- α (Fonteneau et al., 2004; Smed-Sorensen et al., 2005; Yonezawa et al., 2003). Sin embargo, se ha observado que las pDC expuestas al VIH producen IFN- α a tiempos más largos y en menor concentración comparado con otros virus como influenza, herpes simple o sendai (Lo et al., 2012). También se ha descrito que las pDC al estar en contacto con células T CD4⁺ infectadas por VIH muestran mayor expresión de marcadores de maduración y producen más IFN- α comparado con el virus solo (Schmidt et al., 2005). A diferencia de las pDC, se ha reportado que las cDC no se activan directamente por contacto con el VIH; pero

adquieren un fenotipo maduro al estar presentes las citocinas producidas por las pDC que estuvieron en contacto con el VIH (Beignon et al., 2005; Fonteneau et al., 2004). Estos resultados sugieren que las DC son capaces de activarse en respuesta al VIH, sin embargo la función de estas células en el contexto de la infección (contacto continuo con el VIH, presencia de componentes bacterianos y microambiente proinflamatorio debido a la activación crónica del sistema inmune) aún requiere ser estudiado.

Mediante estudios *ex vivo* se han evaluado las características fenotípicas y funcionales de las DC (cDC y pDC) en individuos con VIH en sangre periférica. Se ha observado que las DC presentan un fenotipo de activación parcial, que consiste en alta expresión de CD40 en ausencia de otros marcadores de coestimulación (Barron et al., 2003; Dillon et al., 2008). También se ha reportado que las cDC aumentan la expresión de PD-L1 (B7-H1) en individuos infectados con VIH (Wang et al., 2008). Este dato aún está en discusión ya que también se ha reportado que no hay diferencia en la expresión de PD-L1 en cDC (Benlahrech et al., 2012), pero si en pDC. En este último trabajo se propone que son las pDC, y no las cDC, las células disfuncionales en la infección por VIH, esto debido a que muestran mayor expresión de PD-L1 e ILT-3 (moléculas relacionada con la inducción de tolerancia) y menor expresión de ILT-7 (receptor inhibidor de IFN- α) que podría favorecer apoptosis o generación de células T reguladoras y producción sostenida de IFN- α , respectivamente (Benlahrech et al., 2012). En conjunto se ha sugerido que las DC de individuos VIH⁺ no adquieren un fenotipo de activación que permita activar a las células T adecuadamente y este fenotipo podría inducir tolerancia inmunológica.

Como se mencionó, en los individuos con VIH la frecuencia de las pDC se encuentra disminuida en sangre periférica; se ha reportado que estas células, principales productoras de IFN-I, al activarse *in vitro* con estímulos virales como el virus de herpes simple (HSV) o ligandos de TLR-7, tienen menor frecuencia de pDC productoras de IFN- α en comparación con las pDC de individuos no infectados (Feldman et al., 2001;

Martinson et al., 2007a). Inclusive los individuos infectados con VIH en la etapa aguda de la infección tienen menor frecuencia de pDC productoras de IFN- α (Huang et al., 2011). También se ha reportado una disminución en la concentración de IFN- α , presumiblemente por las pDC, en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los individuos VIH⁺ después de estímulos virales como influenza, HSV o ligandos de TLR-7/8/9 en comparación con células de individuos no infectados (Chehimi et al., 2002; Martinson et al., 2007a; Martinson et al., 2007b). Por lo cual, se propone que la disfunción de las pDC se asocia a una baja capacidad para producir IFN tipo I. Contrario a estos resultados, se ha reportado que pDC de los individuos infectados con VIH con viremia baja (CVp<12500 copias de RNA/mL), al ser activadas con CpG, tienen la capacidad de suprimir la replicación del VIH en células T CD4⁺ autólogas. Dicho efecto es mediado por IFN- α , ya que es parcialmente bloqueado por anti-IFN- α R, esto sugiere que las pDC aún mantienen su actividad antiviral (Meyers et al., 2007). En este mismo trabajo se propone que el decremento en el número de pDC en sangre de los individuos infectados con VIH es una muerte mediada por mecanismos de contacto con el virus. Adicionalmente se ha reportado que después de estimular PBMC de individuos VIH⁺ virémicos con CpG o influenza se produce concentraciones similares de IFN- α que en los cultivos celulares de los individuos no infectados, probablemente producido por pDC (Barblu et al., 2012; Machmach et al., 2012).

En cuanto a los controladores elite, se ha reportado que en cultivos de PBMC producen IFN- α en concentración similar que los individuos no infectados en respuesta al VIH (Barblu et al., 2012), o incluso son capaces de secretar mayores cantidades de IFN- α que otros individuos VIH⁺ o VIH⁻, e inhibir la replicación del virus *in vitro* (Machmach et al., 2012). Estos datos sugieren que la producción de IFN- α posiblemente mediada por las pDC en los individuos controladores es necesaria para el control de la viremia.

Adicionalmente se ha reportado mayor expresión del ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL) en las pDC de individuos VIH⁺ virémicos, dicha expresión

correlaciona positivamente con la CV. Estas pDC TRAIL⁺ de individuos VIH⁺ tiene la capacidad de lisar células T autólogas o alógenas de individuos virémicos, y esta función se ve afectada al inhibir IFN- α (Stary et al., 2009). En cambio, las pDC de controladores no expresan TRAIL en superficie (Barblu et al., 2012). Estos resultados sugieren nuevamente una diferencia entre las pDC de los individuos que progresan con la infección del VIH⁺ y las pDC de los controladores, además proponen que los IFN- α tienen un papel crucial en la eliminación de linfocitos T y progresión de la infección.

Para mantener el balance de la respuesta de las pDC, se ha propuesto que se requiere el control del virus que puede tener como consecuencia la eliminación de células infectadas, reducción de la replicación viral y sobrevivencia de células T CD4⁺ no infectadas (Fitzgerald-Bocarsly and Jacobs, 2010).

En el modelo de simios infectados con el virus de inmunodeficiencia de simios (SIV) se ha descrito que las pDC migran a ganglios linfáticos dentro de los primeros 14 días de la infección (Brown et al., 2009; Malleret et al., 2008). Brown y colaboradores, proponen que en ganglios linfáticos es donde las pDC mueren por mecanismos de apoptosis y necrosis, además ahí se encuentran infectadas en frecuencias similares a los linfocitos T CD4⁺. A pesar de esto las pDC remanentes responden a estímulos de TLR-7 produciendo TNF- α e IFN- α . Estas evidencias sugieren que la migración celular y muerte contribuye a la depleción de pDC en la infección aguda de SIV.

Así también se ha encontrado que las pDC en la infección por SIV tienen aumentada la actividad de la enzimaIDO (indoleamina 2,3 dioxigenasa), que está relacionada con la diferenciación a células T reguladoras (Malleret et al., 2008). Además, se ha reportado que pDC de humanos activadas por VIH o agonistas de TLR pueden expresar IDO e inducir la generación de células T reguladoras a partir de células T CD4⁺ naive, esto a través de la vía no canónica de la ruta de NF- κ B (Manches et al., 2012; Manches et al., 2008). Las pDC IDO⁺ pueden regular la conversión de células Th17 a células Treg en condiciones inflamatorias (Baban et al., 2009; Sharma et al., 2009), lo cual podría inhibir la respuesta específica contra las células infectadas por VIH.

Los simios que son hospederos naturales del SIV (“sooty mangabey”; SM o los monos verdes africanos; AGM), son resistente a la progresión a etapas de inmunodeficiencia, y su contraparte, los progresores hospederos no naturales (macacos rhesus; RM) se han empleado para describir los mecanismos de la patogénesis de la infección por SIV/VIH. Se ha reportado que las pDC de SM tienen deficiencia para producir IFN- α en respuesta a SIV o ligandos de TLR-7 y TLR-9 en comparación con pDC de RM, lo que sugiere que la estimulación crónica de las pDC por el SIV en los hospederos no naturales puede participar en la activación crónica del sistema inmune y favorecer la progresión a SIDA (Mandl et al., 2008). Contrario a estos resultados, se ha demostrado que las pDC de los simios hospederos naturales (SM o AGM) y los hospederos no naturales (RM, que progresan a etapas de SIDA) se activan por SIV y son capaces de producir concentraciones similares de IFN-I (Bosinger et al., 2009; Diop et al., 2008; Jacquelin et al., 2009). Estos trabajos muestran que la producción de IFN-I y los genes de respuesta a IFN-I (ISG) en los hospederos naturales tienen un efecto transitorio, únicamente se presenta en la etapa aguda de la infección y posteriormente regresa a niveles basales. Esto no sucede en los macacos rhesus donde hay una expresión sostenida de IFN-I e ISG, figura 3. Por ello se ha sugerido que los hospederos naturales del SIV tienen mecanismos de regulación activos que mantienen baja activación del sistema inmune e inhiben la progresión a etapas de SIDA (Manches and Bhardwaj, 2009a).

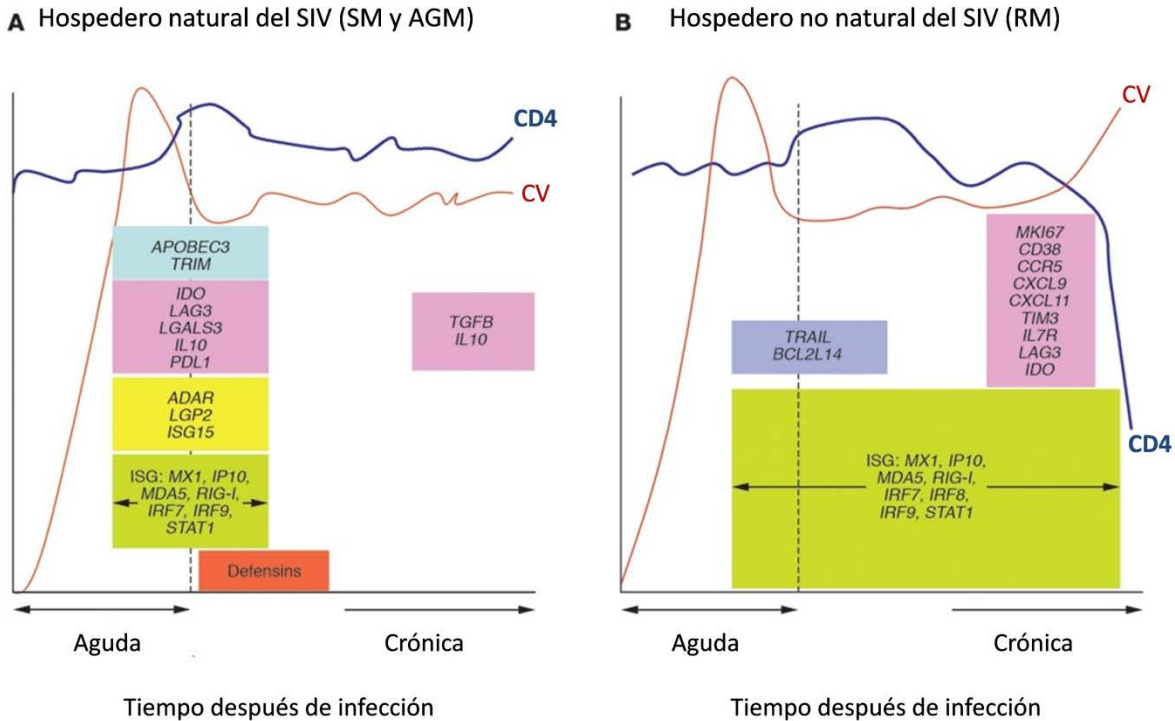


Figura 3. Perfil transcripcional de la infección por SIV en hospederos naturales y no naturales. (Modificada de (Manches and Bhardwaj, 2009a)). (A) La infección por SIV en SM y AGM se caracteriza por mantener el número de células T CD4⁺ estables y controlar la carga viral (CV). (B) En RM la infección por SIV se caracteriza por pérdida gradual de células T CD4⁺ y corresponde a pérdida en el control de la viremia. Se muestra el aumento de factores de restricción viral (azul), genes asociados con la regulación de la activación de células T (rosa), defensas antimicrobianas (rojo), genes de respuesta a IFN (ISG; verde) y supresores de la respuesta de IFN (amarillo), En púrpura, factores que favorecen apoptosis.

Las características funcionales de las cDC de los individuos infectados con VIH controladores y virémicos han sido poco estudiadas. Algunos estudios han reportado que las cDC de sangre periférica de individuos que progresan en la infección con VIH tienen una débil respuesta alogénica, en reacciones leucocitarias mixtas (Donaghy, 2003). En cambio, se ha reportado que las cDC de individuos controladores tienen una mayor capacidad para expandir células T alogénicas en comparación con individuos progresores y no infectados (Huang et al., 2010). Además, estas cDC de los individuos controladores tienen una menor respuesta de producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-12) al ser estimuladas con ligandos de TLR-7/8 en comparación con

los sujetos progresores (Chang et al., 2012; Huang et al., 2010). Huang y colaboradores, mostraron que las cDC de los individuos controladores tienen mayor expresión de las moléculas ILT2 e ILT5 comparada con individuos progresores y no infectados, y proponen que la expresión de dichas moléculas participa en su capacidad aloestimuladora de células T y en el control de producción de citocinas (Huang et al., 2010). Adicionalmente se ha reportado que cDC de individuos VIH⁺ progresores expresan la enzima IDO, no así las cDC de controladores, asociándose con la alteración en el balance de células Th17/Treg que tiene como consecuencia la progresión de la infección (Favre et al., 2010).

Algunos trabajos han incluido a las cDC en la etapa temprana de la infección por VIH, para determinar si la alteración en la función de estas células ocurre durante la infección aguda o se debe al continuo contacto con el VIH y al proceso inflamatorio crónico. Se ha reportado que las cDC de individuos en etapa aguda de la infección tienen una reducida capacidad para inducir una respuesta alogénica de células T CD4⁺ y CD8⁺, mientras que en el inicio de la etapa crónica no hay diferencia con individuos no infectados, lo cual sugiere un defecto transitorio y reversible en la capacidad presentadora de antígeno de las cDC. (Huang et al., 2011). Adicionalmente las cDC de los individuos VIH⁺ en la etapa aguda de la infección tienen una baja capacidad para producir citocinas como TNF- α e IL-12p70 en respuesta a ligandos de TLR-7/8 (Huang et al., 2011). Estos datos sugieren que las cDC sufren cambios en la etapa aguda de la infección y estos podrían mantenerse o acentuarse durante la etapa crónica.

La participación de las DC en la activación inmune no se ha reportado, sin embargo se ha descrito que una población de monocitos que expresan el marcador MDC8 se incrementa en sujetos progresores y con el estímulo de LPS secretan grandes cantidades de TNF- α , esto sugiere que la sobreproducción de citocinas pro-inflamatorias podría estar involucrada en la hiperactivación del sistema inmune favoreciendo la progresión de la infección (Dutertre et al., 2012).

De todo lo anterior, la estimulación continua de las DC por productos bacterianos provenientes de la translocación microbiana, el contacto con el VIH y el medio pro-inflamatorio que se encuentra en los individuos VIH⁺ pueden favorecer que las DC tengan un fenotipo y función que contribuya a la activación crónica del sistema inmune. Para determinar el papel que tienen las DC en la inmunopatogénesis del VIH, específicamente su participación en la activación crónica del sistema inmune y evaluar si los productos bacterianos afectan la función de las DC. Diseñamos ensayos para caracterizar el fenotipo y la función de las DC en individuos virémicos y controladores, este último grupo como se mencionó mantiene CVp y niveles de activación inmune crónica bajos, factores que pueden influir en la función de las DC y comprometer su respuesta frente al VIH.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las DC al activarse a través de ligandos de TLR expresan marcadores de activación y producen citocinas proinflamatorias. Una producción exacerbada de estas citocinas podría contribuir al estado de activación inmune crónica que se ha descrito en los individuos infectados por VIH.

La mayoría de los reportes hasta el momento han descrito que el número de cDC y pDC se encuentra disminuido en la sangre periférica de los individuos infectados con VIH. Sin embargo, no existen datos concluyentes que determinen cuál es la función de las DC en el contexto de la infección por VIH.

Los productos bacterianos presentes en los individuos VIH⁺, debido al daño en mucosas, podrían estimular continuamente a las DC y exacerbar la producción de citocinas o en contraste inducir un estado de no respuesta. Se ha reportado que en los individuos controladores hay menor concentración de productos bacterianos comparado con los individuos virémicos. También se ha descrito que los individuos virémicos tienen mayor frecuencia de DC que producen citocinas en respuesta a ligandos de TLR-7/8 en comparación con los controladores, lo que sugiere que las DC de individuos virémicos y CTs pueden responder diferencialmente en el contexto de la infección por VIH.

En el presente trabajo nos preguntamos si existen diferencias en la expresión de marcadores de activación y capacidad de respuesta a ligandos de TLR-4/8 en las cDC y TLR-7/8/9 en las pDC de los individuos controladores y virémicos. Estas diferencias pudieran ayudar a entender cuál es la contribución de las DC a la activación crónica del sistema inmune en estos grupos de estudio, lo cual es importante en la patogenia de la enfermedad.

3. HIPÓTESIS

Las DC de individuos controladores y progresores de la infección con VIH tienen diferencias en la expresión de marcadores de activación y en su capacidad de producir citocinas ante estimulación con ligandos de TLR-4/8/9.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existen diferencias en la expresión de marcadores de activación y en la capacidad de producción de citocinas en las DC de individuos controladores y progresores infectados con VIH.

5. OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar *ex-vivo* la expresión de marcadores de activación (CD86 y CD40) y CD47, como molécula de respuesta a IFN, en DC de individuos VIH⁺ controladores y progresores.

Determinar la expresión de marcadores de activación y CD47 en DC de individuos VIH⁺ controladores y progresores después de estimular con ligandos de TLR (TLR-4/8/9).

Determinar la producción de citocinas proinflamatorias intracelulares, en DC de individuos VIH⁺ controladores y progresores, después de activar con ligandos de TLR.

Determinar la producción de citocinas proinflamatorias en sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos VIH⁺ controladores y progresores, después de activar con ligandos de TLR.

Evaluar si existe correlación entre la función de las DC y los datos clínicos como carga viral y cuenta de células T CD4⁺ en los sujetos de estudio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Población de estudio

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) "Ismael Cosío Villegas", México D.F. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del INER (B33-10), de acuerdo a la Declaración de Helsinki. Los individuos incluidos en el estudio firmaron un consentimiento informado después de que se les explicó en qué consistía el estudio y se les entregó una copia del mismo.

Se reclutaron individuos infectado con VIH que se encontraban en la etapa crónica de la infección, y se dividieron en dos grupos de acuerdo a su carga viral en plasma (CVp): controladores (CT, individuos VIH⁺ que en ausencia de terapia antirretroviral mantienen CVp <2,000 copias de RNA/mL por al menos un año antes y durante el estudio, n=18) e individuos virémicos o progresores (individuos VIH⁺ que son vírgenes a la terapia antirretroviral y con CVp >10,000 copias de RNA/mL, n=30). Individuos sin VIH (VIH⁻) se incluyeron como grupo control (n=45). Se excluyeron del estudio los individuos que estuvieran en coinfección con hepatitis C o B.

6.2. Carga Viral en plasma y conteo de células T CD4⁺

A los individuos VIH⁺ se les realizó como ensayo de rutina la detección de carga viral en plasma (número de copias de RNA/mL) y el conteo de células T CD4⁺. La carga viral en plasma se cuantificó por PCR en tiempo real automatizado usando el sistema m2000 (Abbott Laboratories, Abbot Park, IL). El intervalo de detección para la CVp va de 40 a 10,000,000 copias/mL. El conteo de células T CD4⁺ se determinó usando el kit TruCount (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences, San José, CA).

6.3. Determinación de la frecuencia y número de DC

Se recolectó sangre venosa de los individuos VIH⁺ y VIH⁻ en tubos con anticoagulante ácido-citrato-dextrosa (ACD), se separó el plasma inmediatamente y se congeló a -80 °C. Del paquete celular se obtuvieron células mononucleares (PBMC, del inglés peripheral blood mononuclear cells) por centrifugación de gradiente de densidad (Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Norway) y se marcaron con diferentes anticuerpos monoclonales: anti-CD3 FITC (clona UCHT1; eBioscience), anti-CD14 FITC (clona 61D3; eBioscience), anti-CD19 FITC (HIB19; eBioscience), anti-CD56 FITC (clona B159; BD Biosciences), anti-HLA-DR APC-Cy7 (clona L243; BD Biosciences), anti-CD11c PE-Cy5 (clona B-ly6; BD Biosciences), y anti-CD123 PerCP-Cy5.5 (clona 7G3; BD Biosciences). Se usó el marcador Live/Dead Aqua (Invitrogen-Life Technologies, Carlsbad, CA) para excluir del análisis a las células muertas. Las DC se identificaron como células CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻ y CD56⁻ (LIN⁻), HLA-DR⁺ y los dos subtipos de DC se distinguieron por la expresión de CD11c⁺ (cDC) y CD123⁺ (pDC).

Una vez obtenidas las PBMC se distribuyeron en tubos de citometría (2-3x10⁶ células por tubo), se lavaron con PBS y se incubaron por 20 min con el marcador Live/Dead Aqua a 4°C. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min. Después las células se incubaron con la mezcla de anticuerpos monoclonales diluidos en buffer de marcaje (BioLegend, San Diego, CA) por 30 min a 4°C. Una vez concluido el tiempo de incubación las células se lavaron con buffer de marcaje, se centrifugaron y fijaron con formalina al 1%. Posteriormente las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACSAria II (BD Biosciences, San José, CA), y se adquirieron un mínimo de 2,000 eventos de células LIN⁻HLA-DR⁺. Todos los análisis se realizaron con el software Flowjo versión 7.6.2. (Tree Star).

El número de DC por microlito de sangre se calculó multiplicando la frecuencia de cDC o pDC (% de PBMC vivas) por la cuenta de células CD45⁺, que fue determinada usando el kit TruCount (determinación independiente en muestra de sangre total usando un citómetro de flujo FACSCanto II, BD Bioscience).

6.4. Determinación de CD14 soluble

La molécula CD14 soluble (sCD14) se evaluó como un indicador de translocación microbiana (Brenchley et al., 2006). La determinación de esta molécula se realizó en plasma de los individuos de estudio, que se colectó y congeló inmediatamente a -80 °C. Se usó el kit Quantikine ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) para evaluar la concentración de sCD14, se hizo una dilución 1:200 de los plasmas y se siguieron las indicaciones del fabricante. La medición se realizó con un lector de absorbancia en placa ELx808 (BioTek, Winooski, VT).

6.5. Activación de PBMC con ligandos de TLR

PBMC de los individuos VIH⁻, controladores o individuos virémicos VIH⁺, se diluyeron en medio R10 (RPMI 1640 [Lonza, Walkersville, MD] suplementado con 10% SFB [Lonza], 2 mM L-glutamina, 100 U/mL penicilina and 100 µg/mL estreptomina) en una densidad de 2×10^6 células/por pozo y se distribuyeron en una placa de 96 pozos. Las células se cultivaron en ausencia o presencia de ligandos de TLR: lipopolisacárido en concentración de 2 µg/mL (LPS; Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri), ssRNA40 en 5 µg/mL (InvivoGen, San Diego, CA) o CpG-ODN2216 2 µM por 18 h a 37 °C y 5% CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de activación se recuperaron las células para determinar el fenotipo de las DC y los sobrenadantes para determinar la producción de citocinas, como se describirá posteriormente.

6.6. Determinación de marcadores de activación por citometría de flujo

PBMC ex vivo o estimuladas se marcaron con una combinación de anticuerpos monoclonales para identificar a las DC, cDC (LIN⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺) y pDC (LIN⁻ HLA-DR⁺ CD123⁺) y analizar la expresión de marcadores de activación (CD86 y CD40) y CD47 como una molécula que se expresa en respuesta a IFN, haciendo uso de citometría de flujo.

Los anticuerpos monoclonales que se emplearon en estos experimentos fueron: anti-CD3 FITC o biotina (clona UCHT1; eBioscience), anti-CD14 FITC o biotina (clona 61D3; eBioscience), anti-CD19 FITC o biotina (clona HIB19; eBioscience), anti-CD56 FITC o biotina (clona B159; BD Biosciences), estreptavidina Alexa Fluor V450 (eBioscience) o estreptavidina PE Texas red (BD Biosciences), anti-HLA-DR APC-Cy7 (clona L243; BD Biosciences), anti-CD11c PE-Cy5 (clona B-ly6; BD Biosciences) o Alexa 700 (clona 3.9; eBioscience), anti-CD123 PerCP-Cy5.5 (clona 7G3; BD Biosciences), anti-CD40 PE (clona 5C3; eBioscience), anti-CD86 PE (clona 2331-FUN-1; BD Biosciences) o PE-Cy5 (clona IT2.2; eBioscience), y anti-CD47 FITC (clona B6H12; BD Biosciences). Las PBMC se marcaron y analizaron como se describió en la sección anterior. El control de fluorescencia menos uno (FMO) se usó para determinar la región de células negativas/positivas.

6.7. Determinación de citocinas intracelulares por citometría de flujo

Para la detección de citocinas intracelulares, al cultivo de PBMC se les agrego Golgi Plug (brefeldina A, BD Biosciences) después de 4 horas de estimulación con los ligandos de TLR o a las células en ausencia de estímulo. Se evaluó la producción de TNF- α , IFN- α , IL-12 e IL-1 β por DC (LIN⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ o LIN⁻ HLA-DR⁺ CD123⁺), células NK (CD56⁺), células B (CD19⁺), células T (CD3⁺CD4⁺) y monocitos (CD14⁺). Para esto se marcaron con diferentes anticuerpos monoclonales específicos de proteínas de superficie: anti-CD3 biotina (clona UCHT1; eBioscience), anti-CD14 biotina (clona 61D3; eBioscience), anti-CD19 biotina (clona HIB19; eBioscience), anti-CD56 biotina (clona B159; BD Biosciences), estreptavidina PE Texas red (BD Biosciences), anti-HLA-DR APC-Cy7 (clona L243; BD Biosciences), anti-CD11c Alexa 700 (clona 3.9; BD Biosciences), anti-CD123 PerCP-Cy5.5 (clona 7G3; BD Biosciences), anti-CD56 PE-CF594 (clona B159; BD Biosciences), anti-CD3 Alexa 700 (clona UCHT1; BD Biosciences), anti-CD16 PerCp Cy 5.5 (clona 3G8; BD Biosciences), anti-CD14 V450 (clona M ϕ P9; BD Biosciences), anti-CD19 APC (clona HIB19; BD Biosciences) y anti-CD4 APC-Cy7 (clona RPA-T4; BD Biosciences).

Después de teñir las moléculas de superficie, las células se fijaron y permeabilizaron con solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente las células se lavaron dos veces con solución Perm/Wash (BD Biosciences), se centrifugo a 1800 rpm por 10 minutos, y se incubaron con los anticuerpos para detección de citocinas intracelulares: anti-TNF- α FITC (clona MAb11; BD Biosciences), anti-IL-12 p40/p70 PE (clona C11.5; BD Biosciences), anti-IL-1 β (clona H1b-98; Biolegend) e IFN- α (clona 7N4-1; BD Biosciences), por 60 min a temperatura ambiente. Después las células se lavaron 2 veces, centrifugando a 1800 rpm 10 min, se les agrego formalina 1% y posteriormente se analizaron usando un citómetro de flujo FACSAria II (BD Biosciences).

6.8. Cuantificación de citocinas en sobrenadantes de cultivo

Los sobrenadantes del cultivo de PBMC, sin estímulo o estimuladas con ligandos de TLR (en ausencia de Golgi plug), se recuperaron después de 18 horas de activación y se congelaron a -80 °C. Los sobrenadantes se descongelaron y se usaron para cuantificar TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- α e IP-10 por medio de un ensayo de perlas multiplex – Luminex (Invitrogen-Life Technologies) se siguieron las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron usando el sistema Luminex 200 xMAP (Austin, TX) con el software Luminex xPONENT 3.1 (Austin, TX).

6.9. Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando la prueba de Mann-Whitney para la comparación entre grupos y la prueba de Spearman para las correlaciones. Se consideró como diferencia significativa cuando $p < 0.05$. Para realizar las pruebas no paramétricas se usó el software GraphPad Prism 5 versión 5.01 (La Jolla, CA).

7. RESULTADOS

7.1. Apartado 1.

Características de los individuos de estudio

Los individuos infectados con VIH⁺ se clasificaron en dos grupos de acuerdo a la carga viral en plasma (CVp): controladores (si mantienen CVp <2,000 copias de RNA/mL) e individuos virémicos (CVp >10,000 copias de RNA/mL). Los individuos sin infección (VIH⁻) se incluyeron como controles.

En la tabla 2 se muestra las características de los individuos de estudio. En el presente trabajo se incluyeron 30 individuos virémicos, 18 individuos controladores (CTs) y 45 individuos VIH⁻. Se observa que la mediana de CVp fue 23,106 y 57 copias de RNA de VIH/mL en individuos virémicos y CTs respectivamente, son significativamente diferentes lo cual nos asegura que trabajamos con dos grupos de individuos VIH⁺ distintos. Así también, la mediana de células T CD4⁺ fue de 529 células/ μ L en los individuos virémicos, 781 células/ μ L en los CTs y 964 células/ μ L en los individuos VIH⁻, se encontró diferencia significativa entre los individuos virémicos comparado con CTs y VIH⁻.

Se observa en la tabla 2, que los grupos VIH⁻ y CT incluyen individuos del sexo masculino y femenino, a diferencia del grupo de virémicos que solo está conformado por individuos masculinos. Debido a estas diferencias se hizo el análisis estadístico separando a los individuos por sexo masculino-femenino en cada grupo y no se encontraron diferencias significativas. En las gráficas de resultados se muestran con figuras rellenas y vacías a los hombres y mujeres respectivamente en cada grupo.

