



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Asociación entre la frecuencia de neutrófilos alveolares
con los marcadores de inflamación CD14s y CD163s, en
muestras de lavado bronco-alveolar (BAL) de personas
con VIH+ y neumonía por *Pneumocystis***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

SAMUEL MAXIMILIANO GARCÍA AGUIRRE



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. PERLA MARIANA DEL RÍO ESTRADA**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno
García
Aguirre
Samuel Maximiliano
55 3903 4999
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
313219816
2. Datos del tutor
Dra.
Perla Mariana
Del Río
Estrada
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Mayra Dinorah
Álvarez
Santos
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Heriberto
Prado
García
5. Datos del sinodal 3
Dr.
Ricardo
Lascurain
Ledesma
6. Datos del sinodal 4
M. en C.
Elvira
Piten
Isidro
7. Datos del trabajo escrito
Asociación entre la frecuencia de neutrófilos alveolares con los marcadores de inflamación CD14s y CD163s, en muestras de lavado bronco-alveolar (BAL) de personas con VIH+ y neumonía por *Pneumocystis*
97p
2022

*A Itzel, Edgar y Juan,
en quienes pensé para no dejar de escribir este trabajo*

*Veo la sombra en la sustancia roja del
crepúsculo.*

*Cierro los ojos y
arden los límites.*

ANTONIO GAMONEDA

Resumen

Los reportes del análisis de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s, y el reclutamiento de neutrófilos a la zona alveolar durante una coinfección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y el hongo oportunista *Pneumocystis jirovecii* (causante de la neumonía por *Pneumocystis*, PCP) en lavado bronco-alveolar (LBA) humano, son escasos y controversiales.

En este estudio se quiso conocer si existe relación alguna entre las frecuencias de neutrófilos y las cantidades de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en LBA de personas sin VIH (VIH_{neg}), con VIH y PCP (VIH⁺PCP⁺), y con VIH y PCP bajo tratamiento antirretroviral (VIH⁺PCP⁺/TAR). En condiciones normales, los neutrófilos representan aproximadamente el 1% de las células asociadas al perfil inmunológico pulmonar. Sin embargo, bajo condiciones inflamatorias, el reclutamiento de neutrófilos al espacio alveolar es vital para la detección, identificación y destrucción de partículas y microorganismos patogénicos. La dinámica de dicho reclutamiento se encuentra en estrecha relación con la liberación y reconocimiento de diversas citocinas/quimiocinas proinflamatorias. En este estudio no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las frecuencias de neutrófilos en el LBA de los tres grupos de estudio. No obstante, observamos una tendencia del grupo VIH⁺PCP⁺ a presentar una mayor cantidad de estas células respecto a los demás grupos. Dicha información podría sugerir un aumento en el reclutamiento de neutrófilos a la zona alveolar relacionado con la liberación y reconocimiento de componentes inflamatorios. También analizamos la expresión de algunos marcadores superficiales asociados a la activación y a otras características fenotípicas en neutrófilos: activación celular (CD13), degranulación celular (CD66b y CD63), y adhesión celular (CD11b). Para este análisis observamos una mayor expresión de CD13 en el grupo VIH⁺PCP⁺/TAR respecto al grupo VIH⁺PCP⁺, y una tendencia de los marcadores CD66b y CD11b a una mayor expresión en el grupo VIH⁺PCP⁺ respecto a los demás grupos. Con lo anterior hipotetizamos una mayor actividad efectora en la zona alveolar por parte de los neutrófilos en las personas de este grupo, actividad misma que podría resultar perjudicial debido al daño tisular inducido por los mismos neutrófilos al amplificar la respuesta inmunológica inflamatoria y llevar a cabo la liberación directa de componentes efectores tóxicos sobre el tejido pulmonar.

De forma general, en esta investigación no encontramos correlaciones entre las variables de estudio debido a la cantidad de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s encontrados en el LBA. No obstante, concluimos que los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s, analizados en LBA, podrían ser marcadores independientes asociados a la progresión de la enfermedad producida por el VIH y al fenómeno de inflamación crónica que éste produce. Una cohorte de estudio más completa podría ayudar a definir si realmente existe una asociación de dichos marcadores y la dinámica del reclutamiento de neutrófilos a la zona alveolar durante una coinfección VIH⁺PCP⁺.

Índice	6
Introducción	12
1 Sistema respiratorio	12
1.1 Tracto respiratorio superior	13
1.2 Tracto respiratorio inferior	15
2 Anatomía pulmonar	19
3 Inmunidad innata	21
3.1 Inmunología del tracto respiratorio	22
3.1.1 Primeras barreras defensivas del tracto respiratorio	23
3.2 Células de la respuesta inmunológica innata	24
3.2.1 Neutrófilos y su función en la respuesta inmunológica	25
3.2.2 Neutrófilos alveolares: mecanismos inmunológicos ante un microorganismo respiratorio infeccioso	26
4 Epidemiología de la infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	29
5 Inmunopatogénesis de la infección por el VIH (Historia Natural del VIH)	31
5.1.1 Fase aguda	34
5.1.2 Fase crónica	35
5.1.3 Fase de SIDA	36
6 Respuesta inmunológica innata durante una infección por el VIH: función de los neutrófilos circulantes	36
6.1 Inmunopatogénesis de la infección por el VIH en pulmón: función inmunológica de los neutrófilos alveolares	38
7 Activación inmunológica e inflamación crónica durante la infección por el VIH	39
7.1 CD163s y CD14s como marcadores de activación inmunológica e inflamación crónica	41
8 Microorganismos oportunistas en la infección por el VIH: coinfección VIH- <i>Pneumocystis</i>	42
9 Respuesta inmunológica durante una coinfección VIH-PCP: papel de los neutrófilos alveolares y células afines	43
10 Otros marcadores de activación asociados a neutrófilos: CD13, CD66b, CD11b y CD63.....	45

Justificación	47
Hipótesis	47
Objetivos	47
Objetivo general	47
Objetivos particulares	48
Metodología	48
1 Características de la cohorte de estudio	48
2 Obtención y procesamiento de las muestras de sangre periférica para la obtención de plasma sanguíneo y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	49
3 Obtención y procesamiento de las muestras de lavado bronco-alveolar (LBA)	50
4 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): CD163s, CD14s, urea	51
5 Citometría de flujo	53
6 Estrategia de análisis	53
7 Análisis estadísticos	56
Resultados	57
Características de neutrófilos y factores solubles en LBA de personas con neumonía	57
1 Características de los neutrófilos alveolares en los grupos de estudio	57
1.1 Características fenotípicas de los neutrófilos alveolares en los grupos de estudio - MFI	58
2 Marcadores de inflamación CD163 y CD14s en plasma y LBA de personas VIH ⁺ con neumonía por PCP ⁺	60
2.1 Concentraciones de CD163 y CD14s como marcadores de inflamación en LBA	60

Asociaciones de las frecuencias de neutrófilos en LBA con marcadores clínicos y de la progresión de la enfermedad	61
3 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA con el porcentaje de células T CD4 ⁺ en sangre de personas VIH ⁺ con neumonía por PCP ⁺	62
3.1 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA con el porcentaje de células T CD8 ⁺ en sangre de personas VIH ⁺ con neumonía por PCP ⁺	63
3.2 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA con el cociente de células T CD4:CD8 en sangre de personas VIH ⁺ con neumonía por PCP ⁺	64
3.3 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA con el número de copias del VIH (CV) en plasma de personas VIH ⁺ con neumonía por PCP ⁺	65
4 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ con las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en LBA de personas VIH ⁺ con neumonía por PCP ⁺	66
Asociaciones de las características fenotípicas de los neutrófilos de LBA con los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s	67
5 Asociaciones de marcadores de activación y otras características de los neutrófilos de LBA (MFI de CD13, CD66b, CD11b, y CD63) con CD163s y CD14s por grupos	67
Discusión	71
Conclusiones	82
Perspectivas	83
Agradecimientos	83
Referencias	84

Índice de figuras

Figura 1. Esquematación del sistema respiratorio humano de acuerdo su anatomía	13
Figura 2. Esquematación del tracto respiratorio inferior	17
Figura 3. Esquematación del árbol traqueo-bronquial	17
Figura 4. Esquematación detallada de un alveolo respiratorio y de la membrana respiratoria	19
Figura 5. Segmentos broncopulmonares	20
Figura 6. Esquematación del reclutamiento y transmigración de los neutrófilos al espacio alveolar	29
Figura 7 Prevalencia mundial del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en adultos	30
Figura 8. Historia natural de la infección por el VIH	33
Figura 9. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis fenotípico de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en muestras de lavado bronqueo-alveolar perteneciente a una persona VIH ⁺ PCP ⁺	54
Figura 10. Histogramas representativos de la expresión de las proteínas CD13 y CD66b en neutrófilos y en células LIN2 ⁺ CD15 ⁻	55
Figura 11. Gráficas de la expresión de diferentes proteínas en células LIN2 ⁻	56
Figura 12. Frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA por grupo de estudio	57
Figura 13. Expresión de diferentes marcadores de activación en los neutrófilos del LBA por grupo de estudio	59
Figura 14. Comparación de las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163 y CD14s en LBA y plasma de personas VIH ⁺ PCP ⁺ obtenidas por ELISA	60

Figura 15. Concentración de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en LBA por grupo de estudio, obtenida por ELISA	61
Figura 16. Correlación entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA y el porcentaje de células T CD4 ⁺ por µl de sangre en personas VIH ⁺ PCP ⁺	63
Figura 17. Correlación entre le frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA y el porcentaje de células T CD8 ⁺ por µl de sangre en personas VIH ⁺ PCP ⁺	64
Figura 18. Correlación entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA y el cociente de células T CD4:CD8 en sangre de personas VIH ⁺ PCP ⁺	65
Figura 19. Correlación entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ en LBA y el número de copias del VIH (log) por ml de plasma en personas VIH ⁺ PCP ⁺	66
Figura 20. Correlaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15 ⁺ CD16 ⁺ y las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en LBA de personas VIH ⁺ PCP ⁺	67
Figura 21. Correlaciones entre las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s y la expresión de los marcadores asociados a funciones efectoras de los neutrófilos: activación celular (CD13); activación y degranulación celular (CD66b); ahdesión celular (CD11b) y degranulación celular (CD63) en LBA de personas VIH ⁺ PCP ⁺	70
Índice de tablas	
Tabla 1. Características epidemiológicas de los participantes	49