Tabla 2. Características de la cohorte de individuos VIH⁺

Características (n)	VIH- (45)	Controlador (18)	Virémico (30)
Carga viral en plasma; mediana (rango) (copias de RNA/mL)	n/a	57 (<40-668)	23106 (8373- 447952) ^a
Cuenta de células T CD4 ⁺ ; mediana (rango) (células/μL)	964 (249-1493)	781 (417-1394)	529 (16-1149) ^{a,b}
Género, M/F	31/14	9/9	30/0
Edad; mediana (rango) (años)	30 (23-52)	36 (25-66)	30 (22-58)
Frecuencia de cDC en PBMC; mediana (rango)	0.408 (0.122-0.763)	0.276 (0.167-0.551) ^b	0.280 (0.032- 0.549) ^b
Números de cDC; mediana (rango) (células/μL)	12.7 (8-18)	7.6 (3-14) ^b	5.0 (1-18) ^b
Frecuencia de pDC en PBMC; mediana (rango)	0.165 (0.056-0.397)	0.089 (0.031-0.388) ^b	0.080 (0.008- 0.146) ^b
Números de pDC; mediana (rango) (células/μL)	4.0 (1.2-8.8)	2.3 (0.5-7.5) ^b	1.5 (0.3-3.9) ^b

^a p<0.05 comparando con controladores. ^b p<0.05 comparando con individuos VIH⁻
n/a, no aplica

7.2. Apartado 2

La frecuencia y número de DC disminuye en individuos VIH⁺ y la concentración de CD14 soluble en plasma correlaciona con la carga viral en plasma

Inicialmente se analizó la frecuencia y el número de las DC, para determinar si existía diferencia entre los CTs e individuos virémicos comparado con los VIH⁻ de nuestra cohorte de estudio. Mediante el uso de tinciones de inmunofluorescencia se identificaron las subpoblaciones de DC: cDC (LIN⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺) y pDC (LIN⁻ HLA-DR⁺ CD123⁺). En la figura I suplementaria se muestra la estrategia de análisis que se usó para definir las poblaciones celulares correspondientes a las cDC y pDC, así como un ejemplo representativo de uno de los individuos de cada grupo de estudio.

En la figura 4a y tabla 2, se muestra que la frecuencia de las cDC y pDC en los CTs ($p=0.0429$ para cDC y $p=0.0104$ para pDC) y en los individuos virémicos ($p=0.0029$ para cDC y $p<0.001$ para pDC) está disminuida en comparación con las DC de los individuos VIH⁻. Al evaluar el número de las DC se observa que hay una reducción significativa de estas células en los individuos VIH⁺ comparado con los VIH⁻, figura 4b. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia y número de DC al comparar entre CTs e individuos virémicos. Estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura y podrían indicar que la presencia del VIH puede afectar la frecuencia de las DC en sangre periférica tanto en los CTs como en los individuos virémicos.

Como se mencionó, además de la presencia del VIH, la presencia de productos bacterianos en el plasma de los individuos VIH⁺ puede ser un factor importante en la alteración de la función de las DC. La proteína CD14 soluble (sCD14) puede ser un marcador en plasma de la presencia de LPS, como indicador de translocación bacteriana por daño de mucosas en los individuos VIH⁺ (Brenchley et al., 2006). Para determinar si los individuos virémicos tenían más componentes bacterianos que los CTs como se ha reportado en la literatura, se evaluó la concentración de sCD14 en plasma de nuestros grupos de estudio. En la figura 4c, se muestra que hubo mayor concentración de sCD14 en el plasma de los individuos virémicos en comparación con los plasmas de VIH⁻ ($p=0.0008$), esta diferencia no fue significativa al comparar con plasmas de los CTs. A pesar de no encontrar diferencias en la concentración de sCD14 entre CTs e individuos virémicos, como se ha reportado, se encontró una correlación positiva entre sCD14 y la CVp ($r_s=0.4400$; $p=0.0191$; Fig. 4d). Lo cual sugiere que hay diferente concentración de productos bacterianos en circulación, específicamente LPS, en los individuos VIH⁺ virémicos y CTs asociado a la CVp, estos dos factores podrían alterar de forma distinta la función de las DC.

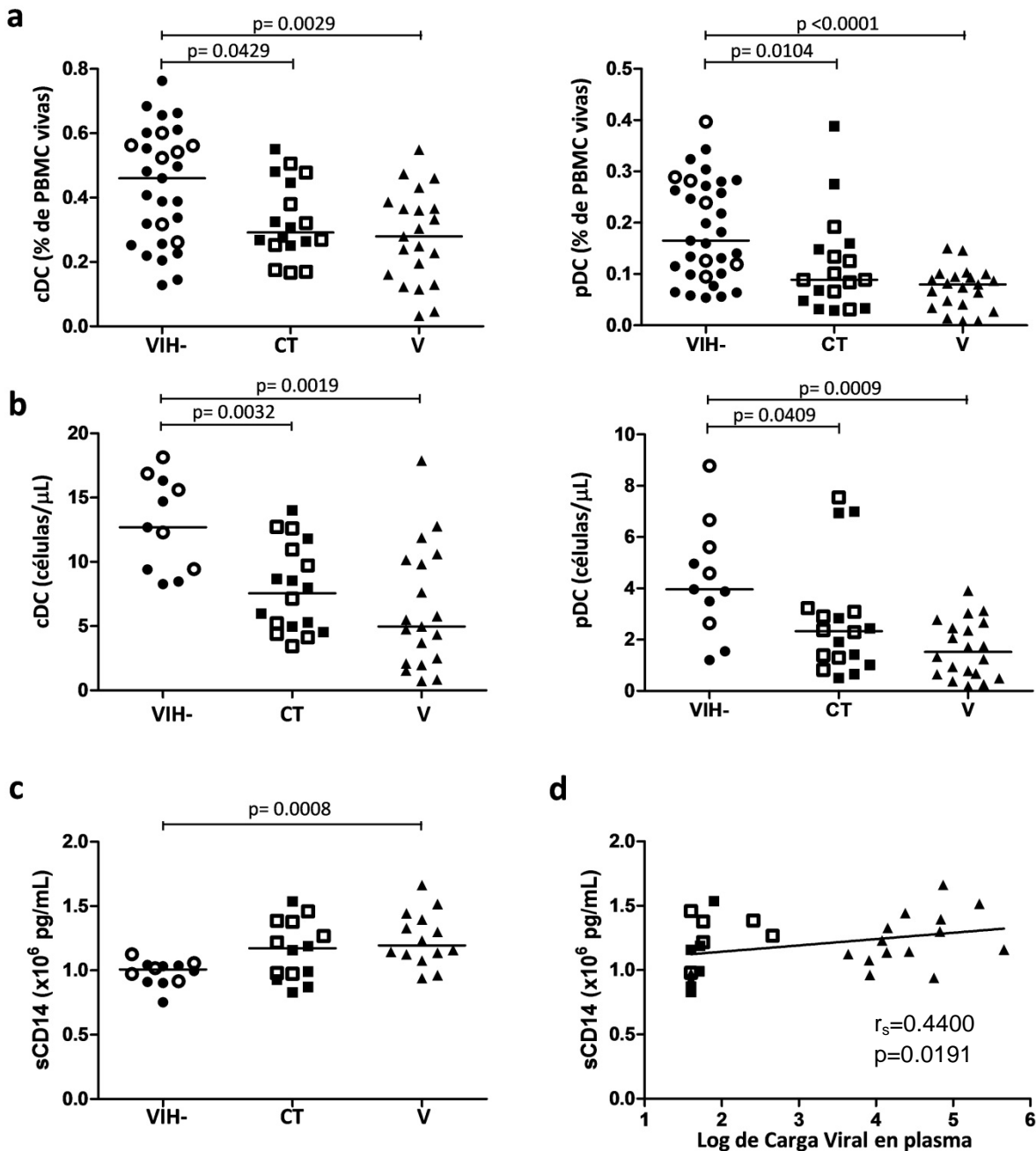


Figura 4. Disminución de la frecuencia de DC en individuos VIH⁺ y correlación de sCD14 con CVp. Se obtuvieron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻, n=29), controladores (CT, n=18) e individuos virémicos (V, n=21) y fueron marcados ex-vivo para determinar la frecuencia (a) y el número (b) de cDC y pDC. (c) La concentración de CD14 soluble (sCD14) se determinó en plasma de individuos VIH⁻ (n=12), CTs (n=14) y V (n=14). (d) Correlación entre la CVp y la concentración de sCD14, se muestran los individuos V (triángulos) y CTs (cuadrados). Los individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney y correlación de Spearman respectivamente. Se consideró diferencia significativa p <0.05.

7.3. Apartado 3

Células Dendríticas convencionales (cDC)

7.3.1. Expresión diferencial de marcadores de activación en cDC de individuos virémicos y CTs, *ex vivo*

Considerando que se observó una asociación entre la CVp y uno de los marcadores de la translocación bacteriana y presencia de productos bacterianos, sCD14, se evaluó inicialmente si la expresión de moléculas de activación difiere *ex vivo* entre las cDC de los individuos virémicos y CTs.

En la figura 5a, se muestra un histograma representativo en donde se observa un pequeño aumento de la expresión de CD40 en las cDC de un individuo virémico en comparación con las cDC de un individuo VIH⁻ o CT. Al evaluar la mediana de la intensidad de fluorescencia (MFI, del inglés median fluorescence intensity) de la expresión de CD40 en las cDC por grupo, no se observaron diferencias significativas entre grupos. A pesar de esto, se observó un mayor porcentaje de cDC CD40⁺ en los individuos virémicos en comparación con los CTs ($p=0.0478$) y VIH⁻ ($p=0.0463$) (Fig.5a). En el análisis de CD86 se observa que prácticamente todas las cDC expresan CD86, pero las cDC de los CTs tienen un incremento en la MFI comparado con los individuos VIH⁻ ($p=0.0011$; Fig. 5b). También se observó un aumento en la MFI de CD47, una molécula que se expresa en respuesta a IFN, en las cDC de CTs en comparación con individuos virémicos ($p=0.0218$) y VIH⁻ ($p=0.0013$; Fig. 5c). Se observó además un mayor porcentaje de cDC CD47⁺ en los CTs en comparación con los individuos virémicos ($p=0.0496$). De forma interesante se encontró una correlación positiva entre la expresión de CD86 y CD47 ($r_s=0.6408$; $p<0.001$), lo que sugiere que posiblemente la expresión de CD47 en las cDC en consecuencia a su respuesta a interferones regula la expresión del marcador de activación CD86 (Fig. 6). Estos resultados indican que las cDC de ambos individuos CTs y virémicos tienen un fenotipo de activación parcial, con diferente expresión de moléculas de superficie. Las cDC de los individuos virémicos expresan predominantemente CD40 mientras las cDC de CTs expresan CD86 y CD47.

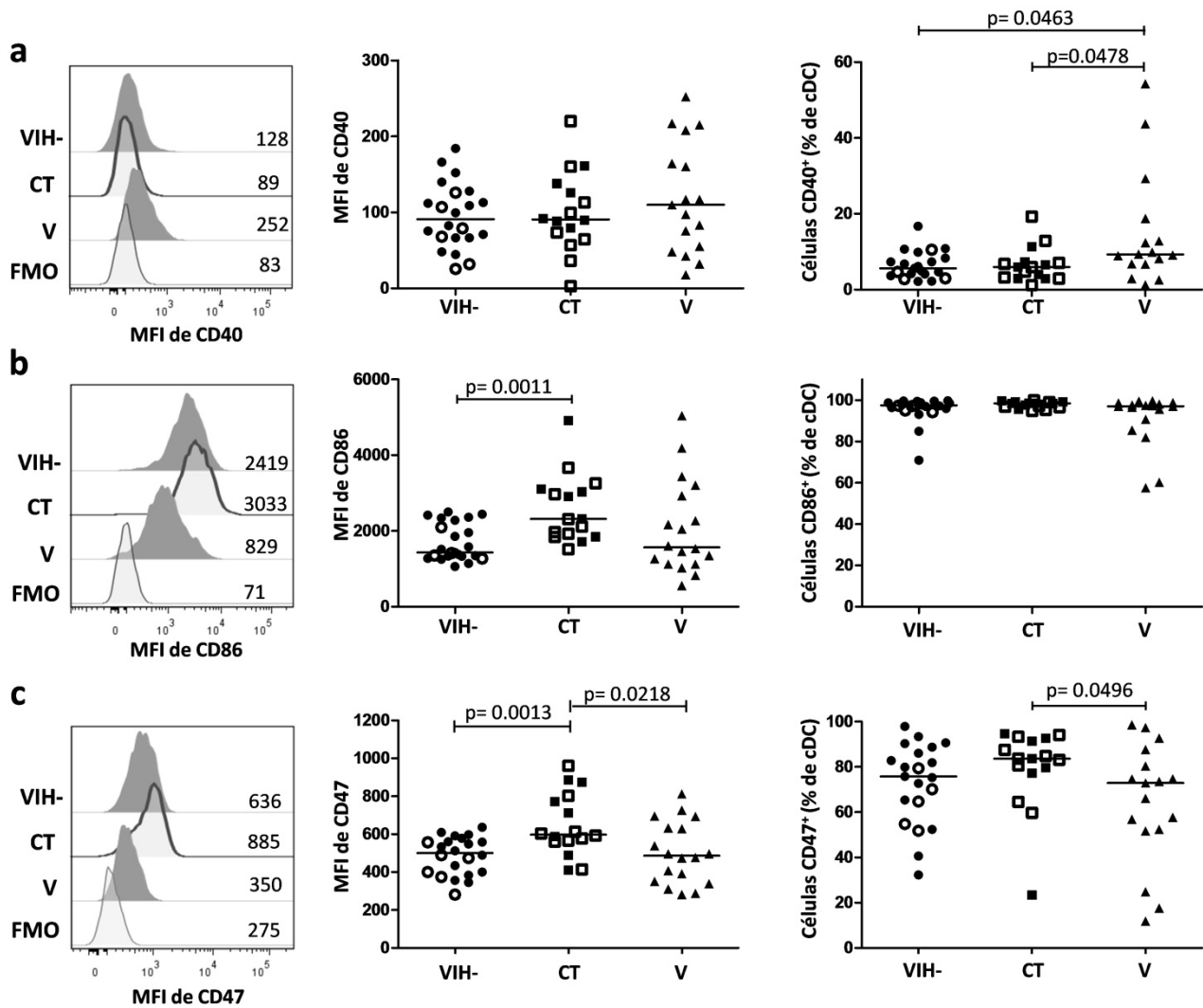


Figura 5. Expresión diferencial de moléculas de activación en cDC de individuos virémicos y controladores, ex vivo. Se obtuvieron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻, n=22), controladores (CT, n=16) e individuos virémicos (V, n=18) y fueron marcados *ex-vivo* para determinar la expresión de CD40 (a), CD86 (b) y CD47 (c) en cDC por citometría de flujo. Un histograma representativo de un individuo de cada grupo se muestra a la izquierda con los valores de MFI correspondientes. Las gráficas muestran el valor de MFI y porcentaje de células positivas dentro de la población de cDC para cada marcador. Los individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa $p < 0.05$. FMO (del inglés fluorescence minus one).

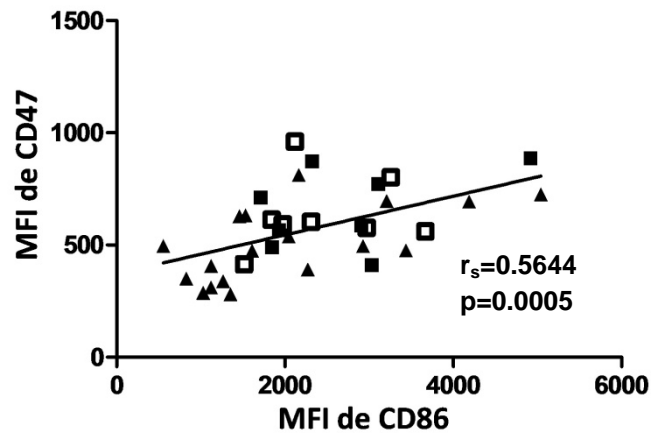


Figura 6. Correlación positiva de la expresión de CD86 y CD47 en cDC de individuos VIH⁺. Se obtuvieron PBMC de individuos controladores (CT) e individuos virémicos (V) se marcaron *ex vivo* para determinar la expresión de CD86 y CD47 en cDC por citometría de flujo. CTs (cuadrados) y V (triángulos). Los individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba de Spearman.

7.3.2. Expresión diferencial de marcadores de superficie en cDC de individuos virémicos y CTs en respuesta a ligandos de TLR

La expresión diferencial de los marcadores de activación que se observó *ex vivo*, puede deberse a distintas vías de activación de las DC; quizá mediada por los productos bacterianos y virales que se encuentran en el plasma de los individuos VIH⁺. Para determinar si esta expresión diferencial podría ser consecuencia de la activación mediada por ligandos de TLR, se analizó el cambio en la expresión de marcadores de activación después de estimular PBMC de los individuos de estudio con lipopolisacárido (LPS) o RNA de cadena sencilla-40 (ssRNA40), que son ligandos de TLR-4 y TLR-8 respectivamente.

Se observa en la figura 7a, que la expresión de CD40 aumenta en las cDC de los individuos virémicos y VIH⁺ después de activar las células con LPS. Un menor aumento en la expresión de CD40 se observa en las cDC de los CTs. Al evaluar el índice de aumento de la expresión de CD40 en las cDC de los grupos de estudio estimuladas con LPS, se observa que las cDC de los CTs tienen menor índice de cambio de CD40 en comparación con las cDC de los individuos virémicos y VIH⁺, que tienen un aumento considerable en el índice de expresión de esta molécula, siendo mayor en el grupo de

individuos VIH⁻. Se encontró diferencia significativa en el índice de expresión de CD40 en las cDC de los CTs menor en comparación con las cDC de individuos virémicos ($p=0.0400$) y VIH⁻ ($p=0.0005$), también hay diferencia entre el índice de expresión de CD40 de las cDC del grupo de virémicos y VIH⁻ ($p=0.0451$; figura 7b). Después del estímulo con ssRNA40 se observaron resultados similares, excepto que no se encontró cambio significativo entre el índice de expresión de CD40 en cDC de individuos virémicos y CTs (figura 7c).

Al observar la expresión de la molécula CD86, figura 7d, se ve que las cDC de los individuos CTs aún en ausencia de estímulo tienen alta expresión de esta molécula, al igual que los resultados *ex vivo*; y después de la activación con LPS muestran un ligero aumento en la expresión de CD86. En cambio las cDC de los individuos virémicos y VIH⁻ tienen baja expresión de CD86 sin estímulo que claramente aumenta después de la activación con LPS, siendo el aumento mayor nuevamente en las cDC de VIH⁻. Al analizar el índice de aumento de la expresión de CD86, figura 7e, se observa que las cDC de los CTs e individuos virémicos tienen un menor cambio en el índice de expresión de CD86 después de LPS en comparación con las cDC de individuos VIH⁻ ($p=0.0112$ y $p=0.0232$ respectivamente). Resultados similares se encontraron después del estímulo con ssRNA40 (fig. 7f).

Estos resultados muestran que las cDC de los individuos virémicos y CTs tienen expresión diferente de los marcadores de activación en respuesta a ligandos de TLR-4 y TLR-8. La respuesta de las cDC de los CTs parece estar regulada, ya que muestra bajo aumento en la expresión de CD86 y CD40 después de activación. En cambio, las cDC de los individuos virémicos se caracteriza por un incremento en la expresión de CD40 pero no de CD86, sugiriendo que el fenotipo *ex vivo* observado en estas células puede estar relacionado con la activación continua a través de TLR.

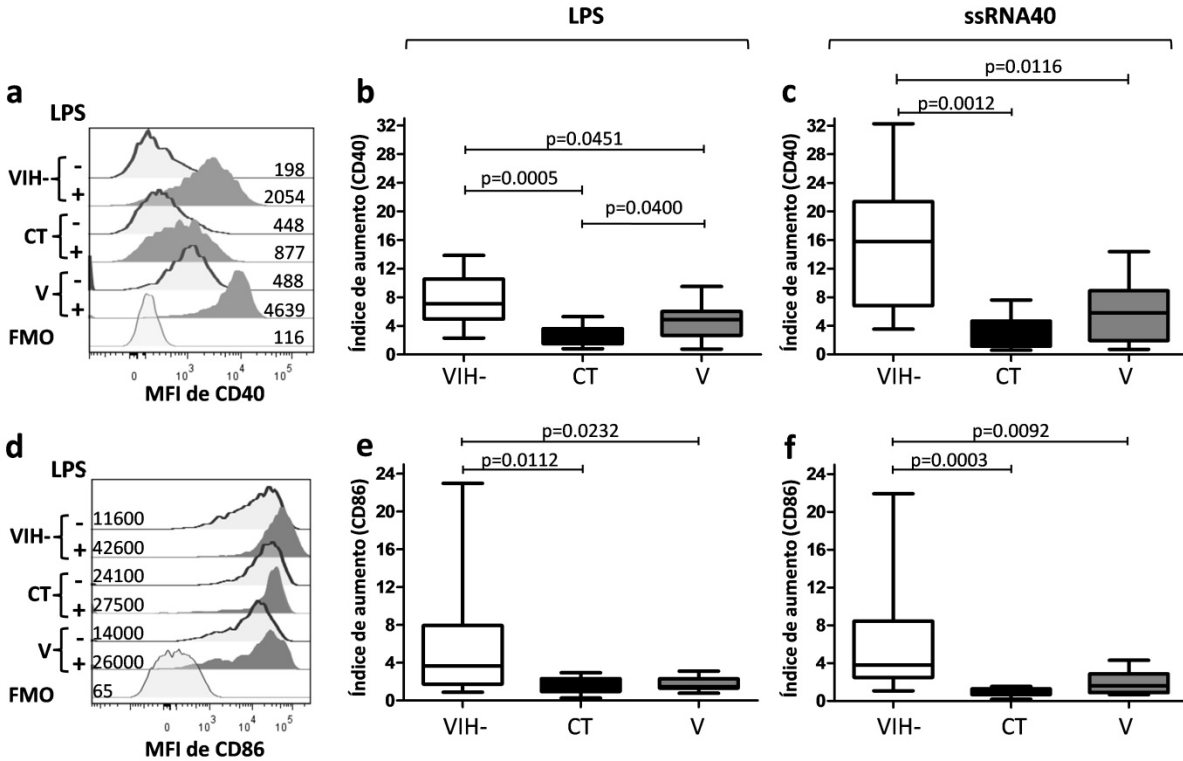


Figura 7. Expresión diferencial de moléculas de activación en cDC de individuos virémicos y controladores después de estimular con LPS o ssRNA40. Se obtuvieron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con los ligandos de TLR por 18 horas y posteriormente se marcaron para determinar la expresión de CD40 (a) y CD86 (d) en las cDC por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo por grupo con el estímulo de LPS, se incluyeron los valores de MFI. Se evaluó el índice de aumento en la expresión de CD40 (b y c) y CD86 (e y f) en cDC de los individuos VIH⁻, CT y V después de 18 h de estímulo con LPS (b y e) o ssRNA40 (c y f). El índice de aumento en la expresión de marcadores se calculó como el MFI de las cDC estimuladas dividido entre el MFI de las cDC sin estimular. n=13 para los individuos VIH⁻, n=9 para CT y V. Los datos se muestran en gráficos de cajas y bigotes: min-máx. Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. FMO (del inglés fluorescence minus one) Se consideró diferencia significativa cuando p<0.05.

7.3.3. Diferencias en la producción de TNF- α por las cDC de los individuos virémicos y CTs en respuesta a LPS y correlación con CVp

Para evaluar si la expresión diferencial de los marcadores de activación en los individuos virémicos y CTs, *ex vivo* e *in vitro*, está relacionado con diferencias funcionales; se determinó la producción intracelular de las citocinas proinflamatorias

TNF- α e IL-12 en las cDC después de activar PBMC con LPS o ssRNA40. La figura 8a, muestra graficas de puntos representativas de cDC TNF- α^+ después del estímulo de LPS. Se observa que los individuos CT y VIH $^-$ tienen un porcentaje similar de cDC TNF- α^+ , en contraste el individuo virémico tiene un mayor porcentaje de estas células. Al comparar los grupos de estudio, figura 8b, se observa que después del estímulo con LPS los individuos VIH $^-$ y CTs tienen un porcentaje similar de cDC TNF- α^+ , a pesar de que los CTs tienen un mayor porcentaje de estas células en ausencia de estímulo ($p=0.0113$). En cambio en los individuos virémicos hay un mayor porcentaje de cDC TNF- α^+ en ausencia de estímulo, en comparación con los VIH $^-$ ($p=0.0343$), y después del estímulo con LPS, es significativamente mayor que en los CTs y VIH $^-$ ($p=0.0005$). Después del estímulo con ssRNA40 no se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio, figura 8c. Para determinar si la frecuencia de células productoras de TNF- α se asociaba con parámetros clínicos de los individuos VIH $^+$, se hicieron correlaciones con CVp y número de células T CD4 $^+$. Se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de cDC TNF- α^+ y la CVp ($r_s=0.6421$; $p=0.0004$; figura 8d), y tendencia negativa con el número de células T CD4 $^+$ (figura 8e).

En cuanto a la frecuencia de cDC IL-12 $^+$, figura 9 a y b, no se encontraron diferencias significativas después del estímulo con LPS, a pesar de que en ausencia de estímulo se encuentra mayor porcentaje de cDC IL-12 $^+$ en los CTs en comparación con los individuos VIH $^-$ ($p=0.0355$). Después del estímulo con ssRNA40 se observa menor porcentaje de cDC IL-12 $^+$ en los CTs en comparación con los VIH $^-$ ($p=0.0483$; figura 9c).

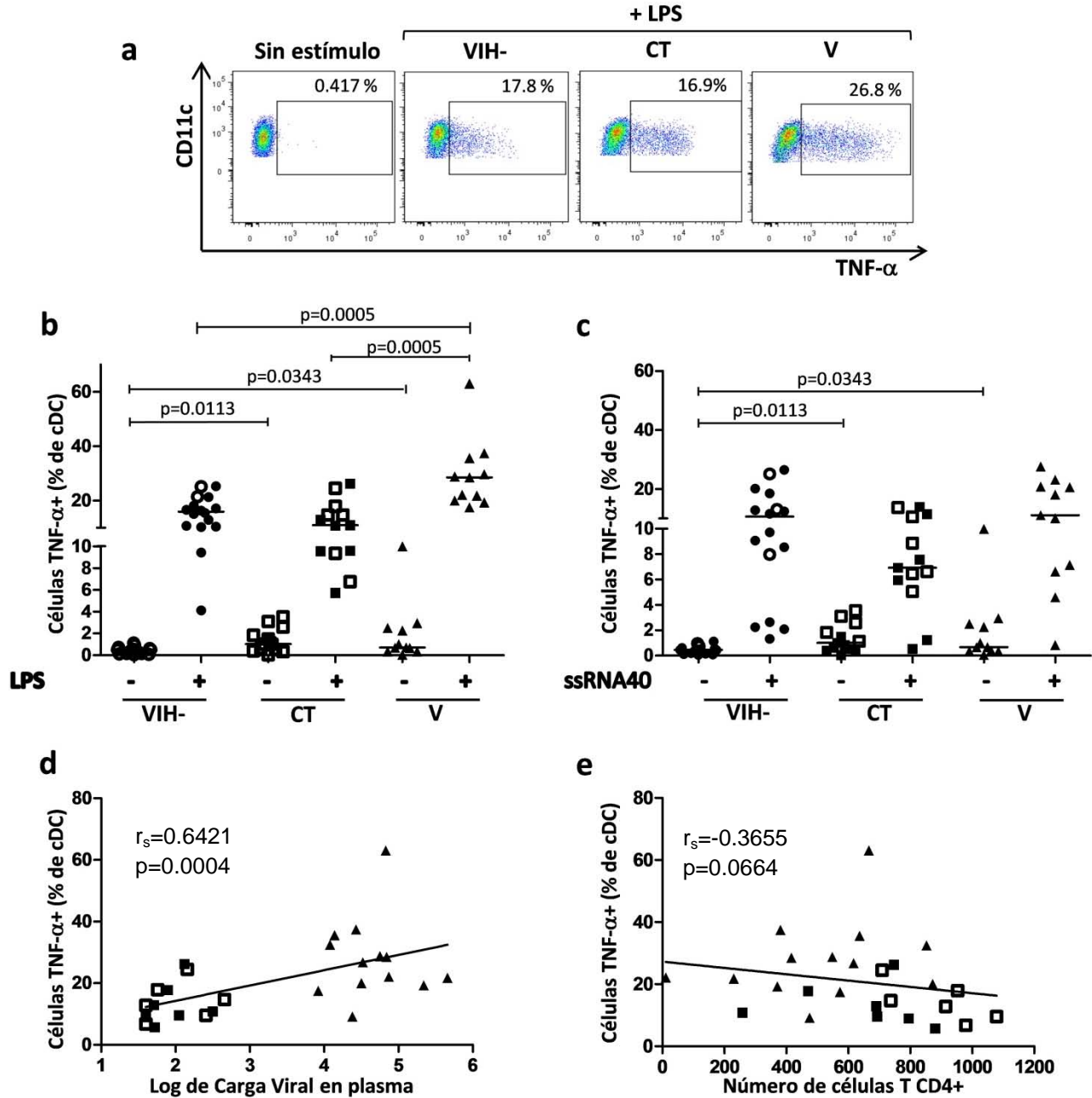


Figura 8. Producción diferencial de TNF- α por cDC de individuos virémicos y controladores en respuesta al estímulo de LPS. Se aislaron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con LPS o ssRNA40 por 18 horas. Posteriormente se determinó por tinción intracelular la producción de TNF- α por las cDC. (a) En graficas de puntos se muestra un ejemplo representativo de cDC TNF- α ⁺ después del estimular con LPS. Las gráficas muestran el porcentaje de cDC TNF- α ⁺ en las muestras de VIH⁻ (n=16), CT (n=13) y V (n=11) después de estimular con LPS (b) o ssRNA40 (c). Correlación de la frecuencia de cDC TNF- α ⁺ después del estímulo con LPS y carga viral en plasma (d) o cuenta de células T CD4⁺ (e). Se muestra a los CT (cuadrados) y V (triángulos); individuos masculinos

(símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney y correlación de Spearman, respectivamente. Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

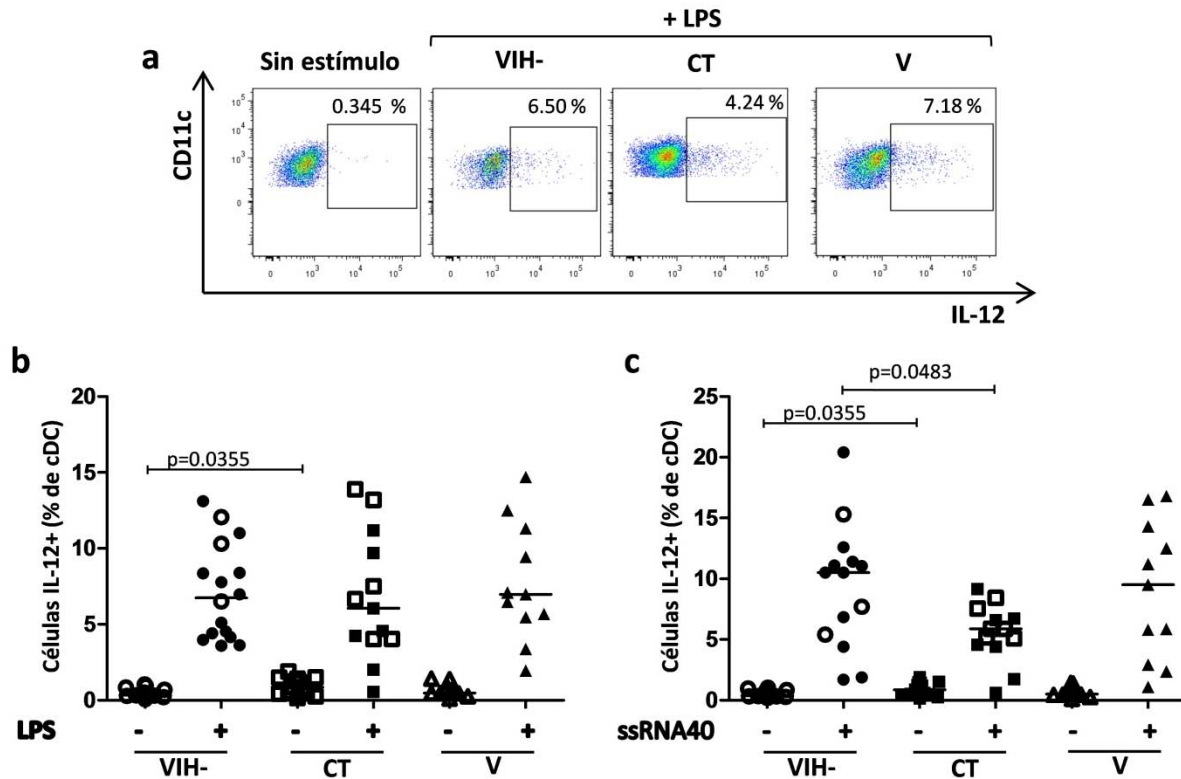


Figura 9. Frecuencia de cDC IL-12⁺ en respuesta a ligandos de TLR es similar en individuos virémicos y controladores. Se aislaron PBMC de individuos VIH- (VIH-), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con LPS o ssRNA40 por 18 horas. Posteriormente se determinó por tinción intracelular la producción de IL-12 por las cDC. (a) En graficas de puntos se muestra un ejemplo representativo de cDC IL-12⁺ después del estimular con LPS. Las gráficas muestran el porcentaje de cDC IL-12⁺ en las muestras de VIH- (n=16), CT (n=13) y V (n=11) después de estimular con LPS (b) o ssRNA40 (c). Se muestran individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Para determinar si la diferencia en la respuesta al LPS y ssRNA40 se debía a la expresión diferencial de los TLR-4 y TLR-8 en las cDC de los CTs e individuos virémicos, se evaluó la expresión de estos TLR en las cDC de los individuos del estudio, figura II (suplementaria). No se encontraron diferencias significativas en las MFI de TLR-4 y TLR-8 en cDC entre los grupos de estudio.

Estos resultados indican que la frecuencia de cDC TNF- α ⁺ en respuesta a LPS difiere entre los individuos virémicos y CTs, las cDC de los individuos virémicos pero no de los CTs, tienen una hiperrespuesta a LPS. Adicionalmente el porcentaje de cDC TNF- α ⁺ se asocia con la CVp.

7.3.4. Mayor concentración de TNF- α e IL-1 β en los sobrenadante de cultivo de PBMC de individuos virémicos en comparación con CTs

Para determinar si la hiperrespuesta al LPS, en las cDC de los individuos virémicos, se podía observar en otras citocinas adicionales al TNF- α , se evaluó la presencia de IL-1 β e IL-6. La concentración de estas citocinas se cuantificó por ensayo de Luminex en los sobrenadantes de los cultivos de PBMC después de estimular o no con los ligandos de TLR-4 y TLR-8. En la figura 10a, se observa que en los sobrenadantes de cultivo de las células de los individuos virémicos hay mayor concentración de TNF- α después del estímulo con LPS, en comparación con los sobrenadantes de cultivo de las células de CTs ($p=0.0004$) y VIH⁻ ($p=0.0006$), estos datos confirman la sobreproducción de TNF- α en respuesta al LPS que se observó por tinción intracelular en las cDC. Después del estímulo con ssRNA40 se observa menor concentración de TNF- α en los sobrenadantes del cultivo de las células de CTs, que es significativamente diferente en comparación con los sobrenadantes de los VIH⁻ (figura 10b; $p=0.0374$).

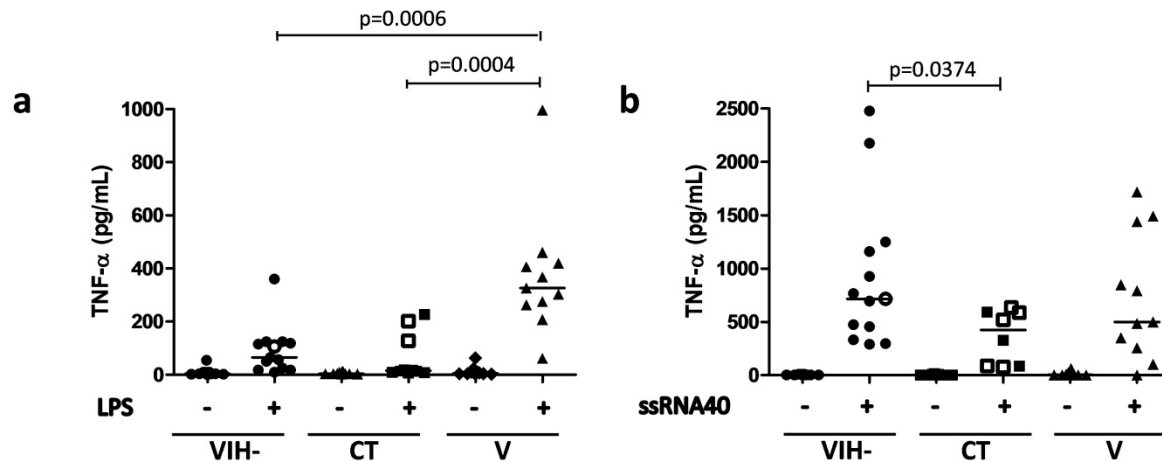


Figura 10. Mayor concentración de TNF- α en sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos virémicos estimulados con LPS. Se aislaron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con LPS (a) o ssRNA40 (b) por 18 horas. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- α por ensayo de Luminex. VIH⁻ (n=13), CT (n=10) y V (n=11). Se muestran individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Se muestra en la figura 11a, que después de estimular las PBMC con LPS otra citocina que distingue a los grupos de CTs y virémicos es la IL-1 β . Se observa que en los sobrenadantes de los CTs hay menor concentración de IL-1 β en comparación con los sobrenadantes de los individuos virémicos ($p=0.0043$) y VIH⁻ ($p=0.0170$). A pesar de que hay mayor producción basal de IL-6 en los sobrenadantes de CTs en comparación con los VIH⁻ ($p=0.0451$), no se observaron diferencias significativas en la concentración de IL-6 e IL-12 después de estimular con LPS. En la figura 11b, se observa que después de estimular con ssRNA40 no hay diferencia en la concentración de IL-1 β , IL-6 e IL12 en los sobrenadantes de los grupos de estudio, aunque claramente se observa que responden a la activación a través de TLR-8 al encontrarse diferencia entre sin estímulo y con estímulo (no se marcan en la gráfica, $p < 0.05$).

Estos resultados muestran que en respuesta a LPS hay mayor producción de TNF- α e IL-1 β en los individuos virémicos en comparación con los CTs. Sugiriendo nuevamente una hiperrespuesta al LPS en los individuos virémicos.

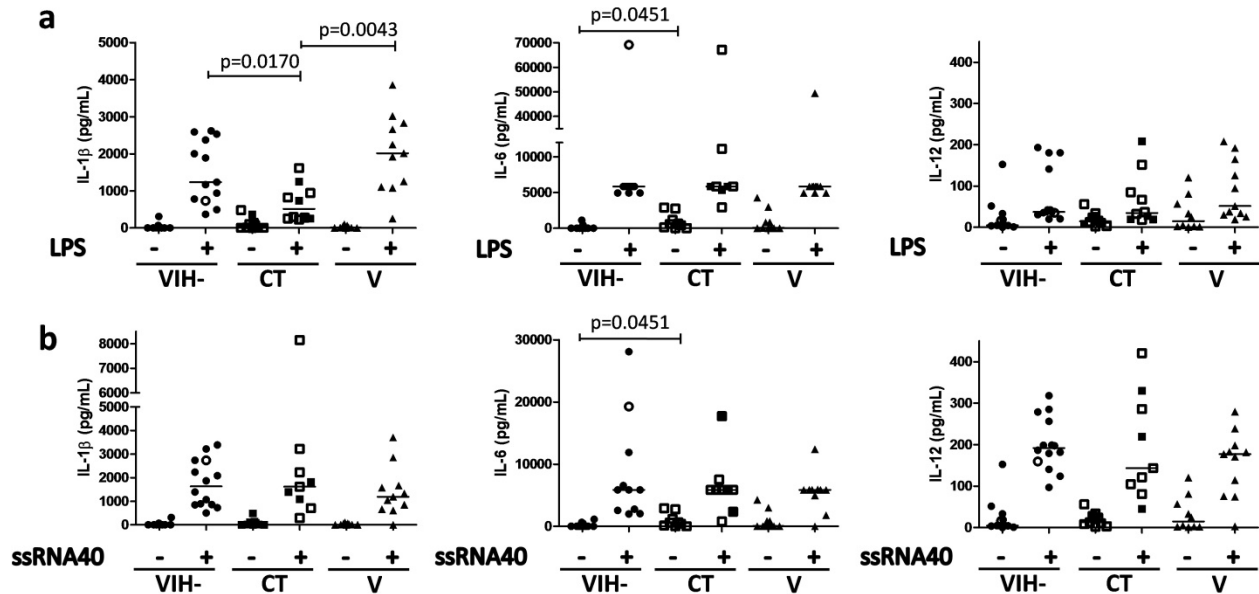


Figura 11. Diferente concentración de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos virémicos y controladores estimuladas con LPS. Se aislaron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con LPS (a) o ssRNA40 (b) por 18 horas. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-1 β , IL-6 e IL-12 por ensayo de Luminex, VIH⁻ (n=13), CT (n=10) y V (n=11). Se muestran individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

7.3.5. Las cDC son la población celular de los individuos virémicos que sobreexpresa TNF- α en respuesta a LPS

De acuerdo con los resultados anteriores la hiperrespuesta de TNF- α al LPS es un mecanismo general en las PBMC de individuos VIH⁺ virémicos, pero adicional a las cDC, hay otras células del sistema inmune que podrían contribuir con la producción de esta citocina. Para evaluar si otras poblaciones celulares producen TNF- α de forma diferencial entre individuos virémicos y CTs en respuesta a LPS; se determinó por tinción intracelular TNF- α en células CD56⁺ (células NK), CD19⁺ (células B), CD3⁺CD4⁺ (células T) y CD14⁺ (monocitos). La estrategia de análisis para identificar las diferentes poblaciones se muestran en la figura III (suplementaria). En la figura 12a, se muestran graficas de puntos como ejemplos representativos de que las células NK, B y T CD4⁺

no producen grandes cantidades de TNF- α en respuesta a LPS. En cambio, se observa que un alto porcentaje de monocitos producen TNF- α después de la estimulación con LPS. A diferencia de lo que se observó en las cDC, se muestra en la figura 12b y c, que no hay diferencia significativa en el porcentaje de monocitos TNF- α ⁺ en respuesta a LPS y ssRNA40 entre los grupos de estudio.

La IL-1 β fue otra citocina que se encontró que difería en los sobrenadantes de cultivo entre individuos virémicos y CTs. Se determinó por tinción intracelular si la producción diferencial de esta citocina estaba dada por las cDC. En la figura 13 se muestran graficas de puntos representativas de la producción de IL-1 β por las cDC y monocitos en respuesta a los estímulos de LPS y ssRNA40. Se observa que el individuo virémicos tienen un mayor porcentaje de cDC IL-1 β ⁺ que el CT, después de estimulación con ambos ligandos de TLR (figura 13a). En cambio en los porcentajes de monocitos IL-1 β ⁺ no se observan diferencias (figura 13b).

Estos resultados sugieren que las cDC son la población celular que responde diferencialmente al LPS en los individuos VIH⁺ CTs y virémicos, con sobreproducción de TNF- α y probablemente IL-1 β en este último grupo.

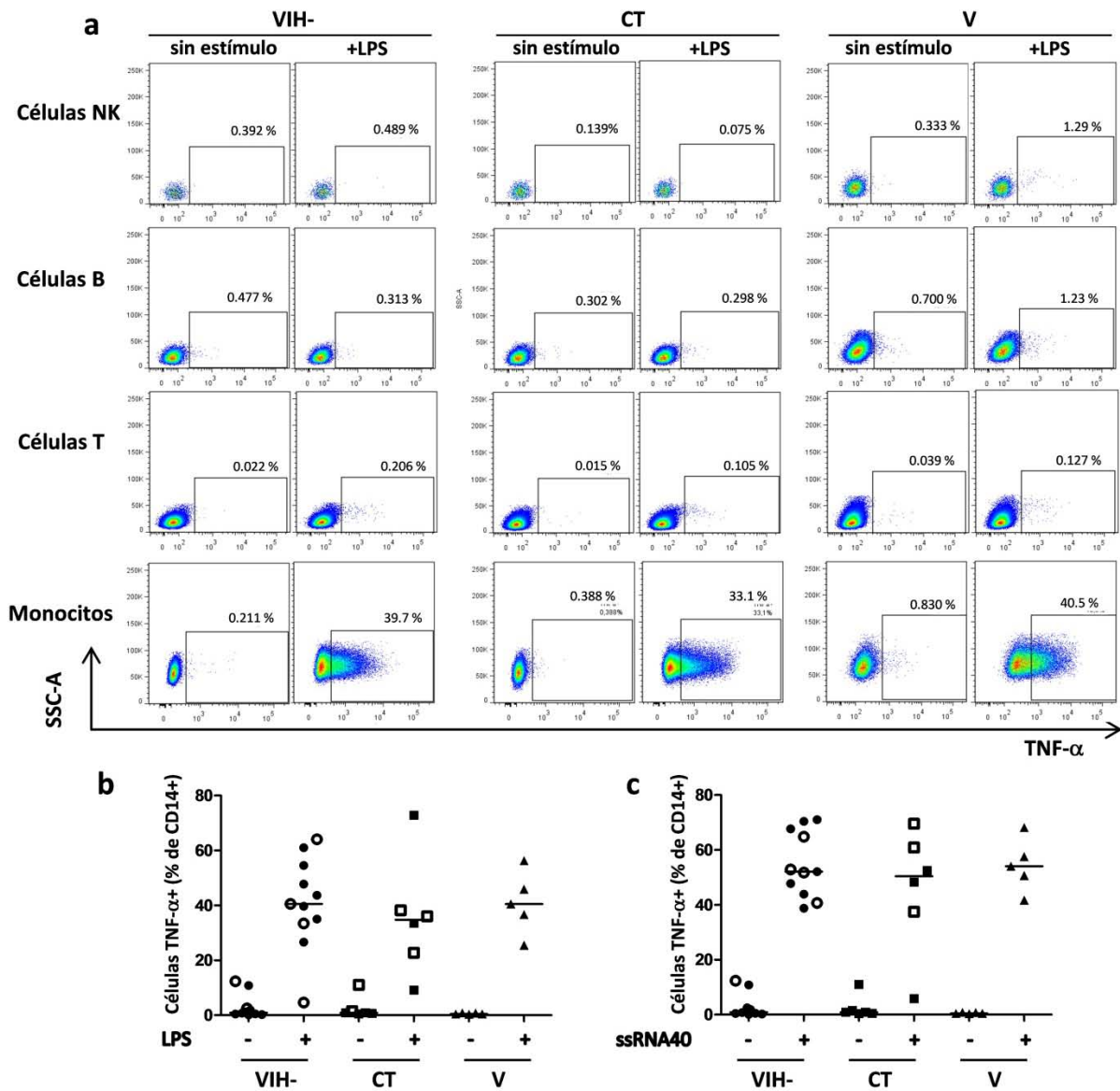


Figura 12. Detección intracelular de TNF- α en diferentes poblaciones celulares. Se evaluó por tinción intracelular la producción de TNF- α en células NK (CD56⁺), células B (CD19⁺), células T (CD3⁺CD4⁺) y monocitos (CD14⁺) después de estimular con LPS o ssRNA40 PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V). (a) Graficas de puntos representativas de cada grupo de estudio después de 18 h de estímulo con LPS. Porcentaje de monocitos TNF- α ⁺ después del estímulo con LPS (b) o ssRNA40 (c) de individuos VIH⁻ (n=11), CT (n=6) y V (n=5). Se muestran individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa cuando p < 0.05.

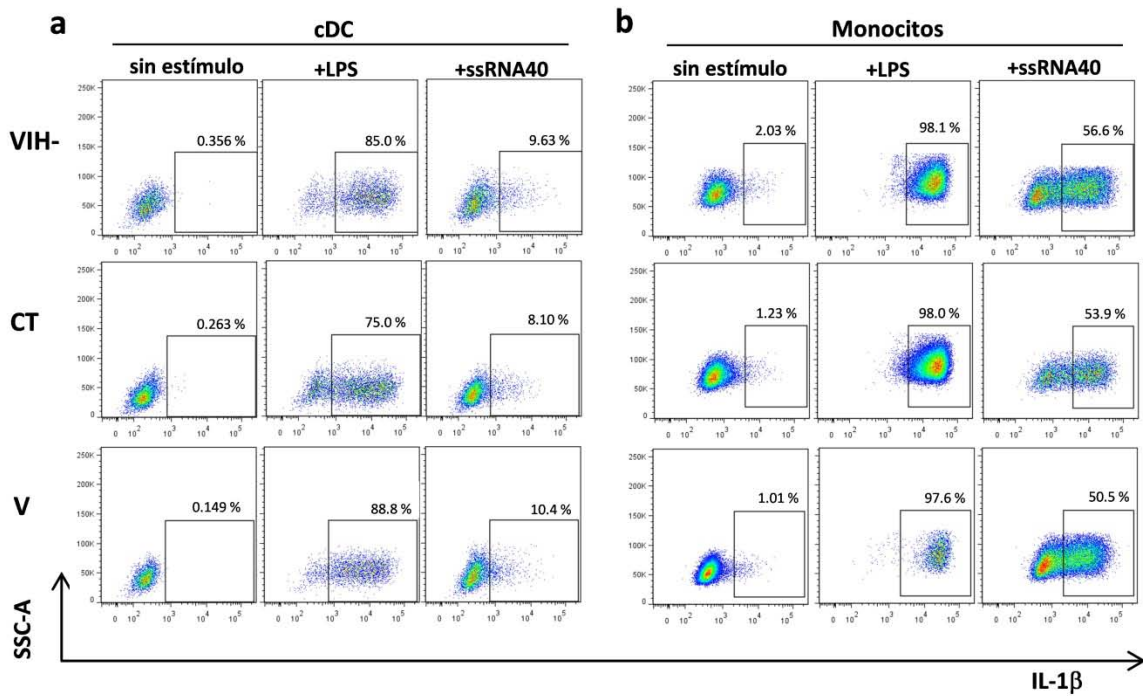


Figura 13. Frecuencia diferencial de cDC IL-1 β ⁺ en individuos virémicos y controladores después de estimular PBMC con LPS. Se aislaron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon con LPS o ssRNA40 por 18 horas. La producción intracelular de IL-1 β se evaluó en las cDC (a) y monocitos (b), se muestran graficas de puntos representativas de cada grupo de estudio.

7.4. Apartado 4

Células Dendríticas plasmacitoides (pDC)

7.4.1. Expresión diferencial de marcadores de activación en pDC de individuos virémicos y CTs, *ex vivo*

La mayor concentración de productos bacterianos circulantes y el mayor número de viriones en los individuos virémicos además de alterar la función de las cDC como se mostró en los resultados anteriores, también podría afectar directa o indirectamente a las pDC.

Al igual que las cDC, inicialmente se determinó la expresión de marcadores de activación en la superficie de las pDC de los individuos virémicos y CTs, *ex vivo*. En la figura 14a, se muestra un histograma representativo de la expresión de CD40 en pDC de un individuo de cada grupo de estudio. Se observa que las pDC del individuo virémico tienen mayor expresión de CD40 que las pDC del CT, pero al graficar las MFI de los individuos del grupo no se encontraron diferencias significativas. De manera similar a lo que se observó con las cDC, en los individuos virémicos hay mayor frecuencia de pDC CD40⁺ en comparación con los individuos VIH⁻ ($p < 0.0001$). No se observaron diferencias entre los grupos de estudio en la MFI de la expresión de CD86 en las pDC, ni en el porcentaje de células CD86⁺ (figura 14b). En cuanto a CD47, figura 14c, se muestra que las pDC de los CTs tienen mayor expresión de esta molécula en su superficie al comparar con las pDC de VIH⁻ ($p=0.0173$). En el porcentaje de células positivas para CD47 no se encontraron diferencias al comparar entre grupos. Estos resultados muestran que hay expresión diferencial de los marcadores de activación en las pDC de los individuos VIH⁺, caracterizándose por la expresión de CD40 las pDC de individuos virémicos y CD47 las pDC de los CTs.

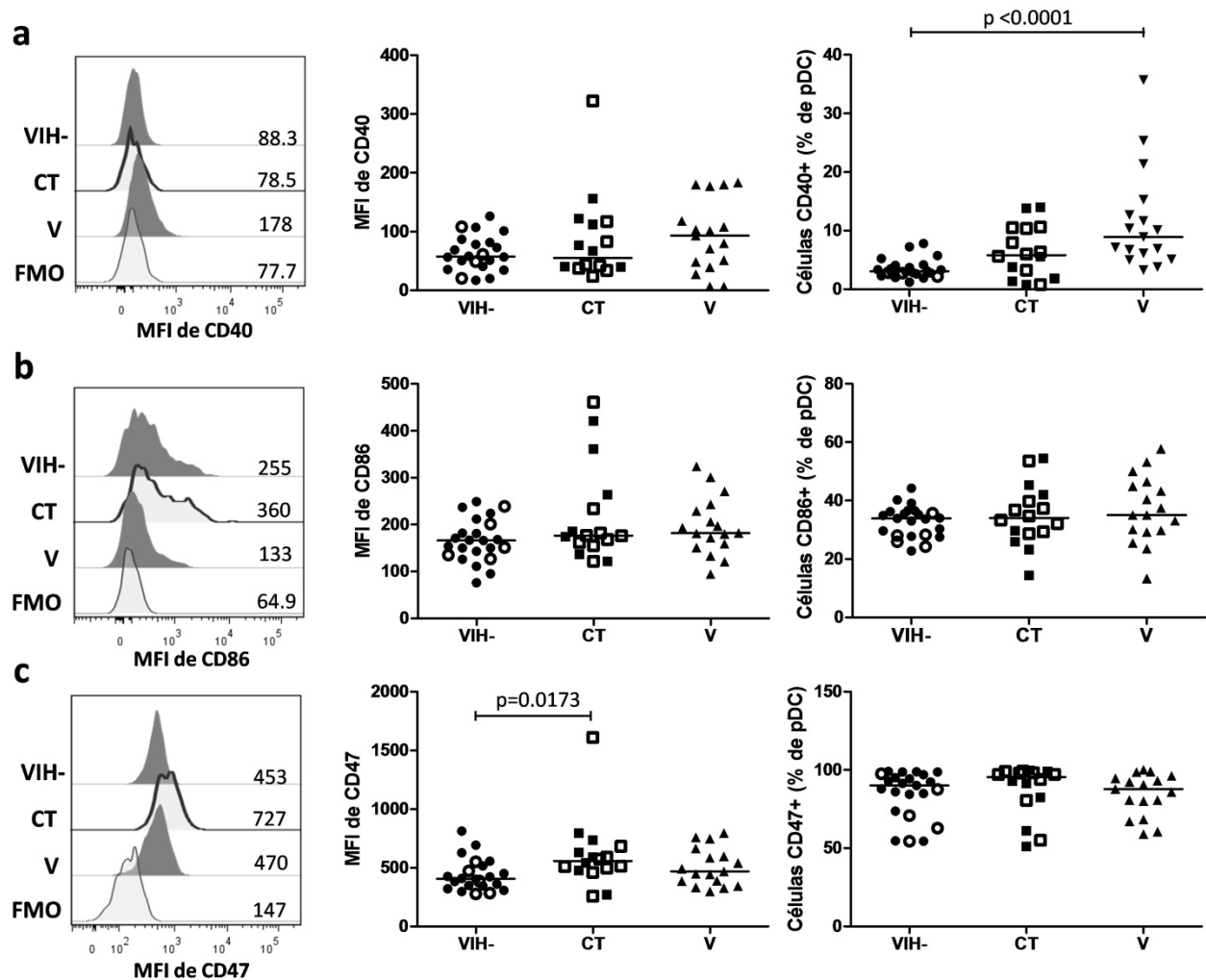


Figura 14. Expresión diferencial de moléculas de activación en pDC de individuos virémicos y controladores, *ex vivo*. Se obtuvieron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻, n=22), controladores (CT, n=16) e individuos virémicos (V, n=18) y fueron marcados *ex-vivo* para determinar la expresión de CD40 (a), CD86 (b) y CD47 (c) en pDC por citometría de flujo. Un histograma representativo de un individuo de cada grupo se muestra a la izquierda con los valores de MFI correspondientes. Las gráficas muestran el valor de MFI y porcentaje de células positivas dentro de la población de pDC para cada marcador. Los individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa $p < 0.05$. FMO (del inglés fluorescence minus one).

7.4.2. Expresión diferencial de marcadores de activación en pDC de individuos VIH⁺ y VIH⁻ después de estimulación con ligandos de TLR

Ex vivo se observó que había diferencia en la expresión de marcadores de activación en las pDC de individuos virémicos y CTs. Para evaluar si esta diferencia se debía a una respuesta diferencial de las pDC a los ligandos de TLR, se determinó el cambio en la expresión de los marcadores de activación en las pDC en respuesta a los ligandos de TLR-8 (ssRNA40 secuencia de RNA del VIH).y TLR-9 (CpG-ODN2216, DNA hipometilado). En la figura 15a, se muestra un histograma representativo de la expresión de CD40 en pDC de un individuo de cada grupo, se observa que las pDC del CT en ausencia de estímulo expresan ligeramente más CD40 que las pDC del individuo virémico. Después de estimular con CpG, las pDC del individuo VIH⁻ aumentan claramente la expresión de CD40, en cambio las pDC del CT e individuo virémico solo presentan un pequeño aumento en la expresión de este marcador. Al graficar el índice de aumento en la expresión de CD40 se confirmó que después del estímulo con CpG hay poco cambio en la expresión de esta molécula en las pDC de los individuos VIH⁺, siendo significativa la diferencia al comparar con las pDC del grupo de VIH⁻ ($p=0.0009$ y $p=0.0441$, CTs y virémicos respectivamente; figura 15b). Se observa un comportamiento similar después de la estimulación con ssRNA40, figura 15c.

En la figura 15d se muestra en histogramas representativos la expresión de CD86 en las pDC de un individuo de cada grupo. Se observa que en ausencia de estímulo la expresión de esta molécula es similar en los tres grupos de estudio, dato que confirma los resultados *ex vivo*. Después de estimular con CpG se observa un pequeño cambio en la expresión de CD86 en las pDC de los individuos VIH⁺, pero es menor al aumento que se observa en las pDC del individuo VIH⁻. Al determinar los índices de aumento se muestra que las pDC del grupo de VIH⁻ aumentan claramente la expresión de CD86 en respuesta a la estimulación con CpG y es significativamente mayor que la expresión de las pDC de los grupos VIH⁺ ($p=0.0070$ y $p=0.0253$, para CTs y V respectivamente; figura 15e.). Después del estímulo con ssRNA40 se observa un comportamiento similar, figura 15f.