Indice de abreviaturas

CD163s - CD163 soluble

CD14s - CD14 soluble

CV - Carga viral del VIH

LBA - Lavado bronco-alveolar

MFI - Intensidad media de fluorescencia

NETs - Trampas extracelulares de neutrófilos

PCP- Neumonía por *Pneumocystis jirovecci*

ROS - Especies reactivas de oxígeno

SIDA - Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

TAR - Tratamiento antirretroviral

TARc - Tratamiento antirretroviral combinado

VIH - Virus de Inmunodeficiencia Humana

VIH_{neg} - Personas sin infección por VIH

VIH⁺PCP⁺ - Personas con infección por VIH

VIH⁺PCP⁺/TAR - Personas con infección por VIH bajo tratamiento antirretroviral

Introducción

1 Sistema respiratorio

El sistema respiratorio cumple con una de las funciones primordiales para la vida humana: la respiración. Esto debido a que cada una de las células del cuerpo necesita energía para sobrevivir y desempeñar sus funciones metabólicas (Peate, 2018; Waugh y Grant, 2014). La mayor parte de esta energía se deriva a partir de reacciones químicas, las cuales sólo pueden tomar lugar en presencia de oxígeno (O₂) (Waugh y Grant, 2014). El sistema respiratorio provee la ruta mediante la cual el oxígeno del medio externo se transfiere al torrente sanguíneo, mientras que el dióxido de carbono (CO₂) se libera como material de desecho celular (Jiyuan Tu *et al.*, 2013). El proceso antes mencionado ocurre en los pulmones, que son el órgano y sitio anatómico en humanos y mamíferos que cumple con esta labor (Tomashefski y Farver, 2008).

Durante el proceso de respiración, que inicia con una inhalación, el aire recorre la laringe y tráquea hasta bifurcarse en los bronquios. Cada bronquio diverge en dos ramas laterales bronquiales, mismas que derivan en un gran número de ramificaciones dentro de ambos pulmones, y que culminan como una conexión a pequeños sacos o alveolos, sitio en donde el oxígeno atmosférico difunde a través de los capilares pulmonares a cambio de la salida de dióxido de carbono (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; Peate, 2018). Para que se lleve a cabo este proceso exitosamente, es necesaria la acción de movimientos musculares y el cumplimiento de diversas funciones celulares y bioquímicas (Rogers, 2011).

El sistema respiratorio se clasifica, de acuerdo a su anatomía, en dos regiones o compartimentos: el tracto respiratorio superior e inferior (**Fig. 1**) (French, 2009). La transición entre ambas regiones se localiza justo en donde se entrecruzan los sistemas respiratorio y digestivo, justo por encima de la laringe (Rogers, 2011).

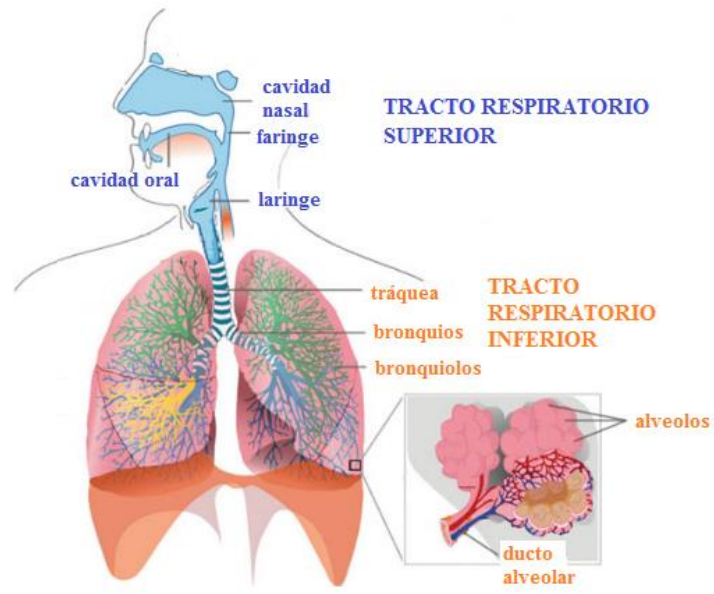


Fig. 1. Esquematación del sistema respiratorio humano de acuerdo su anatomía. Tracto respiratorio superior (azul) e inferior (naranja). Modificado de Jiyuan Tu *et al.*, 2013.

1.1 *Tracto respiratorio superior*

El tracto respiratorio superior se integra por la boca (cavidad oral), nariz (cavidad nasal), faringe y laringe (**Fig. 1**). Posee funciones relevantes tales como el olfato y el habla, así como asegurar que el aire que baja hacia el tracto respiratorio inferior se encuentre cálido, húmedo y limpio (Peate, 2018).

Estructuralmente, la nariz puede ser dividida en una porción externa y en una interna, compuesta por la cavidad nasal (Jiyuan Tu *et al.*, 2013). Durante la inhalación, el aire circula hacia la cavidad nasal a través de las fosas nasales. Las superficies interiores de éstas se hallan recubiertas por un epitelio escamoso estratificado, mismo que se encuentra en la piel externa y que contiene numerosas glándulas sebáceas y gruesas vellosidades (French, 2009; Jiyuan Tu *et al.*, 2013) que impiden la entrada de partículas hacia las vías inferiores del tracto respiratorio (Marieb y Hoehn, 2013).

La superficie de la cavidad nasal está recubierta por una mucosa respiratoria compuesta por un epitelio pseudoestratificado ciliado columnar (Jiyuan Tu *et al.*, 2013) con células caliciformes (células de Globet), mismo que se asienta sobre una lámina propia provista de glándulas mucosas y serosas. Las glándulas mucosas y células caliciformes secretan moco

viscoso, cuya función es la captura y retención de partículas externas como el polvo. Por su parte, las glándulas serosas producen un fluido acuoso que contiene enzimas degradadoras de bacterias, entre ellas la lisozima (French, 2009; Marieb y Hoehn, 2013). Adicionalmente, las células epiteliales de la mucosa respiratoria secretan defensinas, antibióticos naturales que promueven la eliminación de microbios invasivos (Marieb y Hoehn, 2013). Tras capturar partículas y microbios externos, el moco se transporta hacia la garganta por medio de un movimiento rítmico ciliar (acción mucociliar) cuya acción dirige el epitelio de la mucosa respiratoria (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; Marieb y Hoehn, 2013). En la garganta, el moco será eventualmente tragado o expectorado (Peate, 2018).

La faringe, usualmente denominada garganta, es una estructura tubular de aproximadamente 12.5 a 13 cm de largo que conecta las cavidades inferiores nasal y oral con la laringe y el esófago (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; Peate, 2018). Se extiende desde la base del cráneo hasta el nivel de la sexta vértebra cervical, donde se convierte en el esófago (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; Waugh y Grant, 2014). La pared muscular de la faringe se constituye de músculo esquelético, aunque la composición celular de su mucosa varía de una región faríngea a otra (Marieb y Hoehn, 2013). La faringe forma parte de los sistemas respiratorio y digestivo: el aire recorre las cavidades oral y nasal, mientras que la comida atraviesa las secciones oral y laríngea (Waugh y Grant, 2014).

La laringe o caja vocal alberga las cuerdas vocales responsables de la producción del sonido (fonación) (Jiyuan Tu *et al.*, 2013). Se extiende, por cerca de 5 cm, desde el nivel de la tercera hasta la sexta vértebra cervical, inferiormente forma un continuo con la tráquea. Sobre el ápice de la laringe se posiciona la epiglotis, un cartílago fibro-elástico que cierra la tráquea durante la deglución a modo de solapa, cuya función es dirigir el bolo alimenticio al esófago y no hacia las vías del tracto respiratorio inferior (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; Peate, 2018). La superficie interna de la parte superior laríngea se constituye por un epitelio escamoso estratificado, mientras que el epitelio que se encuentra debajo de las cuerdas vocales es pseudoestratificado ciliado columnar. En esta región, la mucosa recolectada en vías inferiores, como la tráquea, se transporta hacia la faringe, alejándose continuamente de la zona pulmonar (Jiyuan Tu *et al.*, 2013).

1.2 Tracto respiratorio inferior

El tracto respiratorio inferior se extiende desde la tráquea hasta los pulmones, conformando así el árbol traqueo-bronquial, mismo que se divide y extiende progresivamente en unidades cada vez más pequeñas: bronquios, bronquiolos y acinos respiratorios (**Fig. 1**) (French, 2009). El árbol cuenta con un patrón de ramificación asimétrico-dicotómico con bronquios que derivan de uno anterior, y cuyo diámetro, longitud y número de divisiones son variables a las ramificaciones anteriores. El tracto respiratorio inferior es el foco principal del diagnóstico citopatológico respiratorio (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; French, 2009).

La tráquea es una cavidad de aproximadamente 10 a 12 cm de longitud por 2 cm de ancho. Es la continuación laríngea que se extiende hasta alcanzar el nivel de la quinta vértebra torácica, donde, en la región de la carina, se bifurca para dar lugar a los bronquios primarios izquierdo y derecho. El tubo traqueal se sostiene por alrededor de 16 a 20 cartílagos hialinos incompletos en forma de “C” que se posicionan uno sobre el otro (**Fig. 2**). Al formar un continuo con las vías superiores respiratorias, la mucosa traqueal se compone de un epitelio pseudoestratificado columnar ciliar con células caliciformes acompañantes, mismo que descansa sobre una lámina propia de tejido conectivo provista de fibras elásticas. Por debajo de la mucosa traqueal, una capa de tejido conectivo denominada submucosa contiene glándulas seromucosas productoras de moco. Continuamente, la acción mucociliar del epitelio traqueal impulsa hacia la faringe mucosidad cargada de partículas externas (Marieb y Hoehn, 2013; Waugh y Grant, 2014).