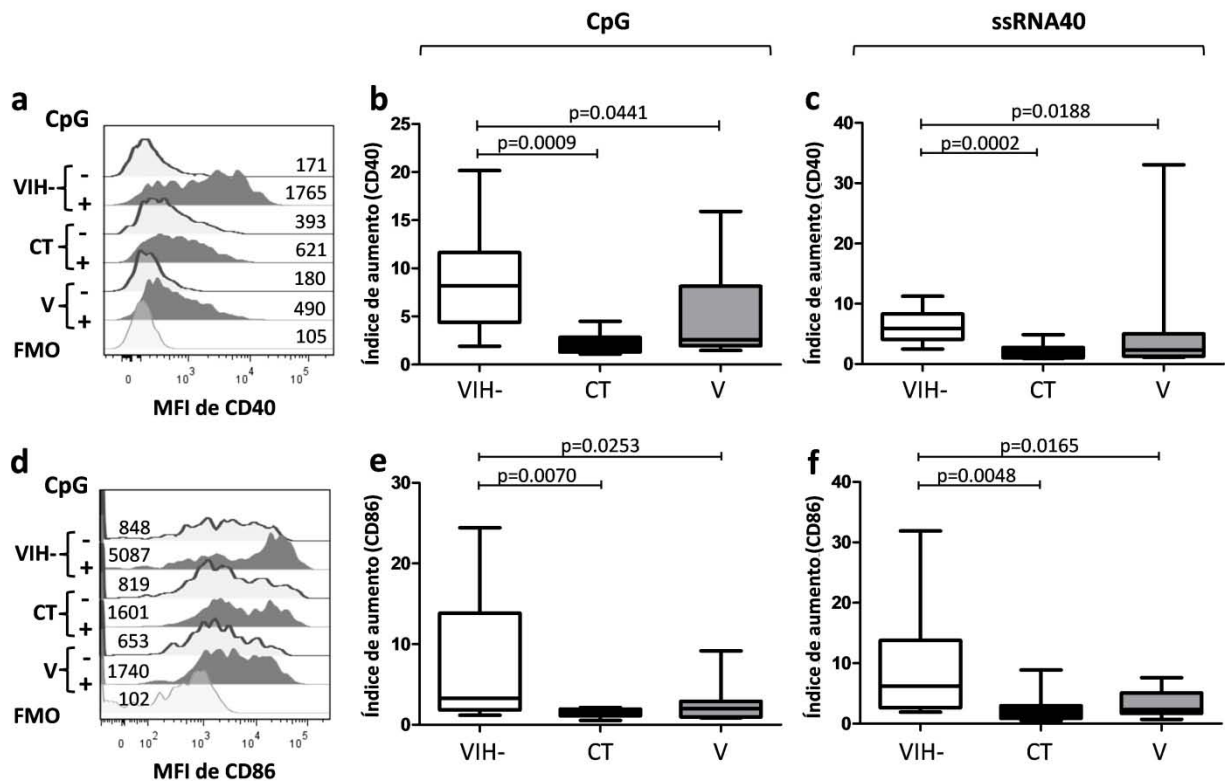


Figura 15. Expresión diferencial de moléculas de activación en pDC de individuos VIH⁺ y VIH⁻ después de estimular con CpG o ssRNA40. Se obtuvieron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con los ligandos de TLR por 18 horas y posteriormente se marcaron para determinar la expresión de CD40 (a) y CD86 (d) en las pDC por citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo por grupo con el estímulo de CpG, se incluyeron los valores de MFI. Se evaluó el índice de aumento en la expresión de CD40 (b y c) y CD86 (e y f) en las pDC de los individuos VIH⁻, CT y V después de 18 h de estímulo con CpG-ODN2216 (b y e) o ssRNA40 (c y f). El índice de aumento en la expresión de marcadores se calculó como el MFI de las pDC estimuladas dividido entre el MFI de las pDC sin estimular. n=13 para los individuos VIH⁻, n=8 para CT y n=9 para V. Los datos son mostrados en gráficos de cajas y bigotes: min-máx. Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. FMO (del inglés fluorescence minus one) Se consideró diferencia significativa cuando p<0.05.

Los resultados muestran que a diferencia de las cDC, las pDC de ambos individuos VIH⁺ CTs y virémicos tienen una baja capacidad de expresar marcadores de activación en su superficie en respuesta a estímulos de activación como los ligandos de TLR-8 y

TLR-9. Esto sugiere que las pDC pueden tener algún mecanismo de regulación negativa que no permite el aumento de moléculas de activación, o ya están en un estado exhausto en el cual ya no responden debido al ambiente de inflamación crónica en el que se encontraban. Esto podría indicar que las pDC no tienen la capacidad de participar como APC para la activación de linfocitos T y al tratarse de una infección viral se encuentran más afectadas que las cDC.

7.4.3. Producción diferencial de TNF- α por las pDC de los individuos virémicos y CTs en respuesta al estímulo de ssRNA40

Para determinar si la ausencia de expresión de marcadores de activación en las pDC de los individuos VIH⁺ influía en su capacidad de producir citocinas, se evaluó la producción intracelular de TNF- α e IFN- α en las pDC después de activar PBMC con ssRNA40 o CpG-ODN2216. En la figura 16a, se muestra un ejemplo representativo, en graficas de puntos, de la producción de TNF- α e IFN- α en pDC de los grupos de estudio después de estimular con CpG, ligando de TLR-9. Sólo con este estímulo se detectó IFN- α intracelular. Se observa que los individuos de estudio tienen una frecuencia similar de pDC TNF- α ⁺ e IFN- α ⁺. Al graficar todos los individuos del ensayo, figura 16b-d, se observa que en ausencia de estímulo hay una baja producción de citocinas que no es significativamente diferente al comparar entre grupos. Claramente las pDC de los individuos VIH⁺ y VIH⁻ se activan con los ligandos de TLR, ya que se encontró un aumento significativo al comparar el porcentaje de células citocinas positivas sin estímulo y con estímulo de cada grupo (no se marca en la gráfica $p < 0.01$). Después del estímulo con CpG no se encontraron diferencias en la frecuencia de pDC productoras de TNF- α o IFN- α al comparar entre los grupos de estudio, figura 16b y c. Después de activar las células con ssRNA40 se encontró una frecuencia similar de pDC TNF- α ⁺ en los individuos VIH⁻ y CTs. En cambio los individuos virémicos tienen mayor frecuencia de pDC TNF- α ⁺ al comparar con los CTs ($p=0.0370$; fig. 16d). Se hizo un análisis de correlación de la CVp con el porcentaje de pDC TNF- α ⁺ después del estímulo con ssRNA40 y se observan dos grupos claramente distribuidos pero no hay asociación entre estos dos parámetros (figura 16e).

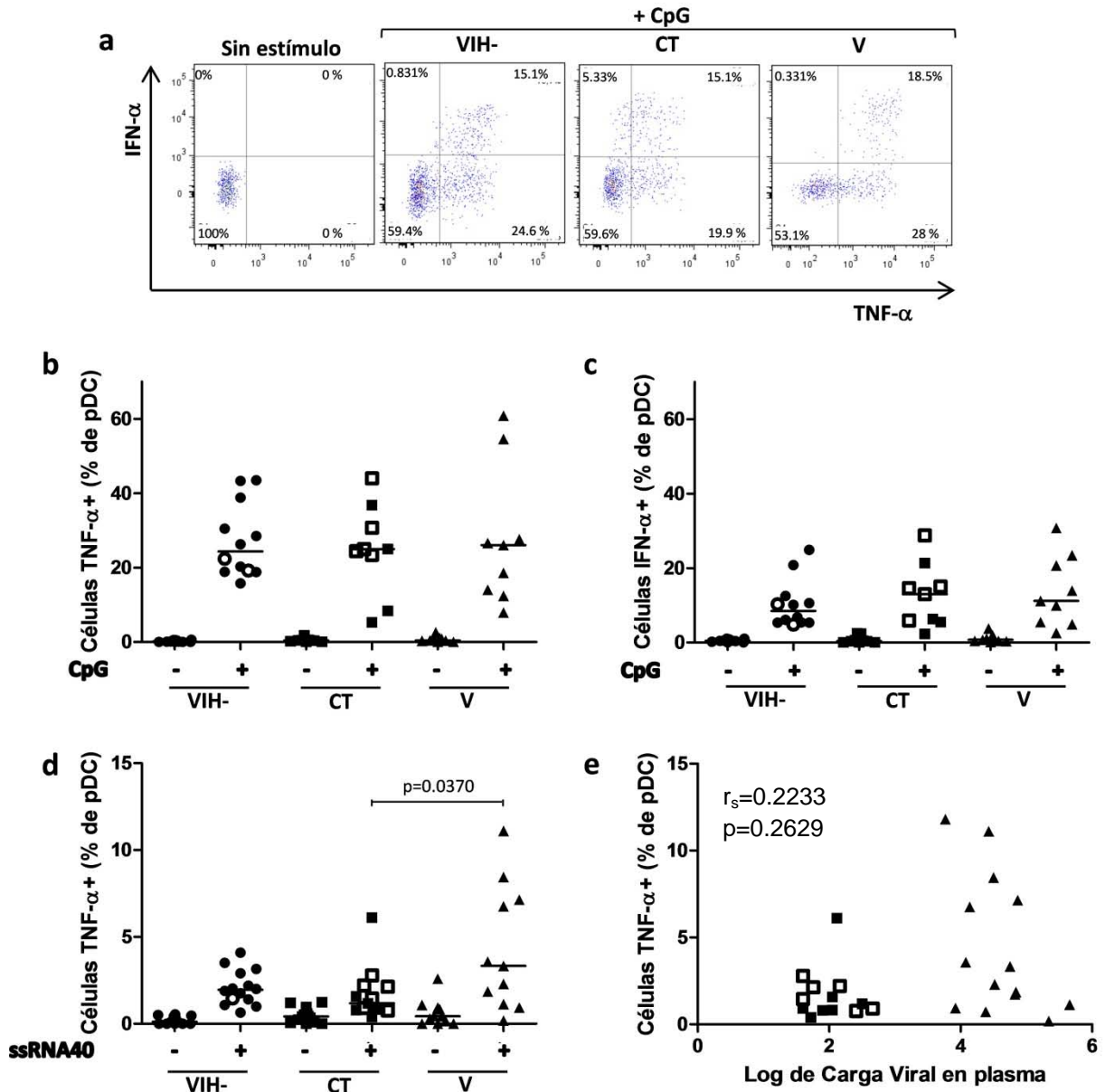


Figura 16. Producción diferencial de TNF- α por pDC de individuos virémicos y controladores en respuesta al estímulo de ssRNA40 Se aislaron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con CpG-ODN2216 (CpG) o ssRNA40 por 18 horas. Posteriormente se determinó por tinción intracelular la producción de TNF- α e IFN- α por las pDC. (a) En graficas de puntos se muestra un ejemplo representativo de pDC TNF- α ⁺ e IFN- α ⁺ después del estimular con CpG. Las gráficas muestran el porcentaje de pDC TNF- α ⁺ o IFN- α ⁺ en las muestras de VIH⁻ (n=13), CT (n=9 u 11) y V (n=9 u 11) después de estimular con CpG (b) y (c) o ssRNA40 (d). Correlación de la frecuencia de pDC TNF- α ⁺ después del estímulo con ssRNA40 y carga viral en plasma (e). Se muestra a los CT (cuadrados) y V (triángulos); individuos masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos

se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney y correlación de Spearman, respectivamente. Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

Estos resultados indican que las pDC de los individuos VIH⁺ CTs y virémicos, a pesar de no incrementar *in vivo* la expresión de marcadores de activación, aún son capaces de producir citocinas en respuesta a ligandos de TLR. La respuesta de las pDC de los individuos virémicos y CTs es similar frente al estímulo de CpG, pero difieren en respuesta a ssRNA40. Después de la estimulación con ssRNA40, los individuos virémicos tienen una mayor frecuencia de pDC TNF- α ⁺ en comparación con los CTs, lo cual podría contribuir a la activación crónica descrita en estos individuos.

7.4.4. Menor concentración de TNF- α , IFN- α e IP-10 en sobrenadantes de cultivo de células de CTs

Para evaluar si la cantidad de citocinas determinadas intracelularmente en las pDC se secretaba al medio y se reflejaba en el cultivo total de PBMC, se determinó la concentración de TNF- α , IFN- α e IP-10 en sobrenadantes de los cultivos después de estimular con los ligandos de TLR-8 y TLR-9. En la figura 17, se observa que en ausencia de estímulo no hay diferencia en la concentración de las moléculas de estudio al comparar entre grupos. Después de estimular con CpG no se observó diferencia en la concentración de TNF- α entre los grupos de estudio, pero si hay mayor concentración de IFN- α en los sobrenadantes de los cultivos de las células de los individuos VIH⁻ en comparación con los sobrenadantes de los VIH⁺ ($p=0.0044$ al comparar con CTs y $p=0.0009$ al comparar con virémicos; fig. 17a). Además se determinó la concentración de IP-10, como una proteína de respuesta a IFN, y se encontró menor concentración en los sobrenadantes de las células de CTs en comparación con los sobrenadantes de individuos virémicos ($p= 0.0104$) y VIH⁻ ($p= 0.0025$).

Después del estímulo con ssRNA40 se observó una menor concentración de TNF- α en los cultivos de los CTs en comparación con los cultivos de las células de individuos

virémicos ($p=0.0374$; figura 17b). También se observó menor concentración de IFN- α e IP-10 en los cultivos de los CTs, que es significativamente diferente al comparar con los cultivos de los individuos VIH⁻ ($p=0.0434$ y $p=0.0343$ respectivamente; figura 17b).

Estos resultados muestran que en respuesta a los ligandos de TLR hay menor producción de TNF- α , IFN- α e IP-10 en los cultivos de las células de CTs, lo cual podría sugerir que estos individuos cuentan con un mecanismo regulado que impide que se produzcan grandes cantidades de citocinas o tienen una incapacidad para producirlas.

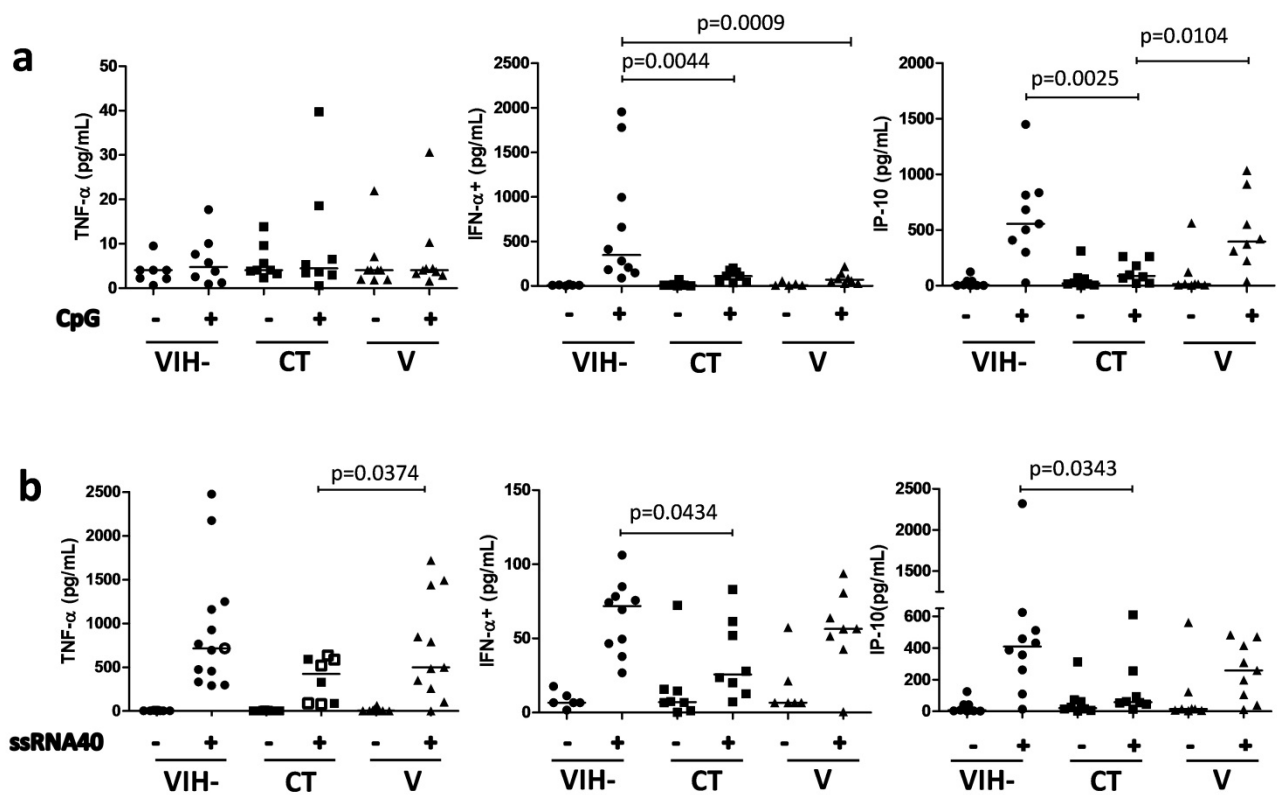


Figura 17. Menor concentración de TNF- α , IFN- α e IP-10 en sobrenadantes de cultivo de PBMC de individuos controladores estimuladas con TLR. Se aislaron PBMC de individuos VIH⁻ (VIH⁻), controladores (CT) y virémicos (V), se estimularon o no con CpG-ODN2216 (a) o ssRNA40 (b) por 18 horas. Posteriormente se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de TNF- α , IFN- α e IP-10 por ensayo de Luminex. Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

8. DISCUSIÓN

Existen diferentes mecanismos moleculares y celulares que contribuyen a la patogénesis durante la infección por VIH, además de la infección de las células T CD4⁺ y otras células, la activación crónica del sistema inmune parece tener un papel importante en la progresión de la enfermedad (Deeks et al., 2004; Hazenberg et al., 2003). Se ha descrito que en el plasma de los individuos infectados por VIH se encuentran productos bacterianos consecuencia de la translocación bacteriana (Brenchley et al., 2006; Estes et al., 2010), que pueden favorecer la activación crónica de las células del sistema inmune innato y adaptativo impactando en su función. Sin embargo, aún no es claro si las DC se activan durante el proceso, como esto puede afectar en su función y si pueden contribuir a la activación crónica del sistema inmune.

En el presente trabajo se encontraron diferencias en el fenotipo de las cDC y pDC de los individuos virémicos y CTs, así también en la producción de TNF- α en respuesta a LPS y ssRNA40 (en cDC y pDC respectivamente). Esto sugiere que las DC de los individuos virémicos y CTs contribuyen diferencialmente a la activación crónica del sistema inmune, lo cual pudiera tener consecuencias importantes en la patogénesis de la infección por VIH. De esta forma, las cDC y pDC de los individuos virémicos tienen una hiperrespuesta a la activación por TLR-4 y TLR-8 respectivamente, lo cual podría contribuir a la progresión de la patogénesis de la infección. Mientras que las DC de los CTs tienen una respuesta controlada a través de estos receptores.

Inicialmente se evaluaron las frecuencias y el número de DC en los grupos de estudio. Se encontró que en los individuos VIH⁺ hay una disminución tanto en la frecuencia como en el número de DC en sangre periférica en comparación con los individuos VIH⁻, resultados similares a lo ya reportado en la literatura (Chehimi et al., 2002; Pacanowski et al., 2001; Sabado et al., 2010). No se encontraron diferencias en estos parámetros entre individuos virémicos y CTs, lo cual indica que la disminución de DC puede ocurrir desde etapas tempranas de la infección por VIH, como ya ha sido reportado (Huang et al., 2011; Sabado et al., 2010), y se mantiene durante la etapa crónica independiente de la CVp.

También se encontró mayor concentración de sCD14 en el plasma de los individuos virémicos, como ya ha sido reportado por otros autores (Brenchley et al., 2006; Sandler et al., 2011). Adicionalmente se mostró que la CVp correlaciona de forma positiva con la concentración de sCD14 en plasma, marcador indirecto de la presencia de LPS, lo cual indica que la presencia de LPS y quizá otros componentes bacterianos se asocian con la CVp y difiere en los grupos VIH⁺ evaluados en este estudio. Así la diferencia en productos bacterianos observada en los individuos virémicos y CTs puede impactar de forma distinta en la activación de las DC.

Como previamente se ha reportado (Barron et al., 2003; Dillon et al., 2008), se encontró un fenotipo parcialmente activado en las cDC y pDC de los individuos VIH⁺ en comparación con las DC de los individuos VIH⁻. De forma interesante se encontró un fenotipo distinto en los grupos VIH⁺; el fenotipo parcialmente activado en las cDC y pDC de los individuos virémicos se caracterizó por un mayor porcentaje de células CD40⁺ en ausencia de otros marcadores de activación. En cambio el fenotipo de activación parcial en las cDC de los CTs muestra mayor expresión de CD86 y CD47, y en las pDC únicamente CD47. La diferente expresión de marcadores de activación en las DC de CTs e individuos virémicos, fenotipo *ex vivo*, podría ser consecuencia del contacto continuo con productos bacterianos y/o virales o quizá debido a una señalización distinta, así también puede verse influenciado por el microambiente inflamatorio derivado de la activación crónica del sistema inmune. El fenotipo *ex vivo* que se observó en las DC de los CTs indica un fenotipo menos activado de estas células, lo cual puede resultar de la regulación de los IFN-I, que como se ha reportado tiene un papel importante en la patogénesis del VIH durante la etapa aguda de la infección por VIH/SIV (Hardy et al., 2013; Herbeuval and Shearer, 2007; Mandl et al., 2008). Así también las proteínas y genes de respuesta al IFN se han propuesto como marcadores de la infección para VIH (Bosinger et al., 2009; Rotger et al., 2011). De acuerdo con esto se encontró mayor expresión de CD47, una proteína que se expresa en respuesta a IFN (de Veer et al., 2001), en las cDC y pDC de CTs. Además se observó una correlación positiva de la expresión de CD86 y CD47 en las cDC de los individuos VIH⁺, lo cual indicaría una relación entre estos dos marcadores y su posible regulación por IFN. Se ha reportado que la expresión de CD47 en cDC es importante para su

migración a órganos linfoides secundarios (Van et al., 2006) y la señalización a través de CD47 en DC limita la producción de citocinas proinflamatorias, manteniendo a estas células en un estado inmaduro (Demeure et al., 2000). Así el IFN- α en respuesta a la infección viral podría inducir la expresión de CD47 y la señalización a través de este marcador favorecer la expresión de CD86 pero no CD40, manteniendo un fenotipo parcialmente maduro. En cambio se ha reportado que la interacción de CD40-CD40L en las pDC disminuye la producción de IFN- α , lo cual puede favorecer la progresión de la enfermedad en los individuos virémicos al inhibir la respuesta antiviral (Donhauser et al., 2012).

La consecuencia funcional de un fenotipo parcial como el que se observó en las cDC y pDC de los CTs e individuos virémicos en la activación de las células T necesita ser estudiado, pero se ha reportado que los CTs cuentan con una respuesta de células CD4⁺ y CD8⁺ específicas contra el VIH (Blankson, 2010; Emu et al., 2005; Friedrich et al., 2007), lo cual podría explicar parcialmente el control de la replicación viral en estos individuos. Por lo tanto, es posible que las DC de los CTs, a pesar de ser diferentes a las DC de los individuos sin infección, aún sean capaces de inducir la activación de células T específicas contra el VIH y apagar su activación quizá mediado por IFN. A diferencia de las DC de los individuos virémicos que mantienen la expresión de CD40 y parecen no apagar la señal, estas células ya no podrían inducir una respuesta específica de células T contra el virus o quizá favorecerían la activación de células no específicas.

Para evaluar si las diferencias en el fenotipo *ex vivo* podía ser consecuencia de la interacción con ligandos derivados de productos bacterianos o virales se determinó el fenotipo y la capacidad de producción de citocinas de las DC de individuos CTs y virémicos en respuesta a ligandos de TLR bacterianos (LPS/TLR-4; CpG/TLR-9) o virales (ssRNA/TLR-8; CpG/TLR-9).

Después de la estimulación *in vitro* con los ligandos de TLR, se observaron diferentes patrones de expresión de los marcadores de activación en las DC. Por un lado, se observó que las cDC de individuos virémicos incrementan la expresión de CD40 pero no CD86 en respuesta a ligandos de TLR-4 y TLR-8, en contraste las cDC de CTs

tienen sólo un ligero aumento en la expresión de ambos marcadores. Se conoce que la expresión de moléculas como CD40, CD86 y CD80 en DC son necesarias para la expansión y maduración de células T; pero la relevancia de expresar sólo una molécula versus otra en las cDC y su interacción con las células T se desconoce.

Por otro lado, las pDC de los CTs e individuos virémicos al ser estimuladas con los ligandos de TLR-8 y TLR-9 mostraron un pequeño incremento en la expresión de CD86 y CD40, comparada con la expresión de las pDC de VIH⁻. Estos resultados podrían indicar que aún en presencia de productos bacterianos y/o virales estas células cuentan con mecanismos de regulación negativa que impide que se sobre expresen los marcadores de activación, evitando que las pDC adquieran una actividad de célula presentadora de antígeno. Otra interpretación a estos resultados podría ser que estas células tengan un fenotipo exhausto y no son capaces de responder a los ligandos de TLR, ya que al tratarse de una infección viral crónica su función podría afectarse desde la etapa aguda de la infección.

De forma interesante, además del fenotipo diferencial de las cDC de los CTs e individuos virémicos después de activación *in vitro*, se encontraron también diferencias funcionales principalmente en respuesta a LPS. A pesar de que las cDC de CTs e individuos virémicos mostraron una producción de TNF- α basal al comparar con VIH⁻, el porcentaje de cDC TNF- α ⁺ después de la estimulación con LPS fue similar entre CTs e individuos VIH⁻. En cambio en los individuos virémicos se encontró mayor porcentaje de cDC TNF- α ⁺, al comparar con los CTs e individuos VIH⁻, indicando una hiperrespuesta a LPS. Estos resultados sugieren que a pesar que las cDC de los individuos CTs pudieron haber estado en contacto con productos bacterianos y en un medio pro-inflamatorio responden similar a los individuos VIH⁻, lo cual sugiere nuevamente la presencia de mecanismos de regulación negativa que impide la sobreproducción de TNF- α en respuesta a LPS. También se encontró una correlación positiva entre el porcentaje de cDC TNF- α ⁺ en respuesta a LPS y la CV ρ , sugiriendo que la cantidad de viriones está asociado con la capacidad de respuesta de las cDC a través de TLR-4. Se ha reportado que el TNF- α induce la replicación del VIH en los linfocitos T CD4⁺ infectados, por la ruta de activación de NF- κ B (Duh et al., 1989; Lacoste et al., 1990),

favoreciendo alta CVp en los individuos VIH⁺ virémicos. Consistente con estos resultados, la hiperrespuesta de TNF- α al LPS en las cDC de los individuos virémicos contribuirían con la progresión de la infección. No se encontraron diferencias en la producción de IL-12 entre CTs e individuos virémicos cuando se estimularon con LPS o ssRNA40. El que IL-12 no se incremente en las cDC de los individuos virémicos en respuesta a la estimulación por TLR-4, sugiere que la hiperrespuesta a LPS en la infección por VIH es polarizada sólo a algunas citocinas, en este caso principalmente TNF- α .

En los sobrenadantes de cultivo de las células de individuos virémicos se encontró mayor concentración de TNF- α que en los otros grupos de estudio, sugiriendo que la sobreproducción de TNF- α observada en las cDC se refleja en el cultivo de células totales. Posteriormente se evaluó si otras células podrían participar en la alta producción de TNF- α en los individuos virémicos y se encontró que los monocitos (células CD14⁺) también eran una fuente importante de esta citocina, pero no se observaron diferencias entre los grupos de estudio. Esto indica que la producción de TNF- α diferencial entre individuos VIH⁺ virémicos y CTs está dada principalmente por las cDC. Se ha descrito que grandes cantidades de TNF- α participan en la destrucción de células epiteliales intestinales (Leppkes et al., 2014; Wang et al., 2005) permitiendo el aumento en la translocación de productos bacterianos que se observan en los individuos VIH⁺ virémicos. De esta forma la mayor producción de TNF- α por las cDC de los individuos virémicos en respuesta a LPS, podría contribuir al daño en mucosas, al aumento de la activación de las células del sistema inmune y progresión de la patogénesis de la infección.

En individuos VIH⁺ virémicos se ha reportado que los monocitos MDC-8⁺ se incrementan en número y son los principales productores de TNF- α en respuesta a la activación por LPS (Dutertre et al., 2012). En el presente trabajo no se evaluó esta población específicamente pero es posible que estas cDC provenientes de monocitos contribuyan a la alta producción de TNF- α en los individuos virémicos.

También se encontró mayor concentración de IL-1 β en los sobrenadantes de los cultivos de las células de individuos virémicos en comparación con los cultivos de los CTs. Se evaluó la producción intracelular de esta citocina y se encontró que prácticamente todos los monocitos producen IL-1 β en los tres grupos de estudio, en cambio las cDC de los CTs tienen un menor porcentaje de células positivas para IL-1 β que los individuos virémicos, lo cual nuevamente podría deberse a un mecanismo de regulación en la producción de citocinas en las cDC de los individuos CTs.

En conjunto los resultados de las cDC sugieren que a pesar de no haber encontrado diferencia significativa en la concentración de sCD14 entre CTs e individuos virémicos, es posible que las cDC de los CTs puedan mantener mecanismos de regulación, aún en la presencia de productos bacterianos como el LPS, que evitan la activación exacerbada a través de TLR-4 e involucra la producción regulada de TNF- α e IL- β . En cambio, la combinación de más de un factor que favorezca la activación crónica, como la alta carga viral, productos bacterianos y disminución de células T CD4 en conjunto con la ausencia de mecanismos de regulación negativa pueden ser los responsables de la hiperrespuesta de las cDC al LPS que se observa en los individuos virémicos y no en los CTs.

Se ha reportado que la expresión de TLR-4 correlaciona positivamente con la CVp, pero no con la concentración de LPS (Lester et al., 2009). Esto podría sugerir que la menor expresión de TLR-4, relacionada con la baja CVp, en los CTs podría favorecer una menor respuesta al LPS. Se evaluó la expresión tanto de TLR-4 como de TLR-8 en las cDC y no se encontró diferencias significativas, por lo que la respuesta diferencial al LPS en nuestros grupos de estudio no se debe a la expresión de TLR-4. Lo cual sugiere que las diferencias pueden ser consecuencia de una señalización intracelular regulada o diferente a través de estos receptores.

A diferencia de las cDC, las pDC son células con gran capacidad de producir IFN-I en respuesta a estímulos virales. Algunos reportes en la literatura sugieren que las pDC de individuos VIH⁺ están disfuncionales al perder su capacidad de producción de IFN-I. En este trabajo se mostró que el fenotipo de las pDC presenta cambios mínimos en la expresión de marcadores de activación en respuesta a los ligandos de TLR-9 y TLR-8 en los grupos de individuos VIH⁺ virémicos y CTs. Sugiriendo que quizá las pDC están afectadas desde la etapa aguda de la infección y ya no son capaces de producir citocinas, como ya ha sido reportado por otros autores (Huang et al., 2011).

Para determinar si la producción de citocinas estaba disfuncional en las pDC, se evaluó la producción intracelular de IFN- α y TNF- α en estas células de los individuos VIH⁺ y VIH⁻ después de estimular con ligandos de TLR. Los individuos virémicos y CTs tienen la misma frecuencia de pDC positivas para IFN- α y TNF- α que los individuos VIH⁻ al estimularse a través de TLR-9 con CpG-ODN2216. Claramente hay diferencia entre con y sin estímulo lo que indica que las pDC responden al estímulo con producción de citocinas, a pesar de no haber aumento en la expresión de marcadores en su superficie, lo cual indica su capacidad de respuesta y no un estado exhausto.

Con el estímulo de ssRNA40 que es una secuencia sintética de RNA del virus de VIH, ligando de TLR-8, se observó mayor porcentaje de pDC TNF- α ⁺ en los individuos virémicos en comparación con los CTs, este resultado es similar a lo que se había observado en las cDC diferencia en respuesta al ligando de TLR-4 con producción de TNF- α . Estos resultados sugieren que la respuesta diferencial entre individuos virémicos y CTs pueden extenderse a otra subpoblación de DC y otros TLR pero la consecuencia observada principalmente es la mayor producción de TNF- α .

Se ha reportado que en individuos virémicos hay un mayor porcentaje de pDC TNF- α ⁺ en respuesta a CL097, ligando de TLR-7/8, en comparación con los CTs elite (Chang et al., 2012). Estos resultados sugieren que las pDC de los individuos CTs responden de forma regulada a RNA de cadena sencilla, pudiendo ser activadas por TLR-7 o quizá TLR-8.

La infección por VIH se ha asociado con un incremento en la expresión de RNAm de TLR-6, TLR-7 y TLR-8 en PBMC; y la expresión de TLR-7 correlaciona positivamente con la CVp (Lester et al., 2008). Esto explicaría en parte la mayor respuesta de las pDC de los individuos virémicos al estímulo de RNA de cadena sencilla.

Se ha descrito que las pDC de humano expresan TLR-7 y TLR-9, pero carecen de la expresión de TLR-8 (Jarrossay et al., 2001; Kadowaki et al., 2001; Ueno et al., 2007). TLR-7, TLR-8 y TLR-9, son receptores con alta homología en su secuencia, reconocen moléculas de RNA y DNA respectivamente (Roach et al., 2005; Wagner, 2004). TLR-7 y TLR-8 se activan por RNA de cadena sencilla ricos en uridina o guanosa de los virus o compuestos sintéticos imidazoquinolinas: imiquimod y R-848, así como análogos de guanosa (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004; Lund et al., 2004). Se ha demostrado que el TLR-8 en pDC murinas puede detectar DNA rico en poly (A)/T (Martinez et al., 2010). En humanos se ha descrito que las pDC de individuos VIH⁺ y VIH⁻ se activan por agonistas de TLR-7, TLR-8 y TLR-7/8, encontrando mayor porcentaje de pDC CD86⁺, CD83⁺ y CD40⁺ en respuesta a dichos estímulos, pero sólo al activarse por TLR-7 producen IFN- α (Martinson et al., 2007a); la producción de IFN- α es menor en los individuos VIH⁺. Adicionalmente se ha reportado que la producción de IFN- α por pDC en respuesta a VIH (infeccioso o atenuado) o ssRNA40 ocurre a través de la inducción de autofagia seguido de señalización por TLR-7 (Zhou et al., 2012). De esta forma es posible que las pDC de humano respondan a los ligandos de TLR-8 como el ssRNA40 a través de TLR-7 o induzcan la expresión del TLR-8 al activarse.

Contrario a lo que se observó de forma intracelular, en los sobrenadantes de los cultivos de los individuos VIH⁺ CTs y virémicos se observó una menor concentración de IFN- α en comparación con los sobrenadantes de los individuos VIH⁻, lo cual concuerda con otros estudios (Chehimi et al., 2002; Donaghy et al., 2001; Feldman et al., 2001; Machmach et al., 2012). El que haya una discrepancia entre la frecuencia de pDC productoras de IFN- α y la citocina liberada al medio en respuesta a CpG-ODN2216, sugiere que posiblemente en la infección por VIH otras células contribuyen a la producción de IFN- α , como ha sido propuesto por otros grupos (Kader et al., 2013; Nascimbeni et al., 2009). Otra explicación podría ser que la citocina producida en la

pDC se libera pero al encontrarse en menor número en los individuos VIH⁺ no se refleja el aumento en los sobrenadantes de PBMC al ser estimuladas.

De forma interesante se encontró una menor concentración de TNF- α , IFN- α e IP-10 en respuesta a ssRNA40 en los cultivos de las células de los CTs, lo cual sugiere que estas células de alguna forma regulan la producción de citocinas en respuesta al estímulo con el que probablemente estuvieron en contacto, en este caso RNA de cadena sencilla del virus, o son inherentemente menos capaces de producirlas.

En general encontramos que las DC de los CTs tienen una respuesta regulada con baja producción de TNF- α . Una posibilidad era que tuvieran menor expresión de receptores tipo Toll, pero no se encontraron diferencias en la expresión de TLR-4 y TLR-8 entre individuos VIH⁺. Por lo cual es posible que la regulación en la producción de TNF- α involucre la señalización intracelular de los TLR. Existen varios niveles a los cuales se puede regular la producción de TNF- α , se ha descrito que la acumulación y estabilización del mRNA de TNF- α favorece la alta producción de esta citocina en respuesta a LPS (Kishore et al., 2004), de esta forma las DC de los individuos virémicos podrían exacerbar su respuesta al LPS, no así las DC de los CTs. También se ha demostrado que la expresión de moléculas que regulan la cascada de activación de los TLR participan en los mecanismos de tolerancia a través de estos receptores, entre estas moléculas se ha descrito que A20, enzima deubiquitinasa, es esencial para tolerancia al LPS (Li et al., 2013; Xiong et al., 2011). También otras moléculas como IRAK1 y SOCS1 apagan la señalización de la activación de TLR (Liew et al., 2005). Otros mecanismos de regulación que podrían estar participando es la expresión de miRNAs que regulan la activación de los TLR (Smyth et al., 2015). En trabajos futuros sería interesante evaluar estas posibilidades de regulación en las DC de los CTs e individuos virémicos para determinar los mecanismos que participan en la inhibición o en la sobreproducción de TNF- α respectivamente y proponerlo como posibles blancos terapéuticos.

En resumen, en el presente trabajo se describió que las cDC y pDC de los individuos virémicos y CTs difieren en fenotipo y función. Se encontró que las DC de individuos VIH⁺ CTs y virémicos tienen un fenotipo de activación parcial *ex vivo*. Las cDC y pDC de los individuos virémicos se caracterizan por la expresión de CD40, en tanto que los CTs se caracterizan por la mayor expresión de CD86 y CD47 en cDC, y sólo CD47 en las pDC. Después de activación *in vitro* las DC tienen diferente comportamiento en respuesta a los ligandos de TLR. Se encontró que las cDC en respuesta a LPS y las pDC en respuesta a ssRNA40 de los individuos virémicos tienen mayor capacidad de producir TNF- α que las DC de los CTs. Esta mayor producción de TNF- α en los individuos virémicos podría contribuir en la progresión de infección. Estos resultados y la menor concentración de otras citocinas proinflamatorias, sugieren que las DC de los CTs mantienen mecanismos de regulación negativa que evitan que respondan excesivamente como lo hacen las DC de los individuos virémicos, indicando que estas células responden diferente a la activación inmune crónica. En cambio la hiperrespuesta de las DC de los individuos virémicos podría favorecer la activación crónica del sistema inmune, sugiriendo la participación de estas células en la progresión de la enfermedad.

9. CONCLUSIÓN

Las cDC y pDC de individuos VIH⁺ virémicos tienen un fenotipo de activación parcial y mayor producción de TNF- α en respuesta a LPS o ssRNA40 respectivamente, con lo cual podrían contribuir en el proceso de activación crónica del sistema inmune, descrito en estos individuos. En cambio, las cDC y pDC de los CTs parecen tener una respuesta regulada a ligandos de TLR-4 y TLR-8 respectivamente, sugiriendo que estas células responden de forma diferente a la activación crónica y son capaces de controlar la producción de mediadores inflamatorios para evitar el daño a tejidos y activación del sistema inmunológico.

Considerando el uso de las DC como una alternativa de terapia o vacuna para controlar la replicación del VIH, sería importante encontrar adyuvantes que logren la expresión adecuada de marcadores de activación para que estas células puedan funcionar eficientemente como célula presentadora de antígeno. Así también lograr una respuesta controlada como la que se observó en las DC de los CTs, para que en el microambiente de inflamación crónica y presencia de componentes virales o bacterianos, se evite la sobreproducción de citocinas como TNF- α e IL-1 β .

10. REFERENCIAS

- Appay, V., Nixon, D.F., Donahoe, S.M., Gillespie, G.M., Dong, T., King, A., Ogg, G.S., Spiegel, H.M., Conlon, C., Spina, C.A., *et al.* (2000). HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* *192*, 63-75.
- Appay, V., Papagno, L., Spina, C.A., Hansasuta, P., King, A., Jones, L., Ogg, G.S., Little, S., McMichael, A.J., Richman, D.D., and Rowland-Jones, S.L. (2002). Dynamics of T cell responses in HIV infection. *J Immunol* *168*, 3660-3666.
- Appay, V., and Sauce, D. (2008). Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol* *214*, 231-241.
- Aziz, N., Nishanian, P., Taylor, J.M., Mitsuyasu, R.T., Jacobson, J.M., Dezube, B.J., Lederman, M.M., Detels, R., and Fahey, J.L. (1999). Stability of plasma levels of cytokines and soluble activation markers in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* *179*, 843-848.
- Baban, B., Chandler, P.R., Sharma, M.D., Pihkala, J., Koni, P.A., Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2009). IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J Immunol* *183*, 2475-2483.
- Barblu, L., Machmach, K., Gras, C., Delfraissy, J.F., Boufassa, F., Leal, M., Ruiz-Mateos, E., Lambotte, O., and Herbeuval, J.P. (2012). Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon-alpha and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *J Infect Dis* *206*, 790-801.
- Barcellini, W., Rizzardi, G.P., Poli, G., Tambussi, G., Velati, C., Meroni, P.L., Dalgleish, A.G., and Lazzarin, A. (1996). Cytokines and soluble receptor changes in the transition from primary to early chronic HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* *12*, 325-331.
- Barchet, W., Blasius, A., Cella, M., and Colonna, M. (2005a). Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses. *Immunol Res* *32*, 75-83.
- Barchet, W., Cella, M., and Colonna, M. (2005b). Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Seminars in immunology* *17*, 253-261.
- Barron, M.A., Blyveis, N., Palmer, B.E., MaWhinney, S., and 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. *J Infect Dis* *187*, 26-37.
- Beignon, A.S., McKenna, K., Skoberne, M., Manches, O., DaSilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. (2005). Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest* *115*, 3265-3275.
- Benlahrech, A., Yasmin, A., Westrop, S.J., Coleman, A., Herasimtschuk, A., Page, E., Kelleher, P., Gotch, F., Imami, N., and Patterson, S. (2012). Dysregulated immunophenotypic attributes of plasmacytoid but not myeloid dendritic cells in HIV-1 infected individuals in the absence of highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* *170*, 212-221.
- Bennett, C.L., van Rijn, E., Jung, S., Inaba, K., Steinman, R.M., Kapsenberg, M.L., and Clausen, B.E. (2005). Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* *169*, 569-576.
- Betts, M.R., Nason, M.C., West, S.M., De Rosa, S.C., Migueles, S.A., Abraham, J., Lederman, M.M., Benito, J.M., Goepfert, P.A., Connors, M., *et al.* (2006). HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* *107*, 4781-4789.
- Biancotto, A., Grivel, J.C., Iglehart, S.J., Vanpouille, C., Lisco, A., Sieg, S.F., Debernardo, R., Garate, K., Rodriguez, B., Margolis, L.B., and Lederman, M.M. (2007). Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood* *109*, 4272-4279.
- Blankson, J.N. (2010). Effector mechanisms in HIV-1 infected elite controllers: highly active immune responses? *Antiviral Res* *85*, 295-302.

Bosinger, S.E., Li, Q., Gordon, S.N., Klatt, N.R., Duan, L., Xu, L., Francella, N., Sidahmed, A., Smith, A.J., Cramer, E.M., *et al.* (2009). Global genomic analysis reveals rapid control of a robust innate response in SIV-infected sooty mangabeys. *J Clin Invest* *119*, 3556-3572.

Brenchley, J.M., Price, D.A., Schacker, T.W., Asher, T.E., Silvestri, G., Rao, S., Kazzaz, Z., Bornstein, E., Lambotte, O., Altmann, D., *et al.* (2006). Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* *12*, 1365-1371.

Brown, K.N., Wijewardana, V., Liu, X., and Barratt-Boyes, S.M. (2009). Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog* *5*, e1000413.

Cameron, P.U., Forsum, U., Tepler, H., Granelli-Piperno, A., and Steinman, R.M. (1992). During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4⁺ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol* *88*, 226-236.

Chang, J.J., Lacas, A., Lindsay, R.J., Doyle, E.H., Axten, K.L., Pereyra, F., Rosenberg, E.S., Walker, B.D., Allen, T.M., and Altfeld, M. (2012). Differential regulation of toll-like receptor pathways in acute and chronic HIV-1 infection. *AIDS* *26*, 533-541.

Chehimi, J., Campbell, D.E., Azzoni, L., Bacheller, D., Papasavvas, E., Jerandi, G., Mounzer, K., Kostman, J., Trinchieri, G., and 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*, 4796-4801.

de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., and Williams, B.R. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* *69*, 912-920.

de Witte, L., Nabatov, A., Pion, M., Fluitsma, D., de Jong, M.A., de Gruijl, T., Piguet, V., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2007). Langerin is a natural barrier to HIV-1 transmission by Langerhans cells. *Nat Med* *13*, 367-371.

Deeks, S.G., Kitchen, C.M., Liu, L., Guo, H., Gascon, R., Narvaez, A.B., Hunt, P., Martin, J.N., Kahn, J.O., Levy, J., *et al.* (2004). Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4⁺ T-cell changes independent of viral load. *Blood* *104*, 942-947.

Demeure, C.E., Tanaka, H., Mateo, V., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2000). CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* *164*, 2193-2199.

Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* *303*, 1529-1531.

Dillon, S.M., Robertson, K.B., Pan, S.C., Mawhinney, S., Meditz, A.L., Folkvord, J.M., Connick, E., McCarter, M.D., and Wilson, C.C. (2008). Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* *48*, 1-12.

Diop, O.M., Ploquin, M.J., Mortara, L., Faye, A., Jacquelin, B., Kunkel, D., Lebon, P., Butor, C., Hosmalin, A., Barre-Sinoussi, F., and Muller-Trutwin, M.C. (2008). Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol* *82*, 5145-5152.

Donaghy, H. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* *101*, 4505-4511.

Donaghy, H., Pozniak, A., Gazzard, B., Qazi, N., Gilmour, J., Gotch, F., and 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*, 2574-2576.

Donhauser, N., Pritschet, K., Helm, M., Harrer, T., Schuster, P., Ries, M., Bischof, G., Vollmer, J., Smola, S., and Schmidt, B. (2012). Chronic immune activation in HIV-1 infection contributes to reduced interferon alpha production via enhanced CD40:CD40 ligand interaction. *PLoS One* 7, e33925.

Duh, E.J., Maury, W.J., Folks, T.M., Fauci, A.S., and Rabson, A.B. (1989). Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5974-5978.

Dutertre, C.A., Amraoui, S., DeRosa, A., Jourdain, J.P., Vimeux, L., Goguet, M., Degrelle, S., Feuillet, V., Liovat, A.S., Muller-Trutwin, M., *et al.* (2012). Pivotal role of M-DC8(+) monocytes from viremic HIV-infected patients in TNFalpha overproduction in response to microbial products. *Blood* 120, 2259-2268.

Emu, B., Sinclair, E., Favre, D., Moretto, W.J., Hsue, P., Hoh, R., Martin, J.N., Nixon, D.F., McCune, J.M., and Deeks, S.G. (2005). Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment. *J Virol* 79, 14169-14178.

Estes, J.D., Harris, L.D., Klatt, N.R., Tabb, B., Pittaluga, S., Paiardini, M., Barclay, G.R., Smedley, J., Pung, R., Oliveira, K.M., *et al.* (2010). Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog* 6, e1001052.

Favre, D., Mold, J., Hunt, P.W., Kanwar, B., Loke, P., Seu, L., Barbour, J.D., Lowe, M.M., Jayawardene, A., Aweeka, F., *et al.* (2010). Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Science translational medicine* 2, 32ra36.

Feldman, S., Stein, D., Amrute, S., Denny, T., Garcia, Z., Kloser, P., Sun, Y., Megjugorac, N., and 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, 201-210.

Fitzgerald-Bocarsly, P., and Jacobs, E.S. (2010). Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection: striking a delicate balance. *J Leukoc Biol* 87, 609-620.

Fong, L., Mengozzi, M., Abbey, N.W., Herndier, B.G., and Engleman, E.G. (2002). Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* 76, 11033-11041.

Fonteneau, J.F., Larsson, M., Beignon, A.S., McKenna, K., Dasilva, I., Amara, A., Liu, Y.J., Lifson, J.D., Littman, D.R., and Bhardwaj, N. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J Virol* 78, 5223-5232.

Friedrich, T.C., Valentine, L.E., Yant, L.J., Rakasz, E.G., Piaskowski, S.M., Furlott, J.R., Weisgrau, K.L., Burwitz, B., May, G.E., Leon, E.J., *et al.* (2007). Subdominant CD8+ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol* 81, 3465-3476.

Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E.R., Dierich, M.P., and Wachter, H. (1988). Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. *Immunology today* 9, 150-155.

Geijtenbeek, T.B., Kwon, D.S., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Middel, J., Cornelissen, I.L., Nottet, H.S., KewalRamani, V.N., Littman, D.R., *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100, 587-597.

Gil-Torregrosa, B.C., Lennon-Dumenil, A.M., Kessler, B., Guermonprez, P., Ploegh, H.L., Fruci, D., van Endert, P., and Amigorena, S. (2004). Control of cross-presentation during dendritic cell maturation. *European journal of immunology* 34, 398-407.

Gilliet, M., Cao, W., and Liu, Y.J. (2008). Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 8, 594-606.

Giorgi, J.V., and Detels, R. (1989). T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clinical immunology and immunopathology* 52, 10-18.

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., *et al.* (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. *J Infect Dis* *179*, 859-870.

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., and 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*, 346-355.

Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E., and Picker, L.J. (2006). Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* *12*, 289-295.

Hardy, G.A., Sieg, S., Rodriguez, B., Anthony, D., Asaad, R., Jiang, W., Mudd, J., Schacker, T., Funderburg, N.T., Pilch-Cooper, H.A., *et al.* (2013). Interferon-alpha is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLoS One* *8*, e56527.

Hazenberg, M.D., Otto, S.A., van Benthem, B.H., Roos, M.T., Coutinho, R.A., Lange, J.M., Hamann, D., Prins, M., and Miedema, F. (2003). Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* *17*, 1881-1888.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* *303*, 1526-1529.

Herbeuval, J.P., and Shearer, G.M. (2007). HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* *123*, 121-128.

Huang, F.P., and MacPherson, G.G. (2001). Continuing education of the immune system--dendritic cells, immune regulation and tolerance. *Curr Mol Med* *1*, 457-468.

Huang, J., Burke, P.S., Cung, T.D., Pereyra, F., Toth, I., Walker, B.D., Borges, L., Lichterfeld, M., and Yu, X.G. (2010). Leukocyte immunoglobulin-like receptors maintain unique antigen-presenting properties of circulating myeloid dendritic cells in HIV-1-infected elite controllers. *J Virol* *84*, 9463-9471.

Huang, J., Yang, Y., Al-Mozaini, M., Burke, P.S., Beamon, J., Carrington, M.F., Seiss, K., Rychert, J., Rosenberg, E.S., Lichterfeld, M., and Yu, X.G. (2011). Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* *204*, 1557-1562.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* *5*, 987-995.

Jacquelin, B., Mayau, V., Targat, B., Liovat, A.S., Kunkel, D., Petitjean, G., Dillies, M.A., Roques, P., Butor, C., Silvestri, G., *et al.* (2009). Nonpathogenic SIV infection of African green monkeys induces a strong but rapidly controlled type I IFN response. *J Clin Invest* *119*, 3544-3555.

Jarrossay, D., Napolitani, G., Colonna, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* *31*, 3388-3393.

Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., *et al.* (2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* *17*, 211-220.

Kader, M., Smith, A.P., Guiducci, C., Wonderlich, E.R., Normolle, D., Watkins, S.C., Barrat, F.J., and Barratt-Boyes, S.M. (2013). Blocking TLR7- and TLR9-mediated IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells does not diminish immune activation in early SIV infection. *PLoS Pathog* *9*, e1003530.

Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R.W., Kastelein, R.A., Bazan, F., and Liu, Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* *194*, 863-869.

Killian, M.S., Fujimura, S.H., Hecht, F.M., and Levy, J.A. (2006). Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS* *20*, 1247-1252.

Kishore, R., McMullen, M.R., Cocuzzi, E., and Nagy, L.E. (2004). Lipopolysaccharide-mediated signal transduction: Stabilization of TNF-alpha mRNA contributes to increased lipopolysaccharide-stimulated TNF-alpha production by Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Comparative hepatology* 3 *Suppl 1*, S31.

Lacoste, J., D'Addario, M., Roulston, A., Wainberg, M.A., and Hiscott, J. (1990). Cell-specific differences in activation of NF-kappa B regulatory elements of human immunodeficiency virus and beta interferon promoters by tumor necrosis factor. *J Virol* 64, 4726-4734.

Langford, S.E., Ananworanich, J., and Cooper, D.A. (2007). Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Research and Therapy* 4, 11.

Langhoff, E., Terwilliger, E.F., Bos, H.J., Kalland, K.H., Poznansky, M.C., Bacon, O.M., and Haseltine, W.A. (1991). Replication of human immunodeficiency virus type 1 in primary dendritic cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7998-8002.

Lehmann, C., Harper, J.M., Taubert, D., Hartmann, P., Fatkenheuer, G., Jung, N., van Lunzen, J., Stellbrink, H.J., Gallo, R.C., and Romerio, F. (2008). Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 48, 522-530.

Lehmann, C., Lafferty, M., Garzino-Demo, A., Jung, N., Hartmann, P., Fatkenheuer, G., Wolf, J.S., van Lunzen, J., and Romerio, F. (2010). Plasmacytoid dendritic cells accumulate and secrete interferon alpha in lymph nodes of HIV-1 patients. *PLoS One* 5, e11110.

Leppkes, M., Roulis, M., Neurath, M.F., Kollias, G., and Becker, C. (2014). Pleiotropic functions of TNF-alpha in the regulation of the intestinal epithelial response to inflammation. *International immunology* 26, 509-515.

Lester, R.T., Yao, X.D., Ball, T.B., McKinnon, L.R., Kaul, R., Wachihi, C., Jaoko, W., Plummer, F.A., and Rosenthal, K.L. (2008). Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection. *AIDS* 22, 685-694.

Lester, R.T., Yao, X.D., Ball, T.B., McKinnon, L.R., Omenge, W.R., Kaul, R., Wachihi, C., Jaoko, W., Rosenthal, K.L., and Plummer, F.A. (2009). HIV-1 RNA dysregulates the natural TLR response to subclinical endotoxemia in Kenyan female sex-workers. *PLoS One* 4, e5644.

Li, Y., Zhang, P., Wang, C., Han, C., Meng, J., Liu, X., Xu, S., Li, N., Wang, Q., Shi, X., and Cao, X. (2013). Immune responsive gene 1 (IRG1) promotes endotoxin tolerance by increasing A20 expression in macrophages through reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* 288, 16225-16234.

Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., and O'Neill, L.A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* 5, 446-458.

Liu, Y.J. (2005). IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 23, 275-306.

Lo, C.C., Schwartz, J.A., Johnson, D.J., Yu, M., Aidarus, N., Mujib, S., Benko, E., Hyrcza, M., Kovacs, C., and Ostrowski, M.A. (2012). HIV delays IFN-alpha production from human plasmacytoid dendritic cells and is associated with SYK phosphorylation. *PLoS One* 7, e37052.

Lore, K., Smed-Sorensen, A., Vasudevan, J., Mascola, J.R., and Koup, R.A. (2005). Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp Med* 201, 2023-2033.

Lund, J.M., Alexopoulou, L., Sato, A., Karow, M., Adams, N.C., Gale, N.W., Iwasaki, A., and Flavell, R.A. (2004). Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5598-5603.

Machmach, K., Leal, M., Gras, C., Viciano, P., Genebat, M., Franco, E., Boufassa, F., Lambotte, O., Herbeuval, J.P., and Ruiz-Mateos, E. (2012). Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J Virol* 86, 4245-4252.

Malleret, B., Maneglier, B., Karlsson, I., Lebon, P., Nascimbeni, M., Perie, L., Brochard, P., Delache, B., Calvo, J., Andrieu, T., *et al.* (2008). Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood* *112*, 4598-4608.

Manches, O., and Bhardwaj, N. (2009a). Resolution of immune activation defines nonpathogenic SIV infection. *J Clin Invest* *119*, 3512-3515.

Manches, O., and Bhardwaj, N. (2009b). Resolution of immune activation defines nonpathogenic SIV infection. *Journal of Clinical Investigation*.

Manches, O., Fernandez, M.V., Plumas, J., Chaperot, L., and Bhardwaj, N. (2012). Activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by HIV controls a dendritic cell immunoregulatory phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 14122-14127.

Manches, O., Frleta, D., and Bhardwaj, N. (2014). Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol* *35*, 114-122.

Manches, O., Munn, D., Fallahi, A., Lifson, J., Chaperot, L., Plumas, J., and Bhardwaj, N. (2008). HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest* *118*, 3431-3439.

Mandl, J.N., Barry, A.P., Vanderford, T.H., Kozyr, N., Chavan, R., Klucking, S., Barrat, F.J., Coffman, R.L., Staprans, S.I., and Feinberg, M.B. (2008). Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* *14*, 1077-1087.

Martinez, J., Huang, X., and Yang, Y. (2010). Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 6442-6447.

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., and Landay, A.L. (2007a). Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cellular immunology* *250*, 75-84.

Martinson, J.A., Tenorio, A.R., Montoya, C.J., Al-Harhi, L., Gichinga, C.N., Krieg, A.M., Baum, L.L., and Landay, A.L. (2007b). Impact of class A, B and C CpG-oligodeoxynucleotides on in vitro activation of innate immune cells in human immunodeficiency virus-1 infected individuals. *Immunology* *120*, 526-535.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* *388*, 394-397.

Meyers, J.H., Justement, J.S., Hallahan, C.W., Blair, E.T., Sun, Y.A., O'Shea, M.A., Roby, G., Kottlilil, S., Moir, S., Kovacs, C.M., *et al.* (2007). Impact of HIV on cell survival and antiviral activity of plasmacytoid dendritic cells. *PLoS One* *2*, e458.

Muraille, E., Giannino, R., Guirnalda, P., Leiner, I., Jung, S., Pamer, E.G., and Lauvau, G. (2005). Distinct in vivo dendritic cell activation by live versus killed *Listeria monocytogenes*. *European journal of immunology* *35*, 1463-1471.

Nascimbeni, M., Perie, L., Chorro, L., Diocou, S., Kreitmman, L., Louis, S., Garderet, L., Fabiani, B., Berger, A., Schmitz, J., *et al.* (2009). Plasmacytoid dendritic cells accumulate in spleens from chronically HIV-infected patients but barely participate in interferon-alpha expression. *Blood* *113*, 6112-6119.