La tráquea se divide en dos bronquios principales (bronquios primarios) que derivan hacia los pulmones izquierdo y derecho. El bronquio derecho primario se subdivide en tres bronquios lobares (secundarios): bronquio del lóbulo superior derecho, bronquio del lóbulo medio derecho y bronquio del lóbulo inferior derecho (Jiyuan Tu *et al.*, 2013). El bronquio izquierdo primario se subdivide en dos bronquios lobares: bronquio del lóbulo superior izquierdo y el bronquio inferior del lóbulo izquierdo. Cada bronquio lobar es una conexión específica con un determinado lóbulo pulmonar (**Fig. 3**). Dentro de cada lóbulo pulmonar el tejido se divide asimismo por finos septos de tejido conectivo fibro-elástico en lobulillos. Cada lobulillo tiene un tamaño aproximado de 1 a 2.5 cm y contiene alrededor de 3 a 5 acinos respiratorios (Aung *et al.*, 2019).

Un acino abarca todas las estructuras respiratorias distales a un solo bronquiolo terminal, y se define como la unidad anatómica básica del tejido o parénquima pulmonar. En adultos, se estima que un acino cuenta con 1500 a 4000 alveolos. (Aung *et al.*, 2019; Burnard, 2008). A medida que se ramifican, los bronquios lobares se subdividen en bronquiolos segmentales (bronquios terciarios), bronquiolos, bronquiolos terminales, bronquiolos respiratorios y finalmente en conductos alveolares recubiertos por un gran número de sacos alveolares, en donde la unidad funcional es el alveolo (**Fig. 2**) (Jiyuan Tu *et al.*, 2013). Todos los pasajes y conductos respiratorios distales a los bronquios primarios se hallan dentro de los pulmones (Waugh y Grant, 2014).

Cada una de las divisiones bronquiales se denomina generación. La zona que abarca desde las vías traqueales (generación 0) hasta los bronquiolos terminales (generación 16) es designada vía aérea conductiva o espacio muerto, debido a que carece de alveolos y no ocurre intercambio gaseoso (Burnard, 2008; Sly y Collins, 2008). La zona que abarca desde los bronquiolos terminales hasta los bronquiolos respiratorios es la zona transicional, debido a que usualmente brotan algunos alveolos de sus paredes bronquiales. Finalmente, la zona que abarca desde los bronquiolos terminales (generaciones 17 a 19) hasta los conductos alveolares (generaciones 20 a 22) es la zona respiratoria (**Fig. 2**). Un acino respiratorio se compone por todas las estructuras respiratorias superiores a la generación 16 (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; Sly y Collins, 2008).

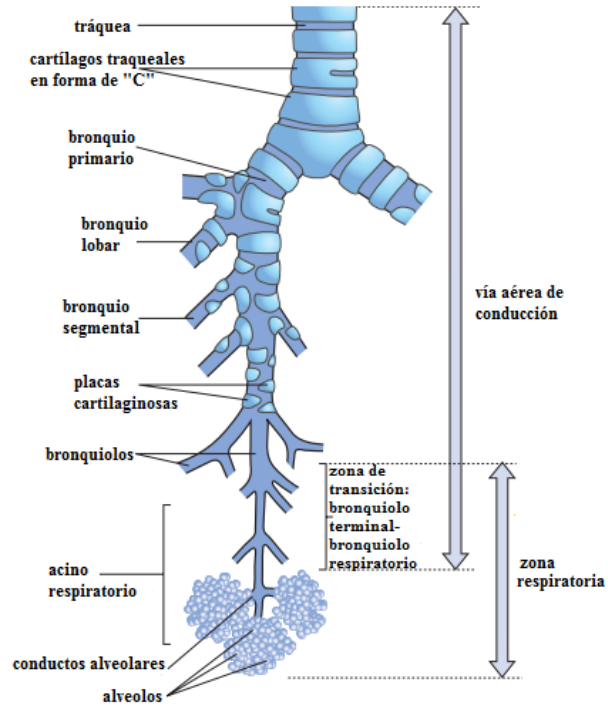


Fig. 2. Esquematación del tracto respiratorio inferior. La vía aérea de conducción comprende los pasajes respiratorios desde la tráquea hasta los bronquiolos respiratorios. La vía de transición abarca los bronquiolos terminales hasta los bronquiolos respiratorios. La zona respiratoria se sitúa desde los bronquiolos terminales hasta los alveolos, sitio para el intercambio gaseoso. Modificado de Waugh y Grant, 2014.

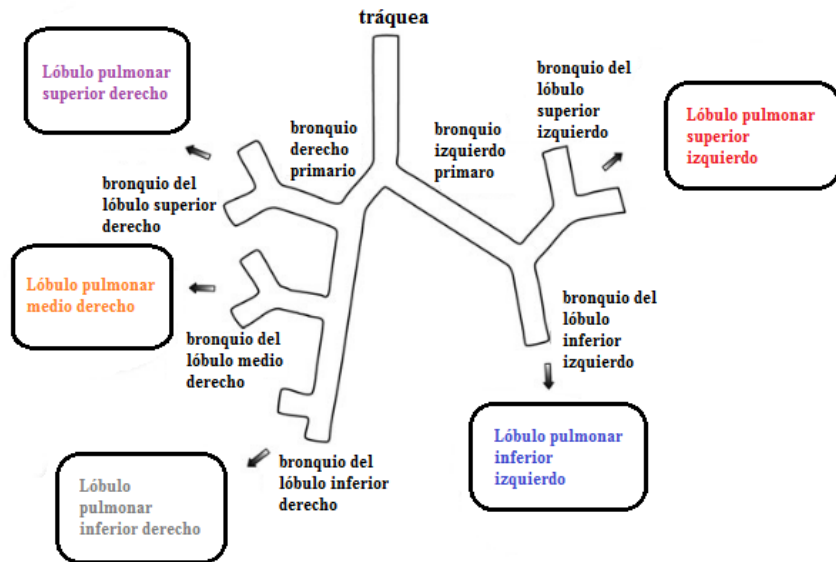


Fig. 3. Esquematación del árbol traqueo-bronquial. Inicialmente, la tráquea se bifurca en los bronquios primarios izquierdo y derecho, mismos que derivan en bronquios lobares pulmonares. El bronquio derecho primario deriva en los bronquios lobares superior, medio e inferior derecho. El bronquio izquierdo primario deriva en los bronquios lobares superior e inferior izquierdo. Modificado de Jiyuan Tu *et al.*, 2013.

Las paredes bronquiales primarias poseen las mismas capas de tejido que recubren la pared traqueal. Sin embargo, a medida que los bronquios lobares se ramifican, la composición bronquial se torna de un epitelio pseudoestratificado columnar ciliado a uno columnar sin cilios ni células caliciformes (Waugh y Grant, 2014). En los bronquiolos terminales el epitelio es cuboidal. Debido a que el cartílago hialino interferiría con la expansión del tejido pulmonar y el intercambio gaseoso, éste solamente se halla como soporte en la vía aérea de conducción. A medida que derivan las generaciones bronquiales, los anillos incompletos de cartílago se tornan a placas cartilaginosas mucho más pequeñas, mientras que las zonas de transición y respiratoria carecen totalmente de cartílago en sus paredes. En estas dos últimas regiones, el cartílago se sustituye por una capa de tejido muscular liso que proporciona a los bronquiolos resistencia significativa al paso de aire. Hacia la zona alveolar, las paredes se vuelven cada vez más reducidas a tal punto que los tejidos musculares liso y conectivo desaparecen por completo y una única capa epitelial de células escamosas recubre los conductos alveolares y alveolos (Jiyuan Tu *et al.*, 2013; Marieb y Hoehn, 2013; Waugh y Grant, 2014).

Los alveolos, como estructura única y más distal del tracto respiratorio, cumplen su principal función durante el intercambio de gases. En humanos, proveen aproximadamente una superficie gaseosa de 75 m² durante el intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el aire y la sangre, mismo que ocurre por difusión pasiva (Pavelka y Roth, 2010). Se estima que un adulto promedio posee alrededor de 500 millones de alveolos en ambos pulmones, cada uno con un tamaño inferior a 1/3 de milímetro (Burnard, 2008).

De forma externa, los alveolos se soportan por una red suelta de fibras elásticas en la cual, macrófagos, fibroblastos, nervios, capilares sanguíneos y vasos linfáticos se encuentran embebidos (Sly y Collins, 2008). Hacia el interior, las células escamosas que componen la única capa de tejido alveolar se denominan neumocitos tipo I, rodeados a su vez por una membrana basal de células endoteliales. Entre los neumocitos tipo I se hallan células septales o neumocitos tipo II, que con morfología voluminosa y cuboidal, y con un citoplasma rico en vacuolas (French, 2009), secretan líquido surfactante compuesto por fosfolípidos y componentes glicoproteicos (Tomashewski y Farver, 2008) que previenen la sequedad alveolar y evitan su posible colapso durante la exhalación. Entre alveolos adyacentes se

localizan poros alveolares o poros de Kohn, cuya función es igualar la presión aérea en todo el pulmón, además de proveer rutas alternativas de escape aéreo a cualquier alveolo cuyos bronquiolos colapsen debido a alguna enfermedad (**Fig. 4a**) (Waugh y Grant, 2014). Los alveolos son la fase terminal de todo el sistema respiratorio (Jiyuan Tu *et al.*, 2013).

El intercambio de gases toma lugar a través de una membrana respiratoria compuesta por la pared alveolar y la pared capilar fusionadas firmemente, cuyo grosor oscila entre 1 a 2 μm (Sly y Collins, 2008; Waugh y Grant, 2014). A través de la membrana respiratoria el O_2 difunde hacia la sangre a medida que el CO_2 , producido por el metabolismo celular, abandona las células sanguíneas para ingresar al espacio alveolar (**Fig. 4b**). Durante la exhalación, el CO_2 se elimina del cuerpo (Marieb y Hoehn, 2013).