O'Brien, M., Manches, O., Sabado, R.L., Baranda, S.J., Wang, Y., Marie, I., Rolnitzky, L., Markowitz, M., Margolis, D.M., Levy, D., and Bhardwaj, N. (2011). Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN-alpha-producing and partially matured phenotype. *J Clin Invest* *121*, 1088-1101.

O'Keeffe, M., Hochrein, H., Vremec, D., Caminschi, I., Miller, J.L., Anders, E.M., Wu, L., Lahoud, M.H., Henri, S., Scott, B., *et al.* (2002). Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *The Journal of experimental medicine* *196*, 1307-1319.

Otero, M., Nunnari, G., Leto, D., Sullivan, J., Wang, F.X., Frank, I., Xu, Y., Patel, C., Dornadula, G., Kulkosky, J., and Pomerantz, R.J. (2003). Peripheral blood Dendritic cells are not a major reservoir for HIV type 1 in infected individuals on virally suppressive HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* *19*, 1097-1103.

Pacanowski, J., Kahi, S., Baillet, M., Lebon, P., Deveau, C., Goujard, C., Meyer, L., Oksenhendler, E., Sinet, M., and Hosmalin, A. (2001). Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* *98*, 3016-3021.

Paiardini, M., and Muller-Trutwin, M. (2013). HIV-associated chronic immune activation. *Immunol Rev* *254*, 78-101.

Pantaleo, G., and Fauci, A.S. (1996). Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* *50*, 825-854.

Patterson, S., and Knight, S.C. (1987). Susceptibility of human peripheral blood dendritic cells to infection by human immunodeficiency virus. *J Gen Virol* *68* (Pt 4), 1177-1181.

Rizzardi, G.P., Barcellini, W., Tambussi, G., Lillo, F., Malnati, M., Perrin, L., and Lazzarin, A. (1996). Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-1 infection: correlation with HIV-1 RNA and the clinical outcome. *AIDS* *10*, F45-50.

Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 9577-9582.

Romani, N., Holzmann, S., Tripp, C.H., Koch, F., and Stoitzner, P. (2003). Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *Apms* *111*, 725-740.

Rotger, M., Dalmau, J., Rauch, A., McLaren, P., Bosinger, S.E., Martinez, R., Sandler, N.G., Roque, A., Liebner, J., Battegay, M., *et al.* (2011). Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque. *J Clin Invest* *121*, 2391-2400.

Ruemmele, F.M., Beaulieu, J.F., Dionne, S., Levy, E., Seidman, E.G., Cerf-Bensussan, N., and Lentze, M.J. (2002). Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha. *Gut* *51*, 842-848.

Sabado, R.L., O'Brien, M., Subedi, A., Qin, L., Hu, N., Taylor, E., Dibben, O., Stacey, A., Fellay, J., Shianna, K.V., *et al.* (2010). Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* *116*, 3839-3852.

Sandler, N., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M., Nixon, D., Pedersen, C., Ruxrungtham, K., Lewin, S., Emery, S., *et al.* (2011). Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *The Journal of Infectious Diseases* *203*, 780-790.

Schmidt, B., Ashlock, B.M., Foster, H., Fujimura, S.H., and Levy, J.A. (2005). HIV-infected cells are major inducers of plasmacytoid dendritic cell interferon production, maturation, and migration. *Virology* *343*, 256-266.

Schuler, G., and Steinman, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *The Journal of experimental medicine* *161*, 526-546.

Sharma, M.D., Hou, D.Y., Liu, Y., Koni, P.A., Metz, R., Chandler, P., Mellor, A.L., He, Y., and Munn, D.H. (2009). Indoleamine 2,3-dioxygenase controls conversion of Foxp3+ Tregs to TH17-like cells in tumor-draining lymph nodes. *Blood* *113*, 6102-6111.

Shortman, K., and Liu, Y.J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* *2*, 151-161.

Shortman, K., and Naik, S.H. (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* *7*, 19-30.

Sinicco, A., Biglino, A., Sciandra, M., Forno, B., Pollono, A.M., Raiteri, R., and Giannini, P. (1993). Cytokine network and acute primary HIV-1 infection. *AIDS* *7*, 1167-1172.

Smed-Sorensen, A., Lore, K., Vasudevan, J., Louder, M.K., Andersson, J., Mascola, J.R., Spetz, A.L., and Koup, R.A. (2005). Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol* *79*, 8861-8869.

Smyth, L.A., Boardman, D.A., Tung, S.L., Lechler, R., and Lombardi, G. (2015). MicroRNAs affect dendritic cell function and phenotype. *Immunology* *144*, 197-205.

Stary, G., Klein, I., Kohlhofer, S., Koszik, F., Scherzer, T., Mullauer, L., Quendler, H., Kohrgruber, N., and Stingl, G. (2009). Plasmacytoid dendritic cells express TRAIL and induce CD4⁺ T-cell apoptosis in HIV-1 viremic patients. *Blood* *114*, 3854-3863.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* *140*, 805-820.

Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Aspod, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., *et al.* (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* *219*, 118-142.

Van, V.Q., Lesage, S., Bouguermouh, S., Gautier, P., Rubio, M., Levesque, M., Nguyen, S., Galibert, L., and Sarfati, M. (2006). Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* *25*, 5560-5568.

Wagner, H. (2004). The immunobiology of the TLR9 subfamily. *Trends Immunol* *25*, 381-386.

Walker, B.D. (2007). Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med* *15*, 134-136.

Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., and Turner, J.R. (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *The American journal of pathology* *166*, 409-419.

Wang, X., Zhang, Z., Zhang, S., Fu, J., Yao, J., Jiao, Y., Wu, H., and Wang, F.-S. (2008). B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *European Journal of Immunology* *38*, 3226-3236.

Wiercinska-Drapalo, A., Flisiak, R., Jaroszewicz, J., and Prokopowicz, D. (2004). Increased plasma transforming growth factor-beta1 is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. *Viral immunology* *17*, 109-113.

Xiong, Y., Qiu, F., Piao, W., Song, C., Wahl, L.M., and Medvedev, A.E. (2011). Endotoxin tolerance impairs IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) 4 and TGF-beta-activated kinase 1 activation, K63-linked polyubiquitination and assembly of IRAK1, TNF receptor-associated factor 6, and I kappa B kinase gamma and increases A20 expression. *The Journal of biological chemistry* *286*, 7905-7916.

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., *et al.* (2004). Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* *16*, 915-928.

Yonezawa, A., Morita, R., Takaori-Kondo, A., Kadowaki, N., Kitawaki, T., Hori, T., and Uchiyama, T. (2003). Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol* *77*, 3777-3784.

Zhou, D., Kang, K.H., and Spector, S.A. (2012). Production of interferon alpha by human immunodeficiency virus type 1 in human plasmacytoid dendritic cells is dependent on induction of autophagy. *J Infect Dis* *205*, 1258-1267.

ANEXOS

FIGURAS SUPLEMENTARIAS

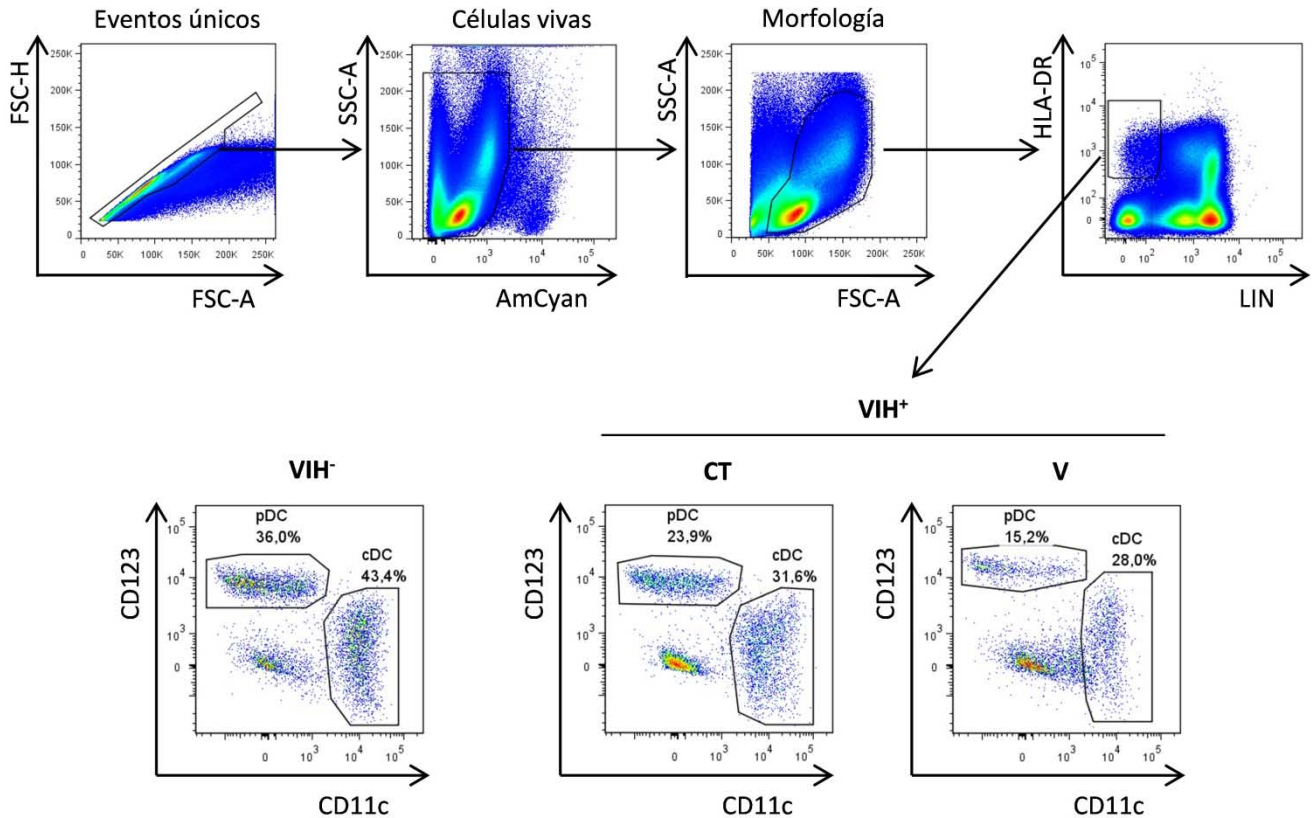


Figura I. Estrategia de análisis para la identificación de los subtipos de DC. Se obtuvieron PBMC por gradiente de densidad de individuos VIH⁻, controladores (CT) y virémicos (V); posteriormente se marcaron con varias combinaciones de anticuerpos monoclonales. Las células se analizaron basándose en eventos únicos, células vivas y con morfología correspondiente a linfocitos y monocitos. Los subtipos de DC se identificaron como células LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻ and CD56⁻) HLA-DR⁺ y que expresarán CD11c⁺ (cDC) o CD123⁺ (pDC). Se muestran graficas de puntos representativas de un individuo por grupo de estudio.

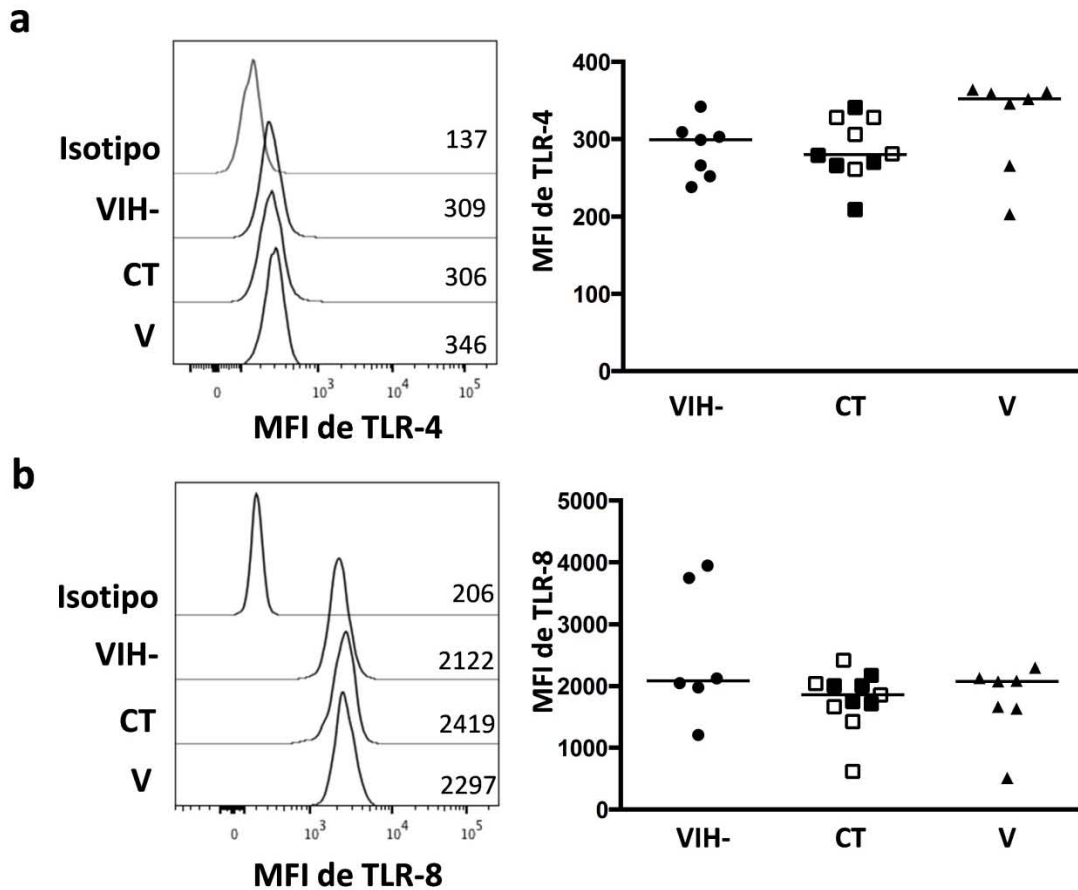


Figura II. Expresión de TLR-4 y TLR-8 en cDC. Se obtuvieron PBMC de individuos VIH⁺, controladores (CT) y virémicos (V); posteriormente se marcaron con varias combinaciones de anticuerpos monoclonales para determinar la expresión de TLR-4 (a) y TLR-8 (b) en las cDC por citometría de flujo. A la izquierda se muestra un histograma representativo de la expresión de TLR en cada grupo, se incluye el valor de MFI. Las gráficas muestran el MFI para cada marcador en la población de cDC. Masculinos (símbolos rellenos) y femeninos (símbolos vacíos). Los datos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney y se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

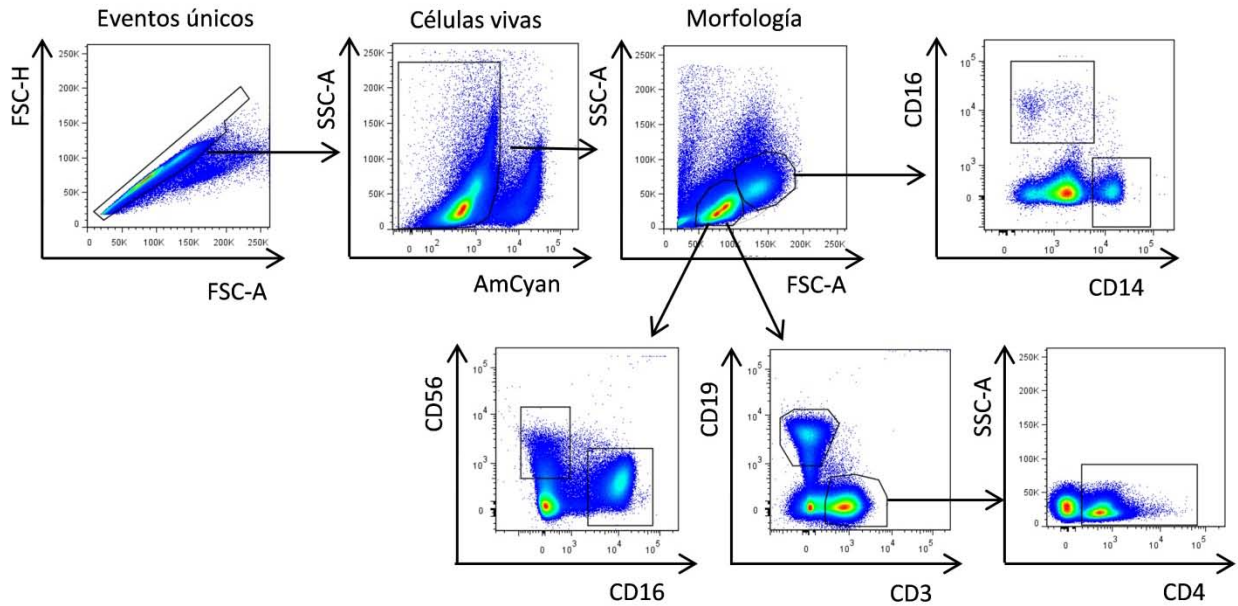


Figura III. **Estrategia de análisis para identificar células B, células NK, células T CD4⁺ y monocitos.** Se obtuvieron PBMC por gradiente de densidad y se trataron o no con ligandos de TLR por 18 horas. Después del cultivo se marcaron con varios anticuerpos monoclonales. Las células se analizaron a partir de eventos únicos, células vivas y morfología correspondiente a linfocitos o monocitos. Se idéntico a las células B (CD19⁺), células NK (CD56⁺), monocitos (CD14⁺) y células T (CD3⁺CD4⁺).

Differential partial activation phenotype and production of tumour necrosis factor- α by conventional dendritic cells in response to lipopolysaccharide in HIV⁺ viraemic subjects and HIV⁺ controllers

R. Camacho-Sandoval,^{*†}

P. M. Del Río Estrada,^{*}

A. Rivero-Arrieta,^{*} G. Reyes-Terán^{*}
and L. C. Bonifaz[†]

^{*}Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 'Ismael Cosío Villegas', [†]Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional 'Siglo XXI', México, DF, México

Accepted for publication 29 July 2014

Correspondences: P. M. Del Río Estrada, Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 'Ismael Cosío Villegas', Calzada de Tlalpan # 4502 Colonia Sección XVI C.P. 14080, Del. Tlalpan, México DF.

E-mail: perla.delrio@cieni.org.mx

L.C. Bonifaz, Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", Av. Cuauhtémoc # 330, Col. Doctores. C.P. 06725. Del. Cuauhtémoc. México D. F., México.
E-mail: labonifaz@yahoo.com

Summary

HIV⁺ subjects are reported to have increased soluble CD14 (sCD14) in plasma, an indicator of microbial translocation. We evaluated if microbial translocation has a differential impact on the activation and function of conventional dendritic cells (cDC) from viraemic HIV⁺ subjects and HIV⁺ controllers (CTs). The HIV⁺ subjects were classified into two groups according to their plasma viral load (pVL): CT and viraemic. Subjects without HIV were included as controls (HIV⁻). The frequencies and phenotypes of cDC from these subjects were evaluated by multi-parameter flow cytometry. In addition, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) or single-stranded RNA40 (ssRNA40), the phenotype of the cDC and the intracellular production of tumour necrosis factor (TNF)- α by the cDC were evaluated by flow cytometry. We observed a partial activation phenotype for the cDC in the viraemic subjects and CTs *ex vivo* and after LPS activation, which showed differences in the expression of CD40 and CD86. Furthermore, in response to LPS the cDC from the viraemic subjects produced more TNF- α compared to the cDC from CTs. Interestingly, the percentage of TNF- α ⁺ cDC was found to be correlated positively with the pVL. The partial activation of cDC and the overproduction of TNF- α in response to LPS in viraemic HIV⁺ subjects might be related to the increased chronic activation observed in these subjects. In contrast, cDC from CTs seem to have a regulated response to LPS, indicating that they respond differently to chronic immune activation. These results may have implications in the development of HIV therapies and vaccines using DC.

Keywords: conventional dendritic cells (cDC), HIV⁺ controllers (CTs), microbial translocation, TNF- α

Introduction

Dendritic cells (DC) play a central role in coupling innate to adaptive immune responses by sensing microbes, secreting cytokines, presenting antigens and activating T or B cells [1]. All these characteristics make them potential candidates for cell-based therapies and vaccines [2,3]. DC can be divided broadly into two groups: conventional dendritic cells (cDC) and plasmacytoid dendritic cells (pDC); these subsets differ from each other in phenotype, Toll-like receptor (TLR) expression and function [4,5]. pDC have been studied extensively in the context of human immunodeficiency virus (HIV) infection due to their association with

the control of HIV replication and chronic immune activation, as these cells produce high levels of interferon (IFN)- α in response to HIV [6–11]. In contrast, cDC have not been studied widely during HIV infection, especially with respect to their role in the natural control of HIV replication in HIV⁺ controllers (CTs) and their association with chronic immune activation.

cDC are recognized by their high antigen-presenting activity as well as their ability to prime naive T and B cells, facilitate T helper type 1 (Th1) polarization and induce CD8⁺ cytotoxic T cell immunity [4,12]. Previous studies of cDC during HIV infection have shown an important reduction in the cDC frequency in the peripheral blood, which

starts at the peak viral load and is maintained through the chronic phase of infection [7,13–18], and is not recovered after anti-retroviral treatment (ART) [15,17]. Importantly, cDC depletion has been correlated with the HIV plasma viral load (pVL) [14,16,19,20]. The cDC of viraemic subjects have been described as partially activated cells, based on their maturation and activation markers. Some studies have shown increased expression of CD40 and low expression of CD86, CD83 and CD80 [21,22], while others have shown increased or unchanged expression of CD86 and CD83 *ex vivo* [14,17]. The cDC of viraemic subjects have also been reported to have low stimulatory properties [7,13,18], a characteristic that is related most probably to their partial activation phenotype.

Impaired cytokine production in response to various stimuli, including TLR-7/-8 agonists, attenuated HIV and other HIV strains, has been shown, although some inconsistencies exist between reports [7,18,23–25]. While the decreased production of interleukin (IL)-12 and tumour necrosis factor (TNF)- α after TLR-7/-8 stimulation during the primary phase of HIV infection has been reported [7], others have shown that DC are hyperresponsive to stimulation with different TLRs (TLR-4, -7, -8 and -9), with increased production of proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6 [18,26], a situation that has been confirmed in a non-human primate model of simian immunodeficiency virus (SIV) [27]. A higher percentage of IL-12⁺ cDC is also observed after TLR-7/-8 stimulation [23]. This hyperresponse to TLR stimulation suggests a close relationship between cDC and proinflammatory cytokine production. All this evidence supports that cDC are dysfunctional in viraemic HIV⁺ subjects. However, there are only few data on the phenotypical and functional features of cDC in HIV⁺ controllers [28,29].

cDC dysfunction cannot be attributed directly to HIV alone; other factors, including cytokines and other soluble plasma components, such as apoptotic microparticles and lipopolysaccharide (LPS), might also contribute to cDC dysfunction [30]. Some of these soluble factors, especially LPS, are associated with the chronic immune activation observed during HIV infection.

Chronic immune activation is a hallmark of progression in HIV infection. Activation markers in T cells [CD38 and human leucocyte antigen D-related (HLA-DR)] correlate with disease progression, and this correlation is independent of other factors, such as the pVL [31–33]. One of the major contributors to chronic immune activation is damage to mucosal barriers, which results in increased microbial translocation and can be determined by either the levels of LPS or bacterial DNA in the plasma [34,35]. LPS is associated not only with the activation of T cell activation but also of monocytes which, in response, secrete soluble CD14 (sCD14), rendering sCD14 a reliable biomarker of chronic immune activation and mortality in HIV [34,36].

Thus, the continuous stimulation of DC by microbial translocation products may play an important role in their altered cytokine production. To further characterize the role of cDC in HIV immunopathogenesis, specifically their role in chronic immune activation, and to determine if microbial products have an impact on DC activation, we performed a phenotypical and functional characterization of cDC in viraemic subjects and CTs. CTs are a group of HIV⁺ individuals who are able to maintain a low pVL (<2000 RNA copies/ml of plasma) in the absence of ART and have lower levels of chronic immune activation markers than viraemic subjects [37,38], factors that might modulate cDC function and compromise the HIV response. Here, we report that despite a clear reduction in the cDC frequency in both the viraemic subjects and CTs, the cDC from these two groups showed a differential partially activated phenotype. In addition, the cDC from the viraemic subjects overexpressed TNF- α in response to LPS, which might be related to the increased chronic immune activation observed in these subjects. In contrast, the cDC from the CTs seemed to efficiently regulate their production of TNF- α , suggesting that these cells may respond differently to chronic activation.

Materials and methods

Blood samples and study population

This study was conducted at the Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) 'Ismael Cosío Villegas' (Mexico City, Mexico) and was approved by the ethics committee of the INER (B33-10) according to the Declaration of Helsinki.

After written consent was obtained from the study participants, their peripheral blood was collected in acid citrate dextrose (ACD) tubes. The individuals with chronic HIV⁺ infections were divided into two groups according to their pVL: controllers (CTs), untreated HIV⁺ individuals maintaining a pVL of <2000 RNA copies/ml for at least 1 year ($n = 18$), and viraemic subjects, HIV⁺ individuals without anti-retroviral treatment and a pVL of >10 000 RNA copies/ml ($n = 30$). Subjects without HIV (HIV⁻) were included as a control group ($n = 45$). The CD4⁺ T cell counts were significantly lower in the viraemic HIV⁺ subjects than in the CTs ($P = 0.0002$). Individuals with known hepatitis C or B virus co-infection were excluded from the study.

Plasma HIV viral load and CD4 T cell counts

Routine HIV viral load and CD4⁺ T cell count assays were performed for the HIV⁺ subjects. The plasma viral load was quantified by automated real-time polymerase chain reaction (PCR) using a m2000 system (Abbott Laboratories,

Abbot Park, IL, USA). The range of detection for the pVL was 40–10 000 000 copies/ml. The CD4⁺ T cell count was determined using a TruCount kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and a fluorescence-activated cell sorter (FACS)Canto II cytometer (BD Biosciences).

Determination of cDC frequency and number

Freshly isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by density gradient centrifugation (Lymphoprep; Axis-Shield, Oslo, Norway) and stained with a combination of monoclonal antibodies: anti-CD3 fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone UCHT1; eBioscience, San Diego, CA, USA), anti-CD14 FITC (clone 61D3; eBioscience), anti-CD19 FITC (clone HIB19; eBioscience), anti-CD56 FITC (clone B159; BD Biosciences), anti-HLA-DR APC-Cy7 (clone L243; BD Biosciences), anti-CD11c phycoerythrin-cyanin 5 (PE-Cy5) (clone B-ly6; BD Biosciences) and anti-CD123 peridinin chlorophyll (PerCP)-Cy5.5 (clone 7G3; BD Biosciences). Live/Dead Aqua dye (Invitrogen–Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) was used to exclude dead cells. The cDC subset was identified as cells being CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻ and CD56⁻ (LIN⁻), HLA-DR⁺ and CD11c⁺ cells.

In brief, the PBMCs ($2\text{--}3 \times 10^6$ cells) were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 20 min at 4°C with Live/Dead Aqua dye. Next, the cells were centrifuged (491 g for 10 min) and labelled for 30 min at 4°C with antibodies diluted in cell staining buffer (BioLegend, San Jose, CA, USA). The cells were then centrifuged (491 g for 10 min), fixed with 1% formalin, and analysed using a FACSAria II flow cytometer (BD Biosciences). A minimum of 2000 events of LIN⁻HLA-DR⁺ cells was acquired. All analyses were performed with FlowJo software version 7.6.2 (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

The number of cDC per microlitre of blood was calculated by multiplying the cDC frequency (% of live PBMCs) to the CD45⁺ cell count, which was determined using a TruCount kit (performed independently on whole blood samples using a FACSCanto II flow cytometer; BD Biosciences).

Determination of soluble CD14

Soluble CD14 (sCD14) was evaluated as an indicator of microbial translocation. For this experiment, we used plasma samples from HIV⁻ subjects, CTs and viraemic subjects that were collected and frozen immediately (-80°C) on the same day that the phenotypical or functional assays were performed. For the determination of the sCD14 level, a Quantikine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used following the manufacturer's instructions. The sCD14 meas-

urements were performed in an ELx808 absorbance microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA).

PBMC stimulation with TLR-4 and -8 ligands

Freshly isolated PBMCs from HIV⁻ subjects, CTs or viraemic subjects were suspended in R10 media (RPMI-1640; Lonza, Walkersville, MD, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin at a density of 2×10^6 cells/well. The cells were cultured in the presence or absence of 2 µg/ml LPS (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) or 5 µg/ml single-stranded RNA40 (ssRNA40) (InvivoGen, San Diego, CA, USA) for 18 h at 37°C with 5% CO₂. The cells or their supernatants were used for the determination of phenotype or cytokine production, as described in the following methods.

Determination of activation markers and TLRs by flow cytometry

Stimulated or *ex-vivo* PBMCs were stained with various monoclonal antibodies to identify the cDC subset (LIN⁻HLA-DR⁺CD11c⁺ cells) and to analyse the expression of two activation markers (CD86 and CD40) and CD47, a molecule that is expressed in response to IFN, by flow cytometry. The expression of TLR-4 and TLR-8 was also determined. The monoclonal antibodies used in this experiment were: anti-CD3 FITC or biotin (clone UCHT1; eBioscience), anti-CD14 FITC or biotin (clone 61D3; eBioscience), anti-CD19 FITC or biotin (clone HIB19; eBioscience), anti-CD56 FITC or biotin (clone B159; BD Biosciences), streptavidin Alexa Fluor V450 (eBioscience) or streptavidin PE Texas red (BD Biosciences), anti-HLA-DR allophycocyanin (APC)-Cy7 (clone L243; BD Biosciences), anti-CD11c PE-Cy5 (clone B-ly6; BD Biosciences) or Alexa 700 (clone 3.9; eBioscience), anti-CD123 PerCP-Cy5.5 (clone 7G3; BD Biosciences), anti-CD40 PE (clone 5C3; eBioscience), anti-CD86 PE (clone 2331-FUN-1; BD Biosciences) or PE-Cy5 (clone IT2.2; eBioscience), anti-CD47 FITC (clone B6H12; BD Biosciences), anti-TLR-4 Alexa 488 (clone HTA125, eBioscience) and anti-TLR-8 PE (clone 44C143; Imgenex, San Diego, CA, USA). The PBMCs were stained and analysed as described in previous section. TLR-8 expression was determined intracellularly using the BD Biosciences permeabilization kit (BD Biosciences). Fluorescence minus one controls were used to determine the negative/positive gates.