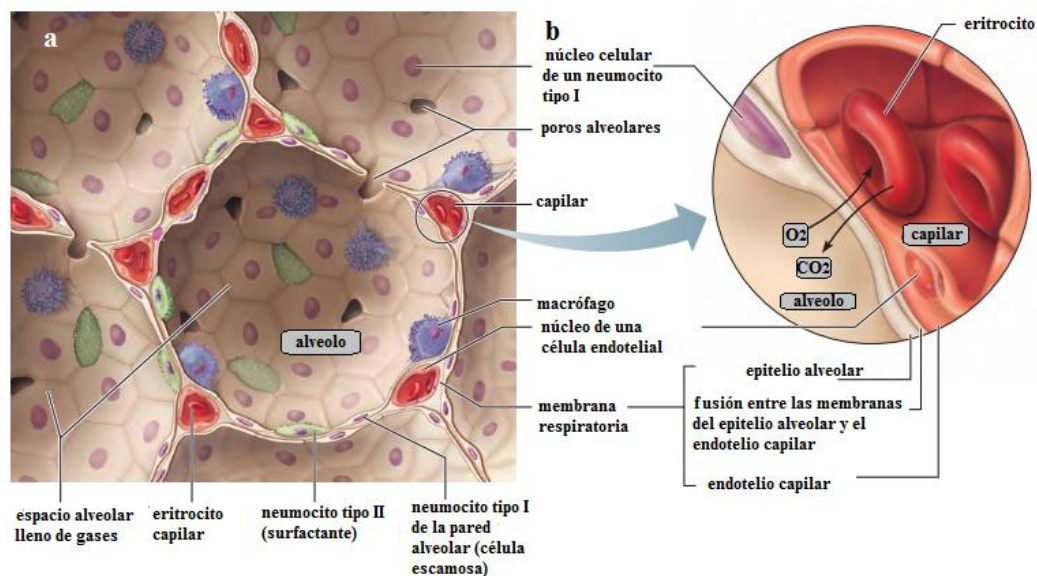


Fig. 4. Esquematización detallada de un alveolo respiratorio y de la membrana respiratoria. 4a. Corte transversal de un alveolo respiratorio. Neumocitos tipo I y II conforman el epitelio alveolar; entre ellos se localizan capilares sanguíneos, macrófagos alveolares y poros de Kohn. **4b.** La membrana respiratoria es el resultado de la fusión entre las membranas del epitelio alveolar y la membrana del endotelio capilar. A través de difusión pasiva, el oxígeno alveolar atraviesa la membrana respiratoria a medida que el dióxido de carbono ingresa a la superficie alveolar. Modificado de Marieb y Hoehn, 2013.

2 Anatomía pulmonar

En humanos, los pulmones izquierdo y derecho ocupan toda la cavidad torácica a excepción del mediastino, que es el espacio anatómico que alberga el corazón, los grandes vasos sanguíneos, la tráquea, los bronquios, el esófago, así como otros órganos y estructuras

vitales. Inferiormente, los pulmones se encuentran rodeados por el diafragma, mientras que de forma externa se protegen por las costillas, el esternón y la columna vertebral (Marieb y Hoehn, 2013; Peate, 2018; Tomashefski y Farver, 2008). En términos generales, los pulmones se constituyen por espacios aéreos, de tal manera que el parénquima pulmonar por el que se componen los determina como un órgano esponjoso, elástico y resistente, con un peso poco mayor a un kilogramo (Aung *et al.*, 2019). Tal como se describió en el apartado 1.2, a medida que se ramifican los bronquios primarios en bronquios lobares, éstos servirán como conductos aéreos directos hacia un lóbulo pulmonar específico. El pulmón derecho se divide en tres diferentes lóbulos: superior, medio e inferior, mientras que el izquierdo, más pequeño que el derecho, se divide sólo en dos: superior e inferior (Fig. 3). Las divisiones entre lóbulos se denominan fisuras (Marieb y Hoehn, 2013; Waugh y Grant, 2014).

Internamente, cada lóbulo se compone de uno a diez segmentos broncopulmonares, que se separan unos de otros mediante septos de tejido conectivo (Leslie y Wick, 2018). Un segmento broncopulmonar es cada una de las porciones pulmonares suplidas por un bronquio segmental (Tomashefski y Farver, 2008). Cada pulmón cuenta con diez segmentos broncopulmonares, con un arreglo y disposición similar (pero no idéntica) entre sí (Fig. 5). Clínicamente, los segmentos broncopulmonares poseen gran importancia diagnóstica, pues ciertas enfermedades respiratorias están confinadas solamente a uno o pocos de ellos (Marieb y Hoehn, 2013).

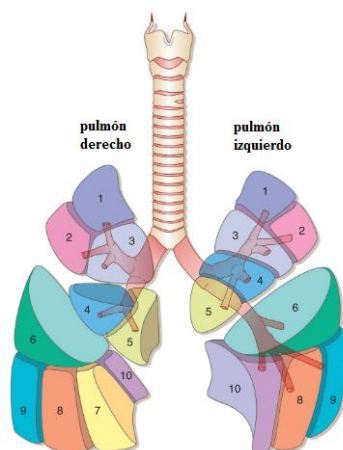


Fig. 5. Segmentos broncopulmonares. Los pulmones derecho e izquierdo (mayoritariamente) se dividen en un total de diez segmentos broncopulmonares: **1.** Apical. **2.** Posterior. **3.** Anterior. **4.** Lateral. **5.** Medial. **6.** Superior. **7.** Medial basal. **8.** Anterior basal. **9.** Lateral basal. **10.** Posterior basal. **Nota:** Usualmente, los segmentos broncopulmonares 7 y 8 del pulmón izquierdo se encuentran fusionados, considerándose así un solo segmento. Modificado de Leslie y Wick, 2018.

3 *Inmunidad innata*

La inmunidad innata representa la primera línea defensiva de la respuesta inmunológica. Se compone de 1) proteínas solubles, cuya función es la detección y unión a productos y agentes microbianos, y 2) leucocitos, células que ingieren partículas exógenas y microorganismos, y que se hallan en el torrente sanguíneo y migran a los distintos tejidos o sitios inflamatorios (Martin y Frevert, 2005). La inmunidad innata se encuentra siempre en un estado activo, lista para reconocer e inactivar partículas y patógenos invasivos a lo largo de los diferentes tejidos del hospedero (Martin y Frevert, 2005). Además, se caracteriza por ocurrir tempranamente (horas a días) después de un estímulo, cuyo origen puede ligarse a daño tisular, una infección o a estrés genotóxico (Burleson *et al.*, 2015; Gasteiger *et al.*, 2016).

La inmunidad innata es efectuada mediante el reconocimiento común de diversos motivos microbianos (Martin y Frevert, 2005). Esto es, a través de receptores germinales (p. ej. los receptores de reconocimiento a patrones (PRRs) como lo son los receptores tipo toll o TLRs, que sensan patrones moleculares asociados a patógenos o PAMPs y patrones moleculares asociados a daño o DAMPs). Estos mecanismos de reconocimiento inician una cascada de señalización celular que resulta en la producción de citocinas/quimiocinas, cuya función es el desencadenamiento de una respuesta inflamatoria y la eventual eliminación del patógeno detectado (Burleson *et al.*, 2015). De forma relevante, los PAMPs, que son reconocidos por los receptores de la inmunidad innata, se hallan altamente conservados entre una gran variedad de agentes patogénicos (bacterias, hongos y microbios), además de estar ausentes en los tejidos del hospedero. Algunos de los PAMPs más comunes son: manoproteínas, lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, glucanos, DNA bacteriano y RNA de cadena doble (Meyer, 2002).

Para desencadenarse, la respuesta inmunológica innata no necesita de los procesos selectivos que caracterizan a la inmunidad adaptativa, es decir, de una especificidad antigénica y memoria inmunológica (Gasteiger *et al.*, 2016). En los pulmones, la inmunidad innata se compone de barreras físicas compuestas por la misma mucosa respiratoria, mientras que macrófagos, neutrófilos, mastocitos y células NK (por sus siglas en inglés, natural killers) encabezan la respuesta celular (Burleson *et al.*, 2015).

3.1 Inmunología del tracto respiratorio

El tracto respiratorio posee la mucosa superficial más grande después del tracto gastrointestinal (Sato y Kiyono, 2012). Durante la inspiración, el tracto respiratorio se encuentra potencialmente expuesto a gases, partículas orgánicas e inorgánicas, microorganismos y agentes infectivos. Éstos podrían ocasionar diversas enfermedades pulmonares al alcanzar su nicho adecuado (Meyer, 2002; Iwasaki *et al.*, 2016). A fin de permitir el intercambio gaseoso, los microorganismos y partículas deben eliminarse del tracto respiratorio con el objetivo de evitar un proceso de inflamación innecesario, es decir, el reclutamiento de leucocitos y la respuesta inflamatoria que los acompaña (Iwasaki *et al.*, 2016; Nicod, 1999). De no eliminarse, las partículas y microorganismos podrían desencadenar procesos inflamatorios capaces de bloquear las vías respiratorias y, en casos más graves, inducir infecciones graves culminantes en neumonía (Iwasaki *et al.*, 2016).

El tracto respiratorio se halla muy bien equipado para combatir y eliminar toda clase de agentes patológicos externos (Golubicic y Tekavec-Trkanjec, 2015). Para lograrlo, la respuesta inmunológica del tracto sigue un protocolo de defensa en el que se desenvuelven los dos sistemas de protección inmunológicos: innato y adaptativo (Martin y Frevert, 2005). Al interactuar entre sí, los sistemas involucran distintas líneas defensivas (Iwasaki *et al.*, 2016) entre las cuales se hallan barreras físicas, mecánicas, humorales y celulares (Golubicic y Tekavec-Trkanjec, 2015).

Bajo condiciones normales, el tracto respiratorio inferior se halla generalmente estéril y desprovisto de microorganismos infecciosos (Burleson *et al.*, 2015). No obstante, al verse comprometido, generalmente debido a los patógenos más diminutos (bacterias y virus <1µm) que evitan fácilmente las primeras barreras defensivas y arriban a los alveolos (Martin y Frevert, 2005), es que se necesita emplear un sistema defensivo más complejo (Sato y Kiyono, 2012). Este último sistema engloba los mecanismos inmunitarios de la respuesta inmunológica adaptativa (Burleson *et al.*, 2015).