Determination of intracellular cytokines by flow cytometry

For the detection of intracellular cytokines, Golgi Plug (brefeldin A; BD Biosciences) was added to PBMCs after 4 h of stimulation with TLR ligands or to untreated cells. The

Table 1. Demographic details of HIV-1 cohort.

Characteristic (<i>n</i>)	HIV ⁻ (45)	Controller (18)	Viraemic (30)
HIV plasma viral load; median (range) (RNA copies/ml)	n.a.	57 (<40–668)	23 106 (8373–447 952)*
CD4 ⁺ T cell count; median (range) (cells/μl)	964 (249–1493)	781 (417–1394)	529 (16–1149)***
Gender, male/female	31/14	9/9	30/0
Age; median (range) (years)	30 (23–52)	36 (25–66)	30 (22–58)
Frequency of cDC within PBMCs; median (range)	0.408 (0.122–0.763)	0.276 (0.167–0.551)**	0.280 (0.032–0.549)**
Absolute numbers of cDC; median (range) (cells/μl)	12.7 (8–18)	7.6 (3–14)**	5.0 (1–18)**

P* < 0.05 compared to controllers; *P* < 0.05 compared to HIV⁻ subjects. cDC = conventional dendritic cells; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; n.a. = not applicable.

production of TNF- α , IL-12 and IL-1 β was then analysed by flow cytometry. To perform this, the cells were stained with monoclonal antibodies to identify the cDC (LIN⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺), natural killer (NK) cells (CD56⁺), B cells (CD19⁺), T cells (CD3⁺CD4⁺) and monocytes (CD14⁺). The following monoclonal antibodies were used: anti-CD3 biotin (clone UCHT1; eBioscience), anti-CD14 biotin (clone 61D3; eBioscience), anti-CD19 biotin (clone HIB19; eBioscience), anti-CD56 biotin (clone B159; BD Biosciences), streptavidin PE Texas red (BD Biosciences), anti-HLA-DR APC-Cy7 (clone L243; BD Biosciences), anti-CD11c Alexa 700 (clone 3.9; BD Biosciences), anti-CD123 PerCP-Cy5.5 (clone 7G3; BD Biosciences), anti-CD56 PE-CF594 (clone B159; BD Biosciences), anti-CD3 Alexa 700 (clone UCHT1; BD Biosciences), anti-CD16 PerCp Cy 5.5 (clone 3G8; BD Biosciences), anti-CD14 V450 (clone M ϕ P9; BD Biosciences), anti-CD19 APC (clone HIB19; BD Biosciences), anti-CD4 APC-Cy7 (clone RPA-T4; BD Biosciences), anti-TNF α FITC (clone MAb11; BD Biosciences), anti-IL-12 p40/p70 PE (clone C11.5; BD Biosciences) and anti-IL-1 β FITC (clone H1b-98; Biolegend). After surface staining, the cells were fixed and permeabilized with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 30 min at room temperature. They were then washed twice with Perm/Wash solution (BD Biosciences) with centrifugation at 706 *g* for 10 min and incubated with anti-TNF- α and anti-IL-12, or with anti-IL-1 β monoclonal antibodies for 60 min at room temperature. The cells were then washed and centrifuged (706 *g* for 10 min), fixed with 1% formalin and analysed using a FACSaria II flow cytometer (BD Biosciences).

Quantification of cytokines in culture supernatants

PBMCs were either untreated or stimulated in the absence of GolgiPlug, and their supernatants were collected after 18 h of stimulation with TLR ligands and frozen at -80°C. The supernatants were thawed and used to quantify TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-12 with a multiplex bead assay (Invitrogen–Life Technologies), following the manufacturer's instructions. The samples were analysed using a Luminex 200 xMAP system (Luminex, Austin, TX, USA) with Luminex xPONENT version 3.1 software (Luminex).

Statistical analysis

The data were analysed using the Mann–Whitney *U*-test for comparisons between groups, and correlations were evaluated with the Spearman test. Additional analysis was performed considering only males among groups; however, the gender was not determinant in the main findings. Differences were considered as statistically significant when *P* < 0.05. Non-parametric tests were performed using GraphPad Prism 5 software version 5.01 (La Jolla, CA, USA).

Results

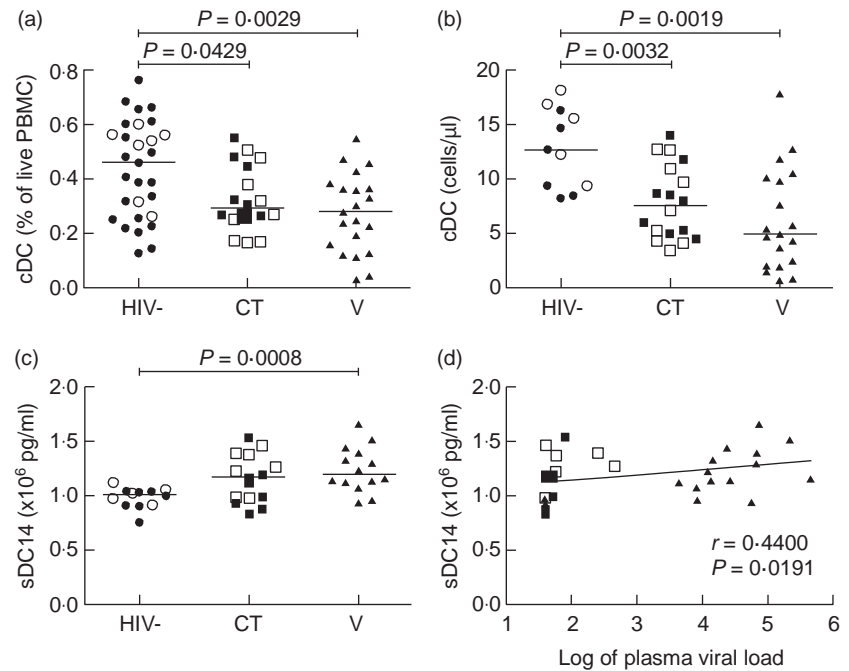
Characteristics of the study participants

The demographic details of the subjects included in this study are shown in Table 1. This study included 30 viraemic subjects, 18 CTs and 45 HIV⁻ subjects. The median age was 36 years for the CTs and 30 years for the viraemic and HIV⁻ subjects. The group of HIV⁻ subjects was composed of 31 males and 14 females, the CT group comprised nine males and nine females and the viraemic group contained only males. The median pVLs were 23 106 and 57 RNA copies/ml for the viraemic and CT groups, respectively. The median CD4⁺ T cell count was 529 cells/μl for the viraemic subjects, 781 cells/μl for the CTs and 964 cells/μl for the HIV⁻ subjects.

The cDC number is reduced in HIV⁺ subjects and plasma level of soluble CD14 correlates with the viral load

It has been reported consistently that the DC frequency is reduced in peripheral blood (PB) of HIV⁺ subjects [7,13–18]. To determine if there is a difference between the number of cDC in CTs and viraemic subjects, we initially analysed the frequency of cDC in the PB of the CTs and viraemic subjects and compared them with the HIV⁻ subjects. The gating strategies used for the DC analysis as well as representative plots are shown in the Supporting information, Fig. S1. As shown in Table 1 and Fig. 1a, there is a significant decrease in the percentage of cDC in the PBMC

Fig. 1. Reduced frequency of conventional dendritic cells (cDC) in HIV⁺ subjects and correlation of sCD14 with plasma viral load (pVL). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from HIV⁻ subjects ($n = 29$), controllers (CT, $n = 18$) and viraemic subjects (V, $n = 21$) and were stained *ex vivo* to determine the frequency (a) and number (b) of cDC. (c) The level of soluble CD14 (sCD14) was determined in plasma from HIV⁻ subjects ($n = 12$), CTs ($n = 14$) and V subjects ($n = 14$). (d) The correlation between the pVL and the plasma sCD14 concentration in CTs (squares) and V subjects (triangles) is shown. Males (closed symbols), females (open symbols). The data were analysed with the Mann–Whitney U-test and Spearman test, respectively, and were considered significantly different when $P < 0.05$.



populations of the CTs ($P = 0.0429$) and viraemic subjects ($P = 0.0029$) when compared with that in the HIV⁻ subjects. These differences were confirmed by evaluating the cDC numbers. A significant reduction was observed for the cDC of the CTs ($P = 0.0032$) and viraemic subjects ($P = 0.0019$) compared with the HIV⁻ subjects (Fig. 1b). Notably, no difference was found between the percentage or number of cDC between the CTs and viraemic subjects. To confirm that viraemic subjects have more microbial translocation than CTs, as reported by others [37,38], we evaluated the plasma levels of soluble CD14 (sCD14), a marker of microbial translocation [34], in our study groups. Figure 1c shows an increase in the level of sCD14 in the plasma of the viraemic subjects compared with the HIV⁻ subjects ($P = 0.0008$); this increase was not observed in the plasma of the CTs. In addition, an association between the pVL and the level of sCD14 was observed ($r = 0.4400$; $P = 0.0191$) (Fig. 1d). Overall, these results indicate that although both CTs and viraemic subjects have an important reduction in the number of cDC in their PB compared with HIV⁻ subjects, the difference in the level of sCD14, which correlates with the pVL, suggests a different level of microbial translocation between viraemic subjects and CTs that could impact cDC activation.

Differential expression of activation markers on cDC from viraemic subjects and controllers

Considering that we observed a positive correlation between the level of sCD14 in the plasma and the pVL, we next evaluated if the phenotype of the remaining cDC differs between viraemic individuals and CTs. Figure 2a shows a representative histogram in which a slight increase

in the CD40 expression was observed for the cDC of a viraemic subject compared with those for the cDC of a CT and an HIV⁻ subject. When evaluating the median fluorescence intensity (MFI) for CD40 expression, we observed no differences among the three study groups (Fig. 2a). However, a significant increase in the percentage of CD40⁺ cDC was observed in the viraemic subjects when compared to the CTs ($P = 0.0478$; $P = 0.0766$ when only males were compared between these groups) (Fig. 2a). CD86 analysis showed that while all the cDC expressed CD86 (Fig. 2b), an increase in the MFI for CD86 was observed in the cDC of the CTs compared with that of the HIV⁻ subjects ($P = 0.0011$; Fig. 2b). In addition, we observed an increase in the MFI for CD47, a protein that is expressed in response to IFN [39], in the CTs compared with the viraemic ($P = 0.0218$) and HIV⁻ subjects ($P = 0.0013$; Fig. 2c). Interestingly, we found a positive correlation between the expression of CD86 and CD47 ($r = 0.5644$; $P = 0.0005$), suggesting a relationship between the expression of these two markers on cDC (Supporting information, Fig. S2). Overall, these results strongly suggest a partially activated phenotype for cDC from both CTs and viraemic subjects, with a differential expression of surface markers, showing that cDC from viraemic subjects predominantly express CD40 and that cDC from CTs express CD86 and CD47.

Differential expression of surface markers on cDC in response to LPS between viraemic subjects and controllers

To evaluate if the differential expression of surface markers on cDC observed in the CTs and viraemic subjects is a consequence of their different responses to TLR stimulation, we

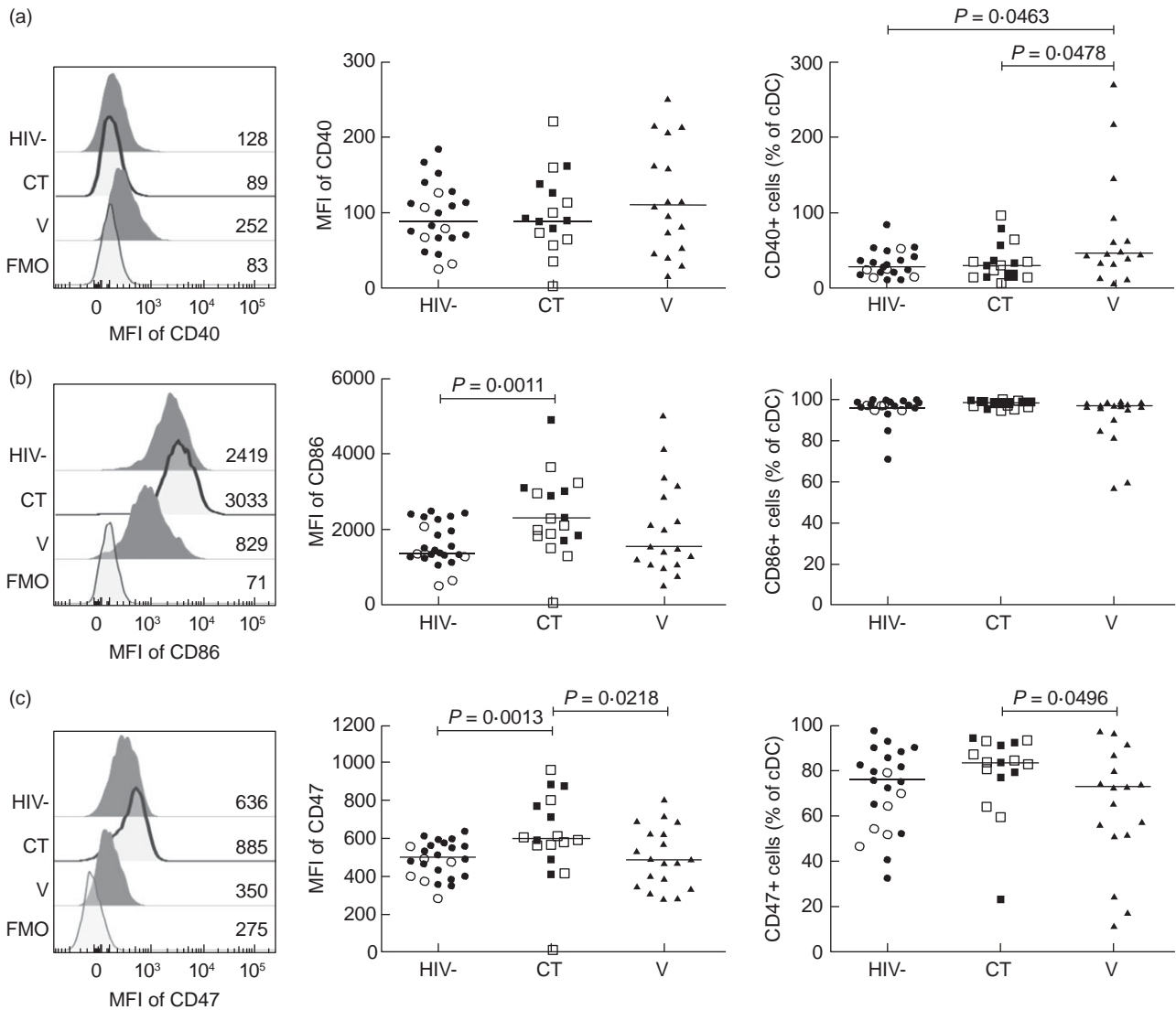


Fig. 2. Differential expression of activation markers on conventional dendritic cells (cDC) from viraemic subjects and controllers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from HIV⁻ individuals ($n = 22$), controllers (CT, $n = 16$) and viraemic subjects (V, $n = 18$) and were stained *ex vivo* to determine the expression of CD40 (a), CD86 (b) and CD47 (c) on the cDC in the samples by flow cytometry. A representative histogram from one individual in each group is shown on the left. The values of the median fluorescence intensity (MFI) are included. The graphs show the MFI and the percentage of positive cells within the cDC population for each marker. Males (closed symbols), females (open symbols). The data were analysed with the Mann–Whitney *U*-test. FMO = fluorescence minus one. The data were considered significantly different when $P < 0.05$.

next analysed surface marker expression after the stimulation of PBMCs from these individuals with LPS or ssRNA40 as ligands of TLR-4 and TLR-8, respectively. Fig. 3a shows an increase in CD40 expression on the cDC from a viraemic subject and a HIV⁻ subject after LPS activation. In contrast, a lesser increase in CD40 expression was observed for the cDC from a CT. When evaluating the fold increase in CD40 expression in the different study groups, we observed that the cDC from the CTs showed a slight increase in the expression of CD40 after LPS activation (Fig. 3b). In addition, we observed a significant difference in the fold increase of CD40 expression between the viraemic subjects and CTs ($P = 0.0400$; $P = 0.3037$ when only males were compared

between these groups), between the CTs and HIV⁻ subjects ($P = 0.0005$) and between viraemic and HIV⁻ subjects ($P = 0.0451$; Fig. 3b). Similar results were observed after stimulation with ssRNA40, although no significant differences were observed between the CTs and viraemic subjects (Fig. 3c). Furthermore, similar to our *ex-vivo* observations, the cDC of CTs showed high expression of CD86 even without stimulation, but only a slight increase was observed after LPS activation. In contrast, the cDC of viraemic subjects and of HIV⁻ subjects showed a lower expression of CD86 without stimulation, which clearly increased after LPS activation in the HIV⁻ subject but only slightly increased in the viraemic subject (Fig. 3d). When examin-

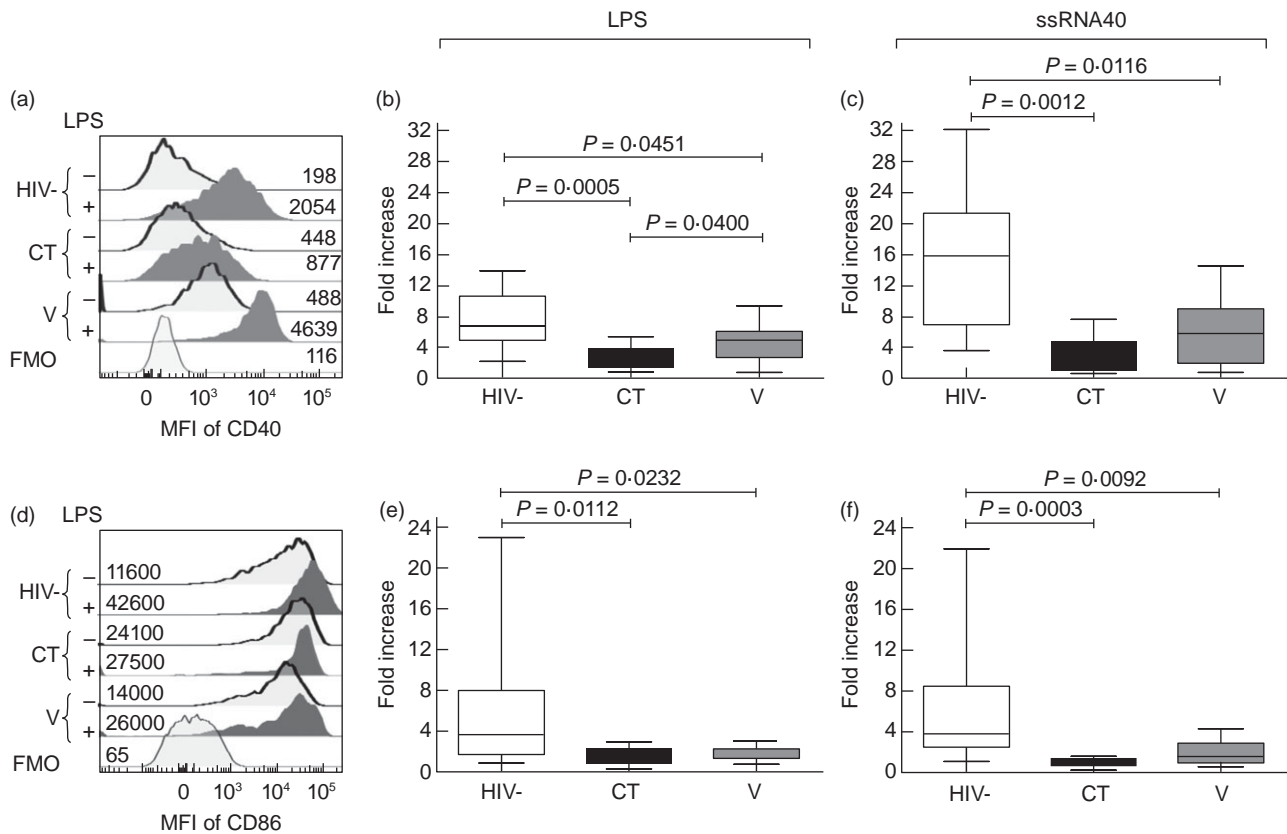


Fig. 3. Differential expression of surface markers on conventional dendritic cells (cDC) after lipopolysaccharide (LPS) or single-stranded RNA40 (ssRNA40) stimulation in viraemic subjects and controllers. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from HIV⁻ individuals, controllers (CT) and viraemic subjects (V), either left untreated or stimulated with LPS or ssRNA40 for 18 h and then stained to determine the expression of CD40 (a) and CD86 (d) on the cDC in the samples by flow cytometry. Representative histograms from each LPS-stimulated group are shown on the left. The values of MFI are included. The fold increase in CD40 (b,c) and CD86 (e,f) expression on cDC from HIV⁻ individuals, CTs and V subjects after 18 h of LPS (b,e) or ssRNA40 (c,f) stimulation was determined. Fold increase was defined as the median fluorescence intensity (MFI) of the stimulated cDC divided by the MFI of the unstimulated cDC. $n = 13$ for HIV⁻, $n = 9$ for CT and V. Data are shown as box and whiskers: min to max. The data were analysed with the Mann–Whitney U -test. FMO = fluorescence minus one. The data were considered significantly different when $P < 0.05$.

ing the fold increase in CD86 expression in the different subjects, we found that the fold increase in the expression of CD86 after LPS stimulation in the viraemic subjects was significantly lower than the fold increase observed in the HIV⁻ subjects ($P = 0.0232$; Fig. 3e) and a significant difference between the CTs compared with the HIV⁻ subjects ($P = 0.0112$); similar results were observed after ssRNA40 activation (Fig. 3f). These results suggest that cDC from viraemic subjects and CTs have a differential expression of surface markers in response to TLR-4/-8 stimulation. The response of cDC from CTs seems to be regulated, as they showed a lower increase in the expression levels of CD40 and CD86 than the viraemic group. In contrast, the response of cDC from viraemic subjects, compared to CTs, is characterized by an increase in the expression of CD40 but not CD86, suggesting that the *ex-vivo* phenotype observed for the cDC of the viraemic subjects could be related to their chronic immune activation, which is mediated partially by microbial translocation.

TNF- α production by cDC in response to LPS differs between viraemic subjects and controllers and correlates with the viral load

To examine if the differential expression of surface markers in CTs and viraemic subjects both *ex vivo* and after *in-vitro* activation is related to functional differences, we next evaluated the intracellular expression of TNF- α by cDC after PBMCs activation with LPS or ssRNA40. Figure 4a shows representative dot-plots of the TNF- α ⁺ cDC after LPS activation, with a similar percentage of TNF- α ⁺ cDC between the CT and HIV⁻ subject and a higher percentage of TNF- α ⁺ cDC in the viraemic subject. When evaluating the different study groups, we observed that the percentage of TNF- α ⁺ cDC in the CTs is similar to the percentage of TNF- α ⁺ cDC in the HIV⁻ subjects after LPS activation, although the basal percentage of TNF- α ⁺ cDC was significantly higher in the CTs compared with the HIV⁻ subjects ($P = 0.0113$). Notably, we found a significant increase in the

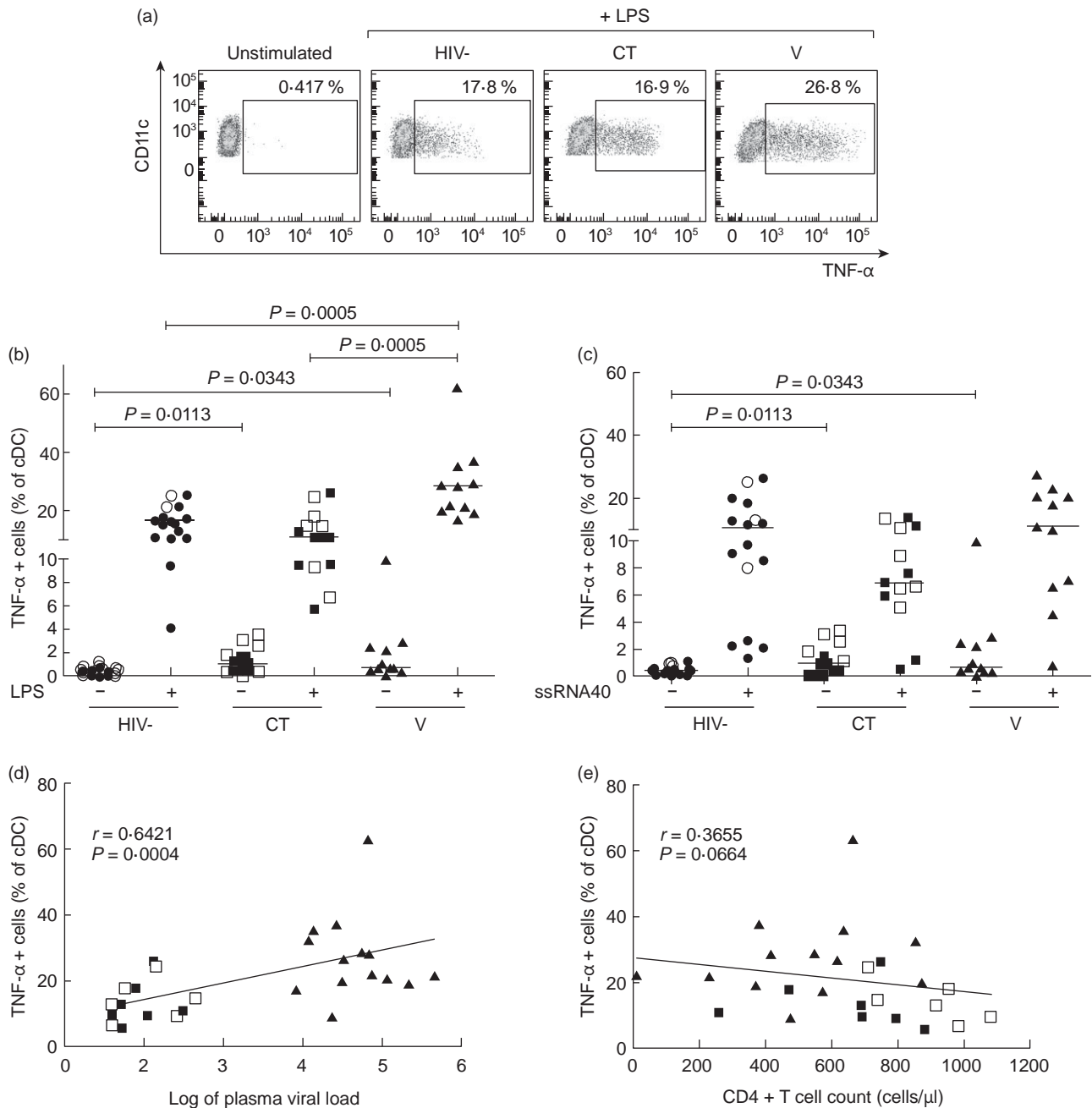


Fig. 4. Differential tumour necrosis factor (TNF)- α production by conventional dendritic cells (cDC) in response to lipopolysaccharide (LPS) stimulation between viraemic subjects and controllers and correlation of the plasma viral load (pVL). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from HIV⁻ individuals, controllers (CT) and viraemic subjects (V) were stimulated with LPS or single-stranded RNA40 (ssRNA40) for 18 h. Intracellular cytokine production was then analysed in the cDC population. (a) Representative dot-plots of intracellular TNF- α positive cDC after LPS stimulation. The graphs show the percentage of TNF- α cDC in the samples from the HIV⁻ individuals ($n = 16$), CTs ($n = 13$) and V subjects ($n = 11$) after LPS (b) or ssRNA40 (c) stimulation. Correlation of the TNF- α cDC frequency in response to LPS with the pVL (d) and CD4⁺ T cell count (e); CTs (squares) and V subjects (triangles) are shown. Males (closed symbols), females (open symbols). The data were analysed with the Mann-Whitney *U*-test for comparisons between groups and with the Spearman test for correlations. The data were considered significantly different when $P < 0.05$.

percentage of TNF- α cDC in the viraemic subjects after LPS activation when compared to that in the CTs ($P = 0.0005$) and HIV⁻ subjects ($P = 0.0005$; Fig. 4b). After activation with ssRNA40, we found that the percentage of

TNF- α cDC was similar among the different groups (Fig. 4c). To determine if these findings are associated with the clinical parameters of the HIV⁺ subjects, we evaluated the relationship between the percentage of TNF- α cDC

with the HIV pVL and CD4⁺ T cell count. Interestingly, a positive correlation was found between the percentage of TNF- α ⁺ cDC and the plasma pVL ($r = 0.6421$; $P = 0.0004$; Fig. 4d), whereas no correlation was found between the percentage of TNF- α ⁺ cDC and the CD4⁺ T cell count ($r = -0.3655$; $P = 0.0664$; Fig. 4e). We did not find any difference in the expression of IL-12 after activation with LPS; however, after ssRNA40 stimulation we found a lower frequency of IL-12⁺ cDC from CTs when compared to HIV⁻ subjects ($P = 0.0483$; Supporting information, Fig. S3). The strong response to LPS observed in viraemic subjects was not due to a higher expression of TLR-4 on cDC of this group, compared with CTs and HIV⁻ (Supporting information, Fig. S4). These results indicate that TNF- α expression by cDC in response to LPS differs between viraemic subjects and CTs, suggesting that the cDC from viraemic subjects, but not CTs, are hyperresponsive to LPS. In addition, these results show that the expression of TNF- α by cDC is associated with the pVL.

cDC comprise the main cell population that over-expresses TNF- α in response to LPS in viraemic subjects

Next, we determined the level of TNF- α and other proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6 and IL-12, in the supernatants of PBMCs stimulated with LPS or ssRNA40. As shown in Fig. 5a, there is a higher level of TNF- α in the supernatants of the PBMCs from viraemic subjects after LPS activation in comparison with those in the supernatants of the PBMCs from CTs ($P = 0.0004$) and HIV⁻ subjects ($P = 0.0006$; Fig. 5a). In addition, we found lower TNF- α in the supernatants of CTs compared with HIV⁻ subjects after ssRNA40 activation ($P = 0.0374$; Fig. 5b). An increase in the production of IL-1 β was also observed in supernatants of the viraemic samples in response to LPS when compared with the CT samples ($P = 0.0043$; Supporting information, Fig. S5). We did not find differences in the levels of IL-6 among studied groups. Similar to our observations of the intracellular staining for IL-12, we did not observe differences in the secretion of IL-12 from the PBMCs after LPS stimulation (Supporting information, Fig. S5a). Although a significant increase in the production of the different proinflammatory cytokines was observed in all groups after ssRNA40 stimulation compared with unstimulated cells, no significant differences were observed between the different groups (Supporting information, Fig. S5b).