3.1.1 Primeras barreras defensivas del tracto respiratorio

La cavidad nasal es la vía de entrada hacia el tracto respiratorio para microorganismos patogénicos y otros agentes infecciosos. Las células epiteliales constitutivas de su mucosa y de otras regiones del tracto respiratorio son su blanco predilecto (Burleson *et al.*, 2015). Al ingresar, microbios y partículas se humidifican a medida que recorren el tracto respiratorio superior. Sus propiedades aerodinámicas y dimensionales determinarán la profundidad y área de deposición en el tracto respiratorio inferior. Debido a esto, las capas de tejido epitelial conforman, a su vez, barreras físicas e inmunológicas que, con el apoyo de diversos mecanismos celulares y humorales, previenen la potencial invasión patogénica (Sato y Kiyono, 2012).

Los mecanismos de reflejo y las barreras físicas son los medios básicos de defensa en el tracto superior respiratorio. Entre los mecanismos de reflejo se halla la producción de tos y estornudos en respuesta a una gran variedad de estímulos mecánicos, químicos o ligados a agentes inflamatorios (Nicod, 1999; Meyer, 2002). Las principales barreras físico-mecánicas incluyen las gruesas vellosidades que recubren el vestíbulo nasal, así como la mucosa del tracto respiratorio superior (cavidad nasal-vía traqueo-bronquial), que por acción de impacto filtra y captura partículas y microorganismos (Meyer, 2002) con un diámetro de entre 5 a 8 μm , con el fin de evitar su desplazamiento a la zona alveolar (Sato y Kiyono, 2012).

Las secreciones mucinosas del tracto respiratorio superior contienen sustancias bacteriostáticas, tales como lisozimas (complejos líticos para la mayoría de membranas bacterianas), lactoferrinas (excluyen el hierro del metabolismo bacteriano) (Martin y Frevert, 2005), anticuerpos derivados de las células plasmáticas circundantes (inmunoglobulinas A y G: IgA; IgG) (Tomashefski y Farver, 2008) y péptidos antimicrobianos (defensinas) secretados por leucocitos y células epiteliales. Todos éstos, factores antimicrobianos (Inglis, 2007) que evitan la adhesión de virus y bacterias a las superficies epiteliales del tracto respiratorio (Meyer, 2002). Además de los mecanismos de eliminación mecánicos, la microbiota residente nasofaríngea es un elemento biológico que, en simbiosis con su hospedero, confiere protección adicional a la mucosa respiratoria (Meyer, 2002). En conjunto, las primeras barreras defensivas físico-mecánicas del tracto respiratorio superior

desempeñan un importante papel en la respuesta inmunológica innata pulmonar (Martin y Frevert, 2005).

3.2 Células de la respuesta inmunológica innata

La respuesta inmunológica innata se constituye por un amplio y creciente rango de células con un linaje mieloide y linfoide. Estas células comparten ciertas características: un origen hematopoyético, la ausencia de receptores somáticos recombinados específicos de antígeno y de una memoria inmunológica altamente específica, y la capacidad de ejercer funciones antimicrobianas (Boraschi e Italiani, 2018; Gasteiger *et al.*, 2016). En vertebrados, la inmunidad innata es un sistema ampliamente dependiente de células mieloides profesionales que engullen y eliminan patógenos. Evolutivamente, las células y proteínas del sistema inmune adaptativo adquirieron capacidades para funcionar de forma más eficiente en conjunto con las células del sistema inmunitario innato (Beutler, 2004).

Las diferentes respuestas que engloban a la inmunidad innata se dirigen por mecanismos dependientes de células, como lo son la fagocitosis y la citotoxicidad, o por factores secretados entre los que se incluyen péptidos antimicrobianos, citocinas/quimiocinas, factores complementarios, alarminas, quitinasas, proteínas de fase aguda, proteasas y otras moléculas (Gasteiger *et al.*, 2016). Las citocinas y quimiocinas son los principales mediadores de la comunicación intercelular dentro del sistema inmunológico; orquestan las complejas respuestas inmunológicas mediante el reclutamiento de grupos celulares y sus especializadas funciones (Burleson *et al.*, 2015). La inmunología innata es crítica para el desarrollo de la inmunidad adaptativa y la subsecuente generación de memoria inmunológica (Burleson *et al.*, 2015; Martin y Frevert, 2005).

Las células mieloides incluyen fagocitos mononucleares y polimorfonucleares. Dentro de los primeros se halla a los macrófagos, que se distribuyen a lo largo de todo el cuerpo humano, en algunos casos dentro del parénquima de los órganos mayores (cerebro, corazón, pulmones e hígado). Las células fagocíticas polimorfonucleares incluyen a los neutrófilos, basófilos y eosinófilos, clave importante en el control de infecciones microbianas (Beutler, 2004).

3.2.1 Neutrófilos y su función en la respuesta inmunológica

Los neutrófilos polimorfonucleares conforman el grupo leucocitario más abundante del torrente sanguíneo humano (Burleson *et al.*, 2015; Mócsai, 2013). A medida que se generan en la médula ósea (Borregaard, 2010), componen aproximadamente el 50 a 70% de los leucocitos circulantes (Owen *et al.*, 2014). Debido a su especialización como células exterminadoras (Beutler, 2004), los neutrófilos constituyen una de las primeras líneas defensivas celulares (Urban *et al.*, 2006) durante la presencia de patógenos infecciosos, tales como bacterias, hongos, protozoarios (Rosales *et al.*, 2016) y hasta virus (Drescher y Bai, 2013). Para efectuar sus funciones inmunológicas, migran desde la sangre hasta el sitio de inflamación, donde desempeñan un papel crucial en la eliminación de los patógenos. La quimiotaxis (movimiento direccional de la célula guiado por gradientes de quimioatrayentes extracelulares) es esencial para el cumplimiento de este proceso migratorio (Rosales *et al.*, 2016).

Bajo condiciones normales, los neutrófilos son células de vida corta. En ausencia de un proceso inflamatorio, usualmente se hallan de 6 a 20 horas en circulación sanguínea (Drescher y Bai, 2013), antes de experimentar apoptosis (Mócsai, 2013). Hay aproximadamente 5,000 neutrófilos por cada mm^3 sanguíneo, y un ser humano adulto produce de 1 a 2×10^{11} al día (Abbas *et al.*, 2012; Beutler, 2004; Borregaard, 2010). Con una morfología esférica y varias prolongaciones membranales, los neutrófilos son células con un diámetro de entre 12 a 15 μm . Su núcleo celular se halla segmentado en tres a cinco lóbulos conectados entre sí. El citoplasma contiene numerosos gránulos de dos tipos: 1) gránulos específicos con enzimas proteolíticas tales como la lisosima, colagenasa y elastasa, y 2) gránulos azurófilos, lisosomas que contienen enzimas y péptidos antimicrobianos como defensinas, catelicidinas (Abbas *et al.*, 2012) y, en gran abundancia, mieloperoxidasa (MPO) (Drescher y Bai, 2013).

A pesar de su corta vida útil, ésta es capaz de prolongarse durante un proceso inflamatorio a medida que los neutrófilos migran desde el torrente sanguíneo hasta el sitio de inflamación (Drescher y Bai, 2013). Esta prolongación les otorga ventajas para reclutar otras células inmunitarias, cuyas funciones evitan la propagación del agente invasivo (Drescher y Bai, 2013; Mócsai, 2013). Citocinas proinflamatorias como interferón- γ (IFN- γ), el factor de

necrosis tumoral (TNF, por sus siglas en inglés *tumor necrosis factor*) y el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF, por sus siglas en inglés *granulocyte colony-stimulating factor*) aumentan su sobrevivencia durante este proceso (Drescher y Bai, 2013). La participación y cooperación de los neutrófilos durante la regulación de la respuesta inmunológica se basa en el reconocimiento y liberación de diversos factores solubles o por contacto directo célula con célula (Rosales *et al.*, 2016).

Entre los mecanismos por los cuales los neutrófilos ejercen sus funciones principales se encuentran la fagocitosis, la degranulación de enzimas proteolíticas, el estallido respiratorio (producción de especies reactivas de oxígeno o ROS, por sus siglas en inglés, *reactive oxygen species*) y la liberación de trampas extracelulares o NETs (por sus siglas en inglés, *neutrophil extracellular traps*) (Burlison *et al.*, 2015) (a través de un proceso denominado NETosis) (Giacalone *et al.*, 2020) compuestas por fibras extracelulares de cromatina nuclear o mitocondrial (Gasteiger *et al.*, 2016) y otras proteínas granulares (p. ej. mieloperoxidasa y elastasa) (Urban *et al.*, 2006).

Tras la detección de un agente patogénico, los neutrófilos inician un programa especial de eliminación: fagocitan la partícula infecciosa, y en el fagosoma producido, se inicia la formación de ROS que, a través de la actividad NADPH oxidasa, permite la depolarización de la membrana fagosomal. Tal acción permite que el contenido granular intracelular de los neutrófilos (enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos) se internalice y libere dentro del fagosoma. El resultado de este programa es la eliminación y digestión del agente patogénico. Finalmente, los neutrófilos mueren por apoptosis y sus restos celulares son engullidos por macrófagos, eventos que engloban un proceso resolutorio post-inflamación (Mócsai, 2013).

3.2.2 Neutrófilos alveolares: mecanismos inmunológicos ante un microorganismo respiratorio infeccioso

Como cualquier otro tejido del cuerpo, los pulmones se caracterizan por un perfil inmunológico específico (Giacalone *et al.*, 2020). Normalmente, un número reducido de células leucocitarias (macrófagos y linfocitos) habita el compartimento alveolar (French, 2009). En personas sanas, los macrófagos alveolares representan el 95% de los leucocitos totales presentes en las vías respiratorias; el 1 a 4% se conforma por linfocitos, y sólo el 1%

se compone por neutrófilos (Martin y Frevert, 2005). Al desempeñar una función vital en la detección, identificación y destrucción de partículas y microorganismos patogénicos, el macrófago alveolar es la célula centinela del tracto respiratorio inferior (Martin y Frevert, 2005; Pechous, 2017).

Los neutrófilos, por su parte, no son un tipo celular de mayor abundancia en las vías respiratorias inferiores, sin embargo, bajo condiciones normales patrullan la microvasculatura pulmonar (Pechous, 2017), a la vez que establecen un reservorio pulmonar específico de neutrófilos (Giacalone *et al.*, 2020). La necesidad de este reservorio se relaciona estrechamente con el grado de exposición que los pulmones presentan ante diversos patógenos, alérgenos y toxinas del medio externo, mismos que los convierten en un órgano mayormente vulnerable a la inflamación (Maas *et al.*, 2018). La eficiente acumulación de neutrófilos en los pulmones es vital para la inducción de una respuesta inmunitaria adaptativa en el hospedero (Craig *et al.*, 2009).

Durante un proceso inflamatorio, ocasionado por bacterias, virus u hongos respiratorios, los macrófagos alveolares, a través de la detección de PAMPs y DAMPs (Maas *et al.*, 2018), en conjunto con las células epiteliales y endoteliales pulmonares, producen una oleada de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, cuyo fin es inducir la infiltración masiva de neutrófilos circulantes a los espacios alveolares, misma que toma lugar en los capilares sanguíneos que rodean toda la red alveolar (Rossaint y Zarbock, 2012). El microambiente generado induce también la proliferación de neutrófilos en la médula ósea y la activación de los neutrófilos circulantes en reposo (Pechous, 2017), señales que también inducen el incremento de neutrófilos circulantes y del reservorio pulmonar específico para este tipo celular (Craig *et al.*, 2009; Pechous, 2017).

En circulación, los neutrófilos se hallan en un estado de reposo en el que procesos como la transcripción y la síntesis de lípidos y proteínas no están activos. Para el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria esta actividad es esencial e involucra el incremento en las actividades metabólica y transcripcional (Maas *et al.*, 2018; Rossaint y Zarbock, 2012), el aumento en la producción de citocinas, la regulación de las moléculas de adhesión, y el incremento de las interacciones célula con célula (Craig *et al.*, 2009). Quimiocinas proinflamatorias, tales como las interleucinas 8 y 1 (IL-8, IL-1) y el factor de

necrosis tumoral- α (TNF- α), secretadas por macrófagos alveolares en respuesta a daño pulmonar, desempeñan una función importante en la activación, reclutamiento y transmigración de los neutrófilos hacia el espacio alveolar, sitio en donde ejercerán sus funciones efectoras (Rossaint y Zarbock, 2012).

Tras el inicio de la señalización de reclutamiento, los neutrófilos salen de la microvasculatura capilar e ingresan al espacio alveolar a través del intersticio (espacio entre las membranas basales del epitelio alveolar y del endotelio capilar; ver **Fig. 4**). Su transmigración al intersticio ocurre por migración paracelular (alrededor de las células endoteliales capilares, ~90%) o transcelular (a través de ellas, ~10%). En el intersticio, los neutrófilos pueden permanecer en él o adentrarse al espacio alveolar, utilizando, nuevamente, una ruta paracelular o transcelular (Grommes y Soehnlein, 2011; Pechous, 2017).

El proceso de transmigración ocurre dentro de una secuencia específica muy compleja, aunque no estricta (**Fig. 6**). En el espacio alveolar, macrófagos alveolares y neumocitos tipo I guían a los neutrófilos mediante la secreción de mediadores inflamatorios. Compuestos por un gran arsenal de herramientas antimicrobianas (ver **3.2.1**), los neutrófilos inician una respuesta inflamatoria con énfasis en la destrucción total de los patógenos respiratorios invasores (Borregaard, 2010; Grommes y Soehnlein, 2011; Maas et al., 2018; Pechous, 2017; Rossaint y Zarbock, 2012). A pesar de que el reclutamiento de neutrófilos es vital para la defensa de las vías respiratorias inferiores, una activación grave es capaz de inducir daño al tejido pulmonar, debido, principalmente, a la liberación constante de sus componentes citotóxico-antimicrobianos (Grommes y Soehnlein, 2011).

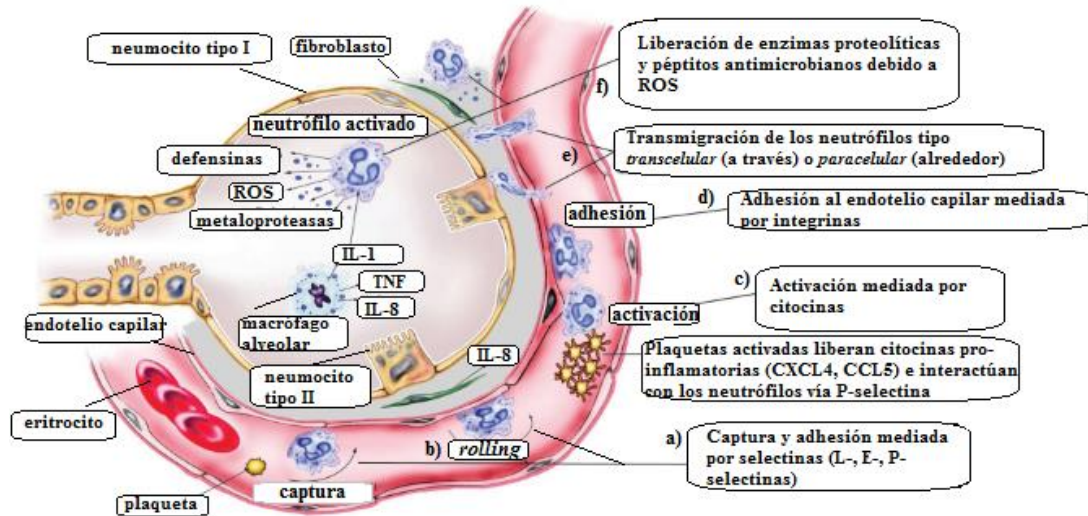


Fig. 6. Esquemización del reclutamiento y trans migración de los neutrófilos al espacio alveolar. La trans migración de los neutrófilos al espacio alveolar ocurre a través de una serie de pasos. **a)** Captura de los neutrófilos circulantes al endotelio capilar, mediado por selectinas; **b)** Rolling o rodamiento mediado por selectinas; **c)** Activación mediada por citocina proinflamatorias; las plaquetas también interactúan con los neutrófilos durante su activación; **d)** Adhesión al endotelio capilar mediado por integrinas; **e)** Trans migración de los neutrófilos desde los capilares al intersticio y luego al espacio alveolar; **f)** Liberación de componentes proteolíticos antimicrobianos. Modificado de Grommes y Soehnlein, 2011.

4 Epidemiología de la infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), causado por la infección crónica con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), representa una de las pandemias más significativas para la historia contemporánea de la humanidad (1981 a la actualidad) (Becerra *et al.*, 2016), misma que ha cambiado durante los últimos 40 años (Fettig *et al.*, 2014). Esto es, desde los primeros casos reportados a inicio de los años 80, hasta un incremento de nuevas infecciones en 1997, y luego una disminución notoria de las nuevas infecciones y mortalidad asociadas al virus durante la década de los 2000 (Fettig *et al.*, 2014). Hoy en día, no existe región alguna en el mundo sin estragos asociados a la pandemia del VIH (Simon *et al.*, 2006).

Desde inicios de la epidemia, cerca de 75 millones de personas han sido infectadas por el VIH, mientras que aproximadamente 32 millones han muerto a causa del mismo. Globalmente, se estima que a finales de 2018 cerca de 37.9 [32.7 a 44.0] millones de personas estuvieron viviendo con la infección, con un porcentaje de prevalencia de 0.8% de infecciones en personas de entre 15 y 49 años de edad, y un total de 1.7 millones de infecciones nuevas (Fig. 7). A finales del mismo año, cerca de 770 mil personas en todo el

mundo murieron a causa del virus (UNAIDS, 2019; WHO, 2020). África-subsaariana es el epicentro de la pandemia (Sharp y Hahn, 2011) debido a su alto índice de nuevas infecciones (casi uno de cada 25 adultos vive con el VIH). Estas cifras representan más de dos tercios de las personas que viven con el virus en todo el mundo (Simon *et al.*, 2006; WHO, 2020).

De acuerdo al Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/SIDA (CENSIDA), para México se reportaron a finales de 2019, un total de 179,640 casos de personas viviendo con el VIH (de los cuales, 87,571 corresponden a fase de SIDA) así como 15,653 nuevas infecciones con respecto a 2018. El número de defunciones por SIDA hacia finales de 2017 fue de 4,720. Desde inicios de la pandemia (1983-2019), México registró un total de 210,931 casos notificados de SIDA (CENSIDA, 2019).

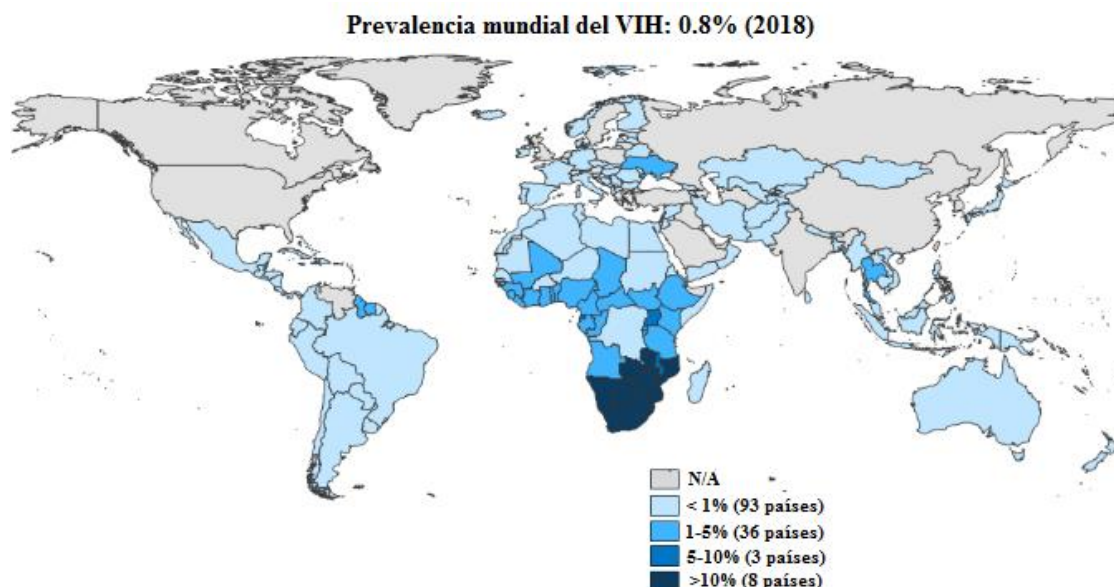


Fig. 7. Prevalencia mundial del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en adultos. En tonalidades de azul se muestran los porcentajes de personas con un rango de entre 15-49 años que fueron infectadas con el VIH durante 2018. La prevalencia mundial registrada fue de 0.8%. Modificado de Kaiser Family Foundation. Basado en la información de UNAIDS, 2019.