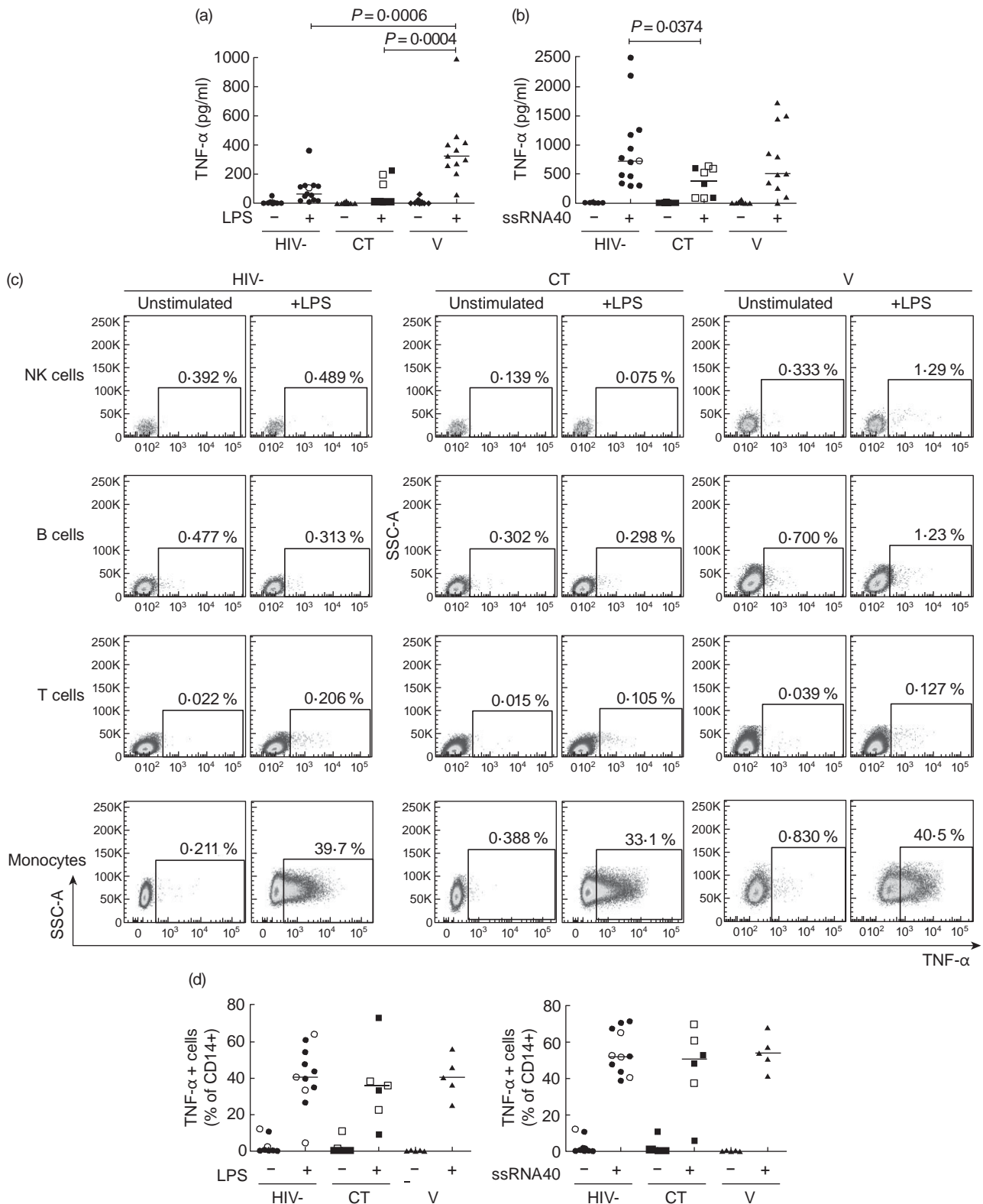
To evaluate the contribution of the different cell populations to the expression of TNF- α and IL-1 β , we performed intracellular staining for TNF- α and IL-1 β in CD56⁺ (NK cells), CD19⁺ (B cells), CD4⁺ (T cells) and CD14⁺ (monocytes) cells. The gating strategies and representative plots for the IL-1 β production are shown in Supporting information, Figs S6 and S7. As shown in Fig. 5c and NK, B

and T cells were not an important source of TNF- α after LPS stimulation. In contrast, we found a high percentage of TNF- α ⁺ and IL-1 β ⁺ monocytes (CD14⁺) after LPS and ssRNA40 stimulation (Fig. 5c,d and Supporting information, Fig. S7). However, in contrast to our results for the cDC (Fig. 4a,b), there was no significant difference between the percentage of TNF- α ⁺ monocytes among the studied groups (Fig. 5d). In addition, we found that cDC from viraemic subjects are also high producers of IL-1 β , compared with CT and HIV⁻ subjects (Supporting information, Fig. S7). These results indicate that cDC comprise the primary cell population with a differential expression of TNF- α and probably of IL-1 β between viraemic subjects and CTs after TLR-4 stimulation. Together, these results indicate an increase in the production of TNF- α and IL-1 β in viraemic subjects compared with CTs after TLR-4 stimulation and that cDC compose the main cell population that over-expresses TNF- α in viraemic subjects.

Discussion

Chronic activation of the immune system has been reported to play a pivotal role in the pathogenesis of HIV infection [31,33,36,37,40,41]. In addition, it is known that innate immune cells can also be activated by TLRs, with the consequent over-production of proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α [26,29,42]. However, it is still uncertain if cDC also participate in the chronic immune activation observed in HIV⁺ individuals as well as in the pathogenesis of this disease. In this report, we show a differential phenotype and expression of TNF- α by cDC in response to LPS between viraemic HIV⁺ subjects and HIV⁺ CTs, which may have implications in the pathogenesis of HIV infection. Our results suggest that cDC from viraemic subjects become hyperresponsive to TLR-4 activation, while cDC from HIV⁺ CTs have a more controlled response to TLR-4 stimulation, which might be related to their reduced chronic immune activation.

Initially, the cDC frequencies in the PB samples from our study group of HIV-infected subjects were evaluated and found to be similar to those in other reports [15,17,18,20]. Notably, we did not find any differences in this parameter between the viraemic subjects and CTs, indicating that the reduction in cDC that has been reported to occur during the early stages of HIV infection [7,18] is maintained during chronic infection independently of the pVL. In addition, we found an increase in the levels of sCD14 in the plasma of the viraemic HIV⁺ subjects, as reported by others [36,43]. This finding led us to suggest that the presence of LPS, as a result of microbial translocation [34], might have an impact on the activation of the remaining cDC. As reported previously, [17,21,22,28,44], we found that the cDC of the viraemic HIV⁺ subjects showed a partially activated phenotype compared to the cDC of the HIV⁻ individuals and HIV⁺ CTs. Notably, a different partially



activated phenotype was observed in the cDC from the CTs, which showed increased expression of CD86 and CD47 but not CD40. The phenotypical *ex-vivo* staining of the cDC also indicated that the differential expression of surface markers between the CTs and viraemic subjects could be the

consequence of different activation pathways. The *ex-vivo* phenotype observed for the cDC of the CTs suggests that cDC activation in CTs might result from a regulated activity of type I IFN, as it has been reported that IFN plays an important role in HIV pathogenesis during the early phase

of HIV/SIV infection [45–49]. Signatures of IFN activity, such as IFN-inducible proteins and genes, have been reported as markers of HIV infection [48,50,51]. Accordingly, we found an increase in the expression of CD47, a protein that is expressed in response to IFN [39] in the cDC of the CTs. Furthermore, a positive correlation was observed between the expression of CD86 and CD47. It has been demonstrated in mice that CD47 expression in cDC is essential for their migration to LNs and to sites where T cell priming occurs [52] and that its expression in DC limit proinflammatory cytokine production [53]. The consequences of the differential partially activated phenotype observed here between cDC from viraemic subjects and CTs on the activation of T cells required further detailed investigation, as it is known that T cells from HIV CTs have polyfunctional and strong responses against HIV [54–57].

In this study, we approached this question by evaluating the differences in the phenotype and cytokine production of cDC of HIV⁺ viraemic subjects and CTs in response to TLR stimulation with LPS or ssRNA40. Importantly, it has been suggested that phenotypical maturation involving the up-regulation of co-stimulatory molecules, rather than the production of cytokines, plays a major role in the activation of memory T cells [42]. After *in-vitro* TLR-4 or TLR-8 stimulation, we showed different patterns of phenotypical maturation markers in the cDC. We observed that the cDC from the viraemic subjects had increased expression of CD40 but not of CD86. In contrast, the cDC from the CTs showed only a slight increase in both CD40 and CD86 expression. It is known that the expression of CD40, CD86 and CD80 is needed for the expansion of antigen-specific T cells, CD40 expression in DC is required for CD40L ligation and maturation of T cells, while CD86 and CD80 expression is required for CD4⁺ T cell proliferation upon antigen stimulation [21]. However, the relevance of expressing one molecule *versus* another in a DC and its interaction with or activation of a T cell is still not known. Furthermore, our results suggest that the expression of surface markers after activation might be related to gender, as some significant differences were lost when only males were compared among groups; therefore, further studies are necessary to address these points.

Interestingly, our results also showed that the partially activated phenotypes observed in the HIV⁺ CTs and

viraemic HIV⁺ subjects had functional differences, mainly in response to LPS. The cDC from the viraemic HIV⁺ subjects showed an increased production of TNF- α compared with those from the CTs and HIV⁻ individuals, indicating a hyperresponse to LPS. Although the CT and viraemic cDC showed a high basal expression of TNF- α compared with the HIV⁻ subjects, the expression of TNF- α after LPS stimulation was similar between the CTs and HIV⁻ subjects, which was lower compared to the viraemic subjects, suggesting that CTs employ a regulatory mechanism that avoids the increased production of TNF- α . Interestingly, a positive correlation was found between the percentage of TNF- α ⁺ cDC in response to LPS and the pVL and no correlation was found between this percentage and the CD4⁺ T cell count, indicating that the high frequency of TNF- α ⁺ cells could be explained in part by the pVL and thus by the consequent TLR activation pathways. Consistent with this finding, it has been reported that high levels of TNF- α could have a deleterious impact on the number of CD4⁺ T cells [58–61] and that TNF- α induces viral replication in the CD4⁺ T cell lymphocytes of HIV-infected subjects by activating the nuclear factor (NF)- κ B pathway [62,63], favouring the high pVL observed in viraemic individuals. We could not find any differences in the production of IL-12 when the cDC of the viraemic subjects and CTs were stimulated with either LPS or ssRNA40. IL-12p70 has been demonstrated to be optimally expressed only after simultaneous stimulation with IL-1 β , TNF- α and IFN- γ [25], suggesting that IL-12 production is a consequence of the prolonged stimulation of multiple proinflammatory cytokines, a condition that was not tested in this study. The fact that the levels of IL-12 were not increased in the cDC from the viraemic HIV⁺ subjects after TLR-4 stimulation suggests that the hyperresponse to LPS is caused mainly by the over-production of TNF- α and possibly of IL-1 β , as we also observed an increase of this cytokine in cDC from viraemic subjects.

In this study, we found that the culture supernatants of LPS-treated PBMCs showed a significant increase in TNF- α , but only for the samples from the viraemic subjects. It has been reported that large amounts of TNF- α participate in the destruction of intestinal epithelial cells [64,65], leading to the increase in microbial translocation observed in HIV⁺ viraemic individuals. Our results showed that monocytes (CD14⁺ cells) also produced high amounts of

Fig. 5. Conventional dendritic cells (cDC) compose the cell population that differentially produces tumour necrosis factor (TNF)- α after lipopolysaccharide (LPS) stimulation in viraemic subjects. TNF- α concentration in the culture supernatants of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) that were either left untreated or stimulated with LPS or single-stranded RNA40 (ssRNA40). The production of TNF- α in the HIV⁻ ($n = 13$), controllers (CT, $n = 10$) and viraemic (V, $n = 11$) samples after 18 h of stimulation with LPS (a) or ssRNA40 (b) was determined by LUMINEX assay. (c) Representative dot-plot of TNF- α ⁺ natural killer (NK) cells (CD56⁺), B cells (CD19⁺), T cells (CD3⁺CD4⁺) or monocytes (CD14⁺) after 18 h of treatment with or without LPS. (d) Percentage of TNF- α ⁺ CD14⁺ cells after LPS or ssRNA40 stimulation ($n = 11$ for HIV⁻ subjects, $n = 6$ for CTs and $n = 5$ for V subjects). Males (closed symbols), females (open symbols). The data were analysed with the Mann–Whitney *U*-test and were considered significantly different when $P < 0.05$.

TNF- α and IL-1 β in response to LPS; however, we did not find any differences in the production of these cytokines by the monocytes from the viraemic, CT and HIV⁻ subjects. It was reported previously that MDC-8⁺ monocytes are increased in viraemic HIV⁺ subjects and that this population is responsible for the increased production of TNF- α after LPS activation [66]. However, we did not evaluate the production of TNF- α by MDC-8⁺ cells in particular. Therefore, it is possible that in addition to cDC, this population of monocytes or monocyte-derived inflammatory DC also contributes to the over-production of TNF- α in viraemic HIV⁺ subjects.

Our results suggest that despite the fact that we did not find any significant difference in the levels of sCD14 in CTs *versus* viraemic HIV⁺ subjects, it is possible that even in the presence of LPS, cDC from HIV⁺ CT subjects may have a regulated response that avoids their exacerbated activation. The combination of more than one factor that favours chronic immune activation, such as the high pVL and high microbial translocation of viraemic individuals, might be responsible for the hyperresponse of cDC to LPS that is found only in viraemic subjects and not in CTs. A previous study showed that if PBMCs from viraemic subjects were incubated with ssRNA40 and LPS, TNF- α production was higher than if the cells were incubated with LPS or ssRNA separately [67]. It has been shown that TLR-4 expression is correlated positively with the pVL but not with LPS in plasma [26,67]. Thus, as CTs have a low pVL, they are expected to have a lower expression level of TLR-4 compared to viraemic subjects; however, we did not find differences in TLR-4 expression on cDC between CTs and viraemic HIV subjects. Therefore, the controlled response of cDC from CTs might be related to the TLR signalling pathway.

Overall, our results suggest that the partial activation of cDC and the over-production of TNF- α in response to LPS in viraemic HIV⁺ subjects might be related to the increased chronic immune activation observed in these subjects. In contrast, cDC from HIV⁺ CTs seem to have a regulated response to LPS. It is well known that TLR activation induces a proinflammatory response against microbes, and after elimination the system must return to a homeostatic state [68]. Proper control and inhibition of the TLR signal is important for limiting excessive inflammation during immune responses against microorganisms [69,70]. The results shown here suggest that cDC from CTs are TLR-responsive, i.e. they are able to control the production of inflammatory mediators, avoiding damage to the immunological system. The homeostatic control of TLR signalling involves regulation of TLR trafficking within the cell, degradation of TLR molecules and sequestration of adapter proteins, among others [61,70]. Further experiments are required to describe the exact mechanism by which TLR-4 signalling is controlled. Thus, considering the use of cDC in alternative therapies or vaccines for controlling HIV repli-

cation, it would be ideal to find a controlled response to TLR stimulation that is similar to that observed in the cDC of HIV⁺ CTs.

Acknowledgements

Authors thank all patients of the Mexican cohort for their participation in this study. This work was funded by the Mexican Government (Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados), Fundación México Vivo, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, Project no. 134511). R. C. had a scholarship provided by CONACyT (Scholarship no. 232303). This paper constitutes a partial fulfillment in the Graduate Program in Biomedical Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México. We would like to thank physicians Akio Murakami, María Gomez-Palacio of the Department of Infectious Diseases of the National Institute of Respiratory Diseases in Mexico City for their help in recruiting patients; Dr Jaime Andrade and Dr Lucero González; Dr Gabriela Velasquez, Dr Rodolfo Ochoa for providing blood samples of individuals from the states of Jalisco, Oaxaca and Colima; Carolina Demeneghi, Israel Molina, Raymundo González and Silvia del Arenal for collection of blood samples; Ramón Hernández, for viral load, and Edna Rodríguez and Mario Preciado, for CD4⁺ T cell count assays; Zeidy Arenas, Sandra Zamora, Eduardo López, Berenice Cancino and Jannete Balladares for their administrative support and Luz Ma. Mora, for her help in data analysis.

Disclosure

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contributions

P. M. D. R. E., G. R. T. and L. B. conceived and directed the project. L. B., R. C. and P. M. D. R. E. designed the experiments. R. C. and A. R. A. performed the experiments. R. C. analysed the data. G. R. T., P. M. D. R. E. and L. B. A. contributed reagents/materials/analysis tools. P. M. D. R. E., R. C. and L. B. A. wrote the paper.

References

- 1 Ueno H, Klechevsky E, Morita R *et al.* Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007; **219**:118–42.
- 2 Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* 2010; **33**:464–78.
- 3 Van Gulck E, Cools N, Atkinson D *et al.* Interleukin-12p70 expression by dendritic cells of HIV-1-infected patients fails to stimulate gag-specific immune responses. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**:184979.

- 4 Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; **392**:245–52.
- 5 Kadowaki N, Ho S, Antonenko S *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; **194**:863–9.
- 6 Diop O, Ploquin M, Mortara L *et al.* Plasmacytoid dendritic cell dynamics and alpha interferon production during Simian immunodeficiency virus infection with a nonpathogenic outcome. *J Virol* 2008; **82**:5145–52.
- 7 Huang J, Yang Y, Al-Mozaini M *et al.* Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* 2011; **204**:1557–62.
- 8 Sivaraman V, Zhang L, Su L. Type I interferon contributes to CD4+ T cell depletion induced by infection with HIV-1 in the human thymus. *J Virol* 2011; **85**:9243–6.
- 9 Machmach K, Leal M, Gras C *et al.* Plasmacytoid dendritic cells reduce HIV production in elite controllers. *J Virol* 2012; **86**:4245–52.
- 10 Herbeuval J-P, Smith N, Thèze J. Characteristics of plasmacytoid dendritic cell and CD4+ T cell in HIV elite controllers. *Clin Dev Immunol* 2012; **2012**:869505.
- 11 O'Brien M, Manches O, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol* 2013; **762**:71–107.
- 12 Banchereau J, Briere F, Caux C *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**:767–811.
- 13 Macatonia S, Lau R, Patterson S, Pinching A, Knight S. Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals. *Immunology* 1990; **71**:38–45.
- 14 Grassi F, Hosmalin A, McIlroy D, Calvez V, Debré P, Autran B. Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS* 1999; **13**:759–66.
- 15 Pacanowski J, Kahi S, Baillet M *et al.* Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001; **98**:3016–21.
- 16 Donaghy H, Pozniak A, Gazzard B *et al.* Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* 2001; **98**:2574–6.
- 17 Fontaine J, Coutlée F, Tremblay C *et al.* HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis* 2009; **199**:1007–18.
- 18 Sabado R, O'Brien M, Subedi A *et al.* Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood* 2010; **116**:3839–52.
- 19 Barron M, Blyveis N, Palmer B, MaWhinney S, Wilson C. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003; **187**:26–37.
- 20 Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS* 2005; **19**:261–71.
- 21 Loré K, Sönnnerborg A, Broström C, Goh L, Perrin L. Accumulation of DC-SIGN+ CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* 2002; **16**:683–92.
- 22 McIlroy D, Autran B, Clauvel J, Oksenhendler E, Debré P, Hosmalin A. Low CD83, but normal MHC class II and costimulatory molecule expression, on spleen dendritic cells from HIV+ patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; **14**:505–13.
- 23 Martinson J, Roman-Gonzalez A, Tenorio A *et al.* Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cell Immunol* 2007; **250**:75–84.
- 24 Sandrine B, Adel B, Brian G, Frances G, Peter K, Steven P. Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10. *J Infect Dis* 2009; **199**:1862–71.
- 25 Fan Z, Huang X-L, Kalinski P, Young S, Rinaldo C. Dendritic cell function during chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol* 2007; **14**:1127–37.
- 26 Lester R, Yao X-D, Ball T *et al.* Toll-like receptor expression and responsiveness are increased in viraemic HIV-1 infection. *AIDS* 2008; **22**:685–94.
- 27 Wijewardana V, Kristoff J, Xu C *et al.* Kinetics of myeloid dendritic cell trafficking and activation: impact on progressive, nonprogressive and controlled SIV infections. *PLOS Pathog* 2013; **9**:e1003600.
- 28 Huang J, Burke P, Cung T *et al.* Leukocyte immunoglobulin-like receptors maintain unique antigen-presenting properties of circulating myeloid dendritic cells in HIV-1-infected elite controllers. *J Virol* 2010; **84**:9463–71.
- 29 Chang J, Lacas A, Lindsay R *et al.* Differential regulation of toll-like receptor pathways in acute and chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2012; **26**:533–41.
- 30 Miller E, Spadaccia M, O'Brien M *et al.* Plasma factors during chronic HIV-1 infection impair IL-12 secretion by myeloid dendritic cells via a virus-independent pathway. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; **61**:535–44.
- 31 Liu Z, Cumberland W, Hultin L, Kaplan A, Detels R, Giorgi J. CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; **18**:332–40.
- 32 Hazenberg M, Otto S, van Benthem B *et al.* Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS* 2003; **17**:1881–8.
- 33 Deeks S, Kitchen C, Liu L *et al.* Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load. *Blood* 2004; **104**:942–7.
- 34 Brenchley J, Price D, Schacker T *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 2006; **12**:1365–71.
- 35 Estes JD, Harris LD, Klatt NR *et al.* Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLOS Pathog* 2010; **6**:e1001052.
- 36 Sandler N, Wand H, Roque A *et al.* Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis* 2011; **203**:780–90.
- 37 Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E *et al.* 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. *J Infect Dis* 2008; **197**:126–33.
- 38 Kanya P, Tsoukas CM, Boulet S *et al.* T cell activation does not drive CD4 decline in longitudinally followed HIV-infected elite controllers. *AIDS Res Ther* 2011; **8**:20.
- 39 de Veer MJ, Holko M, Frevel M *et al.* Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 2001; **69**:912–20.

- 40 Giorgi J, Hultin L, McKeating J *et al.* 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. *J Infect Dis* 1999; **179**:859–70.
- 41 Klatt N, Chomont N, Douek D, Deeks S. Immune activation and HIV persistence: implications for curative approaches to HIV infection. *Immunol Rev* 2013; **254**:326–42.
- 42 Loré K, Betts M, Brenchley J *et al.* Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol* 2003; **171**:4320–8.
- 43 Lien E, Aukrust P, Sundan A, Müller F, Frøland S, Espevik T. Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: correlation to disease progression and clinical events. *Blood* 1998; **92**:2084–92.
- 44 Benlahrech A, Yasmin A, Westrop S *et al.* Dysregulated immunophenotypic attributes of plasmacytoid but not myeloid dendritic cells in HIV-1 infected individuals in the absence of highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2012; **170**:212–21.
- 45 Hycza M, Kovacs C, Loutfy M *et al.* Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4+ and CD8+ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as extensive transcriptional changes in CD8+ T cells. *J Virol* 2007; **81**:3477–86.
- 46 Herbeuval J-P, Shearer G. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol* 2007; **123**:121–8.
- 47 Mandl JN, Barry AP, Vanderford TH *et al.* Divergent TLR7 and TLR9 signaling and type I interferon production distinguish pathogenic and nonpathogenic AIDS virus infections. *Nat Med* 2008; **14**:1077–87.
- 48 Rotger M, Dalmau J, Rauch A *et al.* Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque. *J Clin Invest* 2011; **121**:2391–400.
- 49 Hardy G, Sieg S, Rodriguez B *et al.* Interferon- α is the primary plasma type-I IFN in HIV-1 infection and correlates with immune activation and disease markers. *PLOS ONE* 2013; **8**:e56527.
- 50 Bosinger S, Hosiawa K, Cameron M *et al.* Gene expression profiling of host response in models of acute HIV infection. *J Immunol* 2004; **173**:6858–63.
- 51 Sedaghat A, German J, Teslovich T *et al.* Chronic CD4+ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. *J Virol* 2008; **82**:1870–83.
- 52 Van VQ, Lesage S, Bouguermouh S *et al.* Expression of the self-marker CD47 on dendritic cells governs their trafficking to secondary lymphoid organs. *EMBO J* 2006; **25**:5560–8.
- 53 Demeure CE, Tanaka H, Mateo V, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. CD47 engagement inhibits cytokine production and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 2000; **164**:2193–9.
- 54 Betts MR, Nason MC, West SM *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* 2006; **107**:4781–9.
- 55 Ferre A, Hunt P, Critchfield J *et al.* Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood* 2009; **113**:3978–89.
- 56 Owen RE, Heitman JW, Hirschhorn DF *et al.* HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *AIDS* 2010; **24**:1095–105.
- 57 Hersperger AR, Martin JN, Shin LY *et al.* Increased HIV-specific CD8+ T-cell cytotoxic potential in HIV elite controllers is associated with T-bet expression. *Blood* 2011; **117**:3799–808.
- 58 Salazar-Gonzalez J, Martinez-Maza O, Aziz N *et al.* Relationship of plasma HIV-RNA levels and levels of TNF-alpha and immune activation products in HIV infection. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; **84**:36–45.
- 59 Rizzardi GP, Barcellini W, Tambussi G *et al.* Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-1 infection: correlation with HIV-1 RNA and the clinical outcome. *AIDS* 1996; **10**:F45–50.
- 60 Aukrust P, Liabakk N, Müller F, Lien E, Espevik T, Frøland S. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection – correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J Infect Dis* 1994; **169**:420–4.
- 61 Kumar A, Abbas W, Herbein G. TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy? *Mediators Inflamm* 2013; **2013**:484378.
- 62 Duh E, Maury W, Folks T, Fauci A, Rabson A. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**:5974–8.
- 63 Lacoste J, D'Addario M, Roulston A, Wainberg M, Hiscott J. Cell-specific differences in activation of NF-kappa B regulatory elements of human immunodeficiency virus and beta interferon promoters by tumor necrosis factor. *J Virol* 1990; **64**:4726–34.
- 64 Wang F, Graham W, Wang Y, Witkowski E, Schwarz B, Turner J. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *Am J Pathol* 2005; **166**:409–19.
- 65 Ye D, Ma I, Ma T. Molecular mechanism of tumor necrosis factor-alpha modulation of intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**:504.
- 66 Dutertre C-A, Amraoui S, DeRosa A *et al.* Pivotal role of M-DC8+ monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF α overproduction in response to microbial products. *Blood* 2012; **120**:2259–68.
- 67 Lester R, Yao X-D, Ball T *et al.* HIV-1 RNA dysregulates the natural TLR response to subclinical endotoxemia in Kenyan female sex-workers. *PLOS ONE* 2009; **4**:e5644.
- 68 Sabroe I, Parker L, Dower S, Whyte M. The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol* 2008; **214**:126–35.
- 69 Garlanda C, Di Liberto D, Vecchi A *et al.* Damping excessive inflammation and tissue damage in *Mycobacterium tuberculosis* infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling. *J Immunol* 2007; **179**:3119–25.
- 70 Piccinini A, Midwood K. DAMPenning inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators Inflamm* 2010; **2010**: Article ID 672395.

Supporting information

Additional Supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. Gating strategy to identify dendritic cell (DC) subsets.

Fig. S2. CD86 and CD47 expression are correlated positively.

Fig. S3. Frequency of IL-12 + conventional dendritic cells (cDC) in lipopolysaccharide (LPS)-treated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) is similar between viraemic subjects and controls.

Fig. S4. Toll-like receptor (TLR)-4 and TLR-8 expression in conventional dendritic cells (cDC).

Fig. S5. Interleukin (IL)-1 β cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after lipopolysaccharide (LPS) stimulation differs between controls and viraemic subjects.

Fig. S6. Gating strategy to identify B cells, natural killer (NK) cells, CD4⁺ T cells and monocytes.

Fig. S7. Differential frequency of interleukin (IL)-1 β in conventional dendritic cells (cDC) after lipopolysaccharide (LPS)-treated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) between viraemic subjects and controllers