El VIH se agrupa dentro del género *Lentivirus*, familia *Retroviridae*. Como todos los retrovirus, el genoma del VIH se codifica por RNA monocatenario, el cual es transcrito de forma reversa a DNA viral, por medio de la enzima transcriptasa-inversa al ingresar a una nueva célula (Turner y Summers, 1999). Con base en las características y diferencias de los antígenos virales, el VIH se clasifica en los tipos 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) (German Advisory

Committe Blood, 2016). Epidemiológicamente, el VIH-1 se extiende a lo largo de todo el mundo, en tanto que el VIH-2 se restringe sólo a África Occidental y algunas regiones europeas, como Portugal. En humanos, la infección crónica de ambos virus es causa de SIDA, sin embargo, la progresión a inmunodeficiencia del VIH-2 es más lenta a comparación de la vista en el VIH-1 (Nyamweya et al., 2013). Se ha referido al VIH como una derivación del virus de inmunodeficiencia simiana (SIV), a través de un proceso zoonótico proveniente de su hospedero natural, el mono tiznado *Cercocebus atys* proveniente de África occidental. En esta especie, la infección por SIV, aunque de por vida, no es patogénica ni progresa a enfermedad crónica (Ling, et al., 2004), aunque esto último es tema actual de discusión.

A pesar de que no existe una cura definitiva para el VIH, numerosos fármacos se han aprobado para su uso clínico, cuya acción se basa en la intervención y/o inhibición de las diferentes etapas del ciclo replicativo viral (Ruelas y Green, 2013). Hoy en día, existen 32 fármacos o Tratamientos Antirretrovirales (TAR) aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la infección por el VIH (Phanuphak y Gulick, 2020). La terapia antirretroviral de gran actividad HAART (por sus siglas en inglés, *Highly Active Antiretroviral Treatment*) es un tratamiento que reduce considerablemente la progresión de la enfermedad a SIDA (Girard et al. 2011). Actualmente, la terminología HAART se halla en desuso; en su lugar esta terapia recibe el nombre de TARc o Tratamiento Antiretroviral combinado.

Actualmente, más de 23 millones de personas a lo largo de todo el mundo consumen el TAR (Phanuphak y Gulick, 2020), no obstante, éste no es universal y las perspectivas para alcanzar un tratamiento o vacuna curativa son inciertas (Sharp y Hahn, 2011). De acuerdo al último boletín de atención integral de personas con VIH proporcionado por CENSIDA (CENSIDA, 2019), al cierre de 2019 se registraron para México 100,409 personas bajo TAR, con un estatus activo en la plataforma SAL-VAR de la Secretaría de Salud.

5 Inmunopatogénesis de la infección por el VIH (Historia Natural del VIH)

La transmisión del VIH ocurre por el contacto con mucosas, y puede llevarse a cabo mediante tres vías: a través de la vía sexual, por vía sanguínea (por transfusión de sangre o productos de sangre contaminados), y por vía materno-infantil (de madre a hijo durante el

embarazo, el parto o lactancia) (Girard *et al.*, 2011; Sharp y Hahn, 2011). Las mucosas superficiales (cervicovaginal, rectal, oral) representan la principal vía de entrada para el VIH en la gran mayoría de infecciones (Becerra *et al.*, 2016). Se estima que el 80% de los casos adquirieron el virus por medio de esta vía, mientras que el 20% restante se infectó por inoculaciones percutáneas o intravenosas (Cohen *et al.*, 2011). Así, el SIDA se considera, primordialmente, una enfermedad crónica de transmisión sexual (Sharp y Hahn, 2011).

Para anclarse y fusionarse a la membrana de la célula blanco, el VIH interactúa con el receptor CD4, y con uno de los correceptores a quimiocinas, CCR5 o CXCR4, a través del complejo glicoproteico de la envoltura viral: gp120 (German Advisory Committee Blood, 2016; Turner y Summers, 1999). La distribución de estas moléculas superficiales está presente en un gran número de poblaciones de células T, así como en monocitos/macrófagos, timocitos y células dendríticas (CDs). Las células T CD4⁺ de tejido linfoide constituyen la principal (aunque no única) fuente de producción vírica (Simon y Ho, 2003). A pesar del tamaño mínimo de su genoma (menos de 10 kb) y de sus pocos genes, el VIH sobresale por su gran capacidad para aprovechar las vías de señalización de las células infectadas, así como por neutralizar y evadir los complejos componentes del sistema inmunológico (Simon *et al.*, 2006). Lo anterior le permite persistir a las respuestas inmunológicas del huésped, incluso ante tratamientos antirretrovirales altamente supresivos (Stevenson, 2003).

La destrucción gradual de las células CD4⁺ (*naïve* y de memoria) es la característica principal de la infección por el VIH, siendo el SIDA la última etapa de ésta (Simon *et al.*, 2006). Células T CD4⁺, así como células de Langerhans, son los blancos principales del virus, aunque otras PDC (células dendríticas plasmacitoides) (Borrow y Bhardwaj, 2008) y macrófagos desempeñan un papel accesorio infectivo secundario en su propagación (Becerra *et al.*, 2016). Con la migración de células infectadas (células T CD4⁺, PDC y macrófagos) al torrente sanguíneo ocurre una amplificación viral secundaria en el tracto gastrointestinal, bazo, médula ósea y otros tejidos linfoides secundarios, hecho que produce una infección masiva de células susceptibles (Cohen *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2006). A través de diversas mutaciones puntuales, recombinación y variaciones en su secuencia génica, el VIH adquiere un alto nivel de diversidad génica, que se traduce en la presencia de diferentes cuasi-especies: mutantes virales residentes en los diferentes compartimentos biológicos del hospedero,

caracterizadas por una elevada resistencia a los anticuerpos neutralizantes producidos, a las células T CD8⁺ citotóxicas y al TAR (Simon *et al.*, 2006). El microambiente crónico inflamatorio producido es el causante de la fibrosis en los tejidos linfoides y del irreversible fallo en la regeneración de las células T CD4⁺, lo que induce, de manera progresiva, el estado hacia SIDA. Se ha observado que el TAR es capaz de revertir muchos de estos mecanismos inflamatorios, previniendo que el VIH avance de una etapa infectiva a la siguiente, sin embargo, el efecto es incompleto (Sereti y Atfield, 2016).

A pesar de que el curso infectivo y los niveles de carga viral pueden variar de un individuo a otro, la historia natural de la infección por el VIH es prácticamente la misma en todas las personas que no se encuentran bajo TAR (Becerra *et al.*, 2016). La historia natural de la infección se basa en la dinámica de la cuantificación de células T CD4⁺ en un mm³ de sangre, y de la carga viral, definida como el número de copias de RNA vírico por ml de plasma sanguíneo de un individuo infectado (Simon y Ho, 2003; Nyamweya *et al.*, 2013). Compuesta por las fases aguda, crónica y SIDA, la historia natural describe el grado de inmunodeficiencia (Sereti y Lane, 2001) de una persona con el VIH, así como su capacidad de transmitir el virus (Fig. 8) (Novitsky y Essex, 2012).

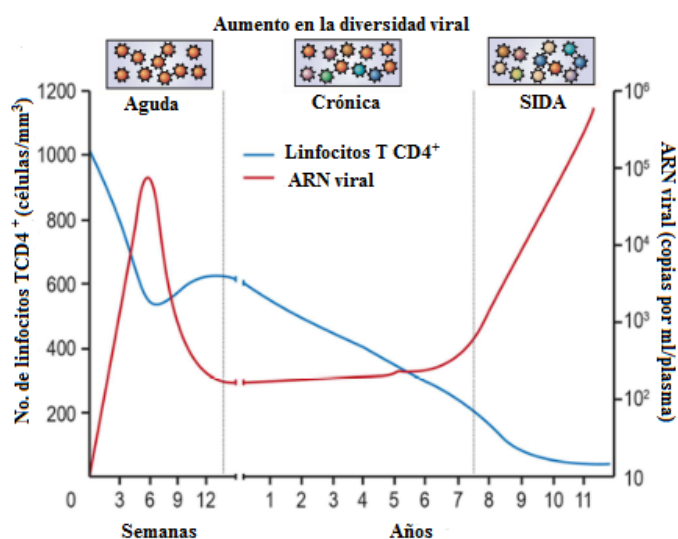


Fig. 8. Historia natural de la infección por el VIH. El curso infectivo del VIH está dividido en las fases aguda, crónica y SIDA. En pacientes sin TAR, el conteo de células T CD4⁺ sanguíneas (azul) decrece progresivamente a lo largo de la infección. Un pico característico de carga viral (rojo) está asociado a la fase aguda de la infección, mismo que alcanza una estabilidad durante la fase crónica o asintomática; en la fase de SIDA aumenta nuevamente. Asimismo, la diversidad viral incrementa como resultado de una alta tasa replicativa viral, así como de mutaciones puntuales asociadas al virus. Modificado de Becerra *et al.*, 2016; Simon y Ho, 2003.

5.1 Fase aguda

Luego de su transmisión, y durante un periodo aproximado de 1 a 2 semanas, denominado fase de eclipse, el VIH se propaga libremente desde el sitio inicial de la infección hasta los órganos y tejidos linfoides, sitios idóneos para su replicación. Durante la fase eclipse la carga viral es indetectable y, tanto el montaje de una respuesta inmunológica como los primeros síntomas de la infección, no son visibles aún (Coffin y Swantrom, 2013; Becerra *et al.*, 2016).

El proceso de seroconversión (producción de anticuerpos anti-VIH) ocurre en el 70 a 80% de individuos infectados, durante la fase aguda o primaria (2 a 4 semanas post-infección), como parte de la respuesta inmunológica ante los niveles relativamente altos de carga viral circulante ($> 10^7$ copias de RNA viral por ml de plasma) (Melhuish y Lethwaite, 2018). Además, un porcentaje significativo de células T CD4⁺ en sangre y ganglios linfáticos se infecta en este punto (Coffin y Swantrom, 2013). Los síntomas más comunes durante la fase aguda (en conjunto denominados síndrome agudo infeccioso por VIH) (Klimas *et al.*, 2008) son: fiebre, malestar, mialgia, artralgia, erupciones cutáneas, faringitis, úlceras orales y diarrea. La mayoría de estos síntomas desaparecen después de 7 a 10 días (Lethwaite y Wilkins, 2009; Melhuish y Lethwaite, 2018).

A medida que se alcanza el pico en la carga viral (**Fig. 8**) inicia el desencadenamiento de la respuesta inmunológica, reflejada tanto en la producción de anticuerpos antivirales como en la acción de células T CD8⁺ citotóxicas en contra de los antígenos virales expresados en las células infectadas (Coffin y Swantrom, 2013). En este punto de la infección el *reservorio* y *latencia* virales ya se han establecido. La intervención del TAR durante la seroconversión aguda reduce significativamente las magnitudes del reservorio inicial (Sereti y Lane, 2001); cualquier reducción en el nivel de la carga viral es capaz de disminuir la transmisión del VIH (Novitsky y Essex, 2012).

Al término de la fase aguda, la carga viral desciende a medida que la respuesta inmunológica contra el virus se desarrolla (**Fig. 8**) (Simon y Ho, 2003). La fase aguda se caracteriza por una disminución transitoria en el número de células T CD4⁺ en sangre (< 500 células por mm³) (Coffin y Swantrom, 2013; Klimas *et al.*, 2008). De manera general, una persona saludable muestra una cuantificación de entre 800 a 1200 células T CD4⁺ por mm³ de sangre (Klimas *et al.*, 2008). Respecto a la carga viral, ésta disminuye constantemente

(usualmente $<10^2$ copias de RNA viral por ml de plasma) (German Advisory Committee Blood, 2016) hasta alcanzar un punto estable (Simon y Ho, 2003) dentro de un periodo usual de seis semanas post-infección (Melhuish y Lethwaite, 2018), no obstante, la replicación viral no cesa de forma definitiva (Mindel, 2001) (Fig. 8).

5.2 Fase crónica

Tras el periodo de seroconversión, la cuantificación de células T CD4⁺ incrementa de nuevo, aunque generalmente lo hace por debajo de su nivel previo a la infección por el VIH (Lethwaite y Wilkins, 2009). En caso de no tomar tratamiento antirretroviral, la cuantificación de células T CD4⁺ en sangre irán gradualmente en declive (499 a 200 células por mm³) (Coffin y Swantrom, 2013; German Advisory Committee Blood, 2016) en los próximos 6 a 8 años (Fig. 8). En algunos casos, la cuantificación de células T CD4⁺ alcanza una baja muy acelerada durante los próximos 6 a 12 meses post-infección (Melhuish y Lethwaite, 2018). Estos eventos constituyen la fase de estabilidad o de latencia clínica de la infección por el VIH en personas que no se hallan bajo un régimen de tratamiento antirretroviral. La duración de esta fase puede abarcar un periodo de ~7 a 10 años, mismo que es altamente variable entre cada uno de los individuos infectados (Coffin y Swantrom, 2013; Hernandez-Vargas y Middleton, 2013).

De manera general, la fase crónica se caracteriza porque los pacientes son asintomáticos y usualmente inconscientes de su estado infectivo (Coffin y Swantrom, 2013). Pese a esto, otros tantos pueden presentar linfadenopatías persistentes generalizadas (hinchazón o agrandamiento de los ganglios linfáticos en dos o más sitios extra-inguinales), cuya presencia afecta principalmente a los ganglios axilares, cervicales e inguinales. Estos síntomas pueden estar acompañados de una sensación de cansancio, sudoración y mialgia (Melhuish y Lethwaite, 2018). A pesar de denominarse fase de latencia clínica, en esta etapa la infección viral se halla lejos de ser latente y números elevados de células T CD4⁺ mueren diariamente (Coffin y Swantrom, 2013), de manera particular, en los tejidos asociados a mucosas del tracto gastrointestinal o GALT (por sus siglas en inglés, *gut-associated lymphoid tissue*) y en los ganglios linfáticos (Cohen *et al.*, 2011; Forsman y Weiss, 2008).

5.3 Fase de SIDA

A partir de la fase asintomática, y sin TAR, la cuantificación de células T CD4⁺ sigue en declive (**Fig. 8**) (Coffin y Swanstrom, 2013; Melhuish y Lethwaite, 2018). A medida que progresa la infección, los primeros síntomas inespecíficos de una inmunodeficiencia comienzan a surgir como resultado de un debilitamiento inmunológico ligado a la replicación viral alta (**Fig. 8**) (Mindel, 2001). Estos síntomas pueden incluir episodios de diarrea, malestar, fatiga y pérdida de peso, síntomas del denominado complejo relacionado al SIDA. Cuando la inmunodeficiencia ha progresado (<200 células T CD4⁺ por mm³), la respuesta inmunitaria se debilita aún más e infecciones oportunistas y neoplasmas comienzan a surgir. Las infecciones oportunistas y patógenos más frecuentes en la fase de SIDA son: *Mycobacterium tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii*, *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium parvum*, *Candida*, la reactivación de virus como el citomegalovirus (CMV) y el virus herpes simple (VHS), entre otros. Sin TAR, la causa más común de muerte asociada al SIDA suele ser una infección oportunista. Cánceres como el sarcoma de Kaposi, el linfoma no Hodgkin de células B y el carcinoma cervical también se asocian al SIDA (Forsman y Weiss, 2008; German Advisory Committee Blood, 2016; Girard *et al.*, 2011).

6 Respuesta inmunológica innata durante una infección por el VIH: función de los neutrófilos circulantes

El estudio del impacto que tiene la infección del VIH en los neutrófilos, así como el papel de éstos en la progresión de la enfermedad, es apenas reciente. Actualmente, se sabe que durante una infección por el VIH los neutrófilos presentan defectos funcionales (Yaseen *et al.*, 2017).

Los individuos infectados por el VIH suelen experimentar una baja considerable en la cuantificación de neutrófilos circulantes a medida que progresa la infección, evento que se denomina neutropenia, mismo que difiere en duración y gravedad entre los pacientes infectados. La neutropenia se halla asociada a cuantificaciones bajas de células T CD4⁺ y a cargas virales altas. Otras anormalidades, tales como la reducción en la actividad bactericida, defectos en la degranulación y quimiotaxis, fagocitosis inefectiva, expresión anormal de las moléculas de adhesión, la reducción en la producción de ROS, y el aumento en la tasa apoptótica, son características que se han reportado en los neutrófilos de personas con VIH

(Hensley-McBain y Klatt, 2018; Shi *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2014; Yaseen *et al.*, 2017). Pese a que no hay estudios que demuestren procesos estrictos de infección y muerte directas por parte del VIH a neutrófilos maduros (Yaseen *et al.*, 2017), algunos reportes indican que ciertas proteínas virales son capaces de suprimir la proliferación de células progenitoras granulo-monocíticas (Hensley-McBain y Klatt, 2018; Yaseen *et al.*, 2017). La disminución progresiva en el número de neutrófilos y las anormalidades en las funciones efectoras de los restantes, son factores que disminuyen gravemente la capacidad del hospedero para eliminar invasores bacterianos y fúngicos; factores que aumentan el riesgo de sufrir infecciones riesgosas como bacteremia y aspergillosis en la fase de SIDA (Hensley-McBain y Klatt, 2018; Shi *et al.*, 2014).

Los neutrófilos pueden presentar un impacto diverso durante la infección por el VIH dependiendo de su localización y funcionalidad, así como de la etapa infectiva del virus (Hensley-McBain y Klatt, 2018). Pese a ser uno de los primeros grupos celulares en responder ante infecciones y patógenos invasores, contribuyen de igual manera a la inducción de daño tisular mediante la liberación de ROS y otras moléculas antimicrobianas que, secretadas en grandes cantidades, son factores potencialmente dañinos para el hospedero (Hensley-McBain y Klatt, 2018; Mócsai, 2013). Durante una infección por el VIH, esta dicotomía podría tener un impacto significativo debido a la naturaleza de transmisión del virus, es decir, a través de diversas mucosas y tejidos específicos. Debido a esto, la dinámica entre las funciones efectoras antimicrobianas y el daño tisular específico (ligado a la degradación de proteínas estructurales en las mucosas) ocasionado por los neutrófilos, podría ser un factor de gran relevancia en la patogénesis del virus. El aumento en la translocación bacteriana, la activación sistémica inmunológica, así como el surgimiento de infecciones oportunistas y comorbilidades, son algunos eventos asociados al daño tisular inducido por neutrófilos durante una infección por el VIH (Hensley-McBain y Klatt, 2018; Yaseen *et al.*, 2017).

Uno de los mecanismos efectores anti-VIH es la inducción de NETs (ver **3.2.1**), tal como lo observaron Saitoh y colaboradores (Saitoh *et al.*, 2012) en cultivos de neutrófilos de sangre periférica humana. Al capturar las partículas virales, las NETs promueven su eliminación mediante las propiedades anti-VIH de la mieloperoxidasa y de las α -defensinas. Como

células fagocíticas, los neutrófilos son capaces de internalizar al VIH, sin embargo, se asume que éste es capaz de evadir la actividad fagocítica al escapar por compartimentos endosomales carentes de actividad proteolítica, tal como se reporta en macrófagos (Jouve *et al.*, 2005; Yaseen *et al.*, 2017).

6.1 Inmunopatogénesis de la infección por el VIH en pulmón: función inmunológica de los neutrófilos alveolares

La mayor parte de la información que actualmente se tiene acerca del papel de los neutrófilos durante la infección con VIH pertenece solamente a aquella caracterizada en los neutrófilos circulantes (Hensley-McBain y Klatt, 2018). Sólo una pequeña parte de la literatura científica se enfoca en la respuesta inmunológica pulmonar que este tipo celular efectúa durante la infección (Beck, 2005). De forma importante, el estudio de los neutrófilos en muestras de lavado bronco-alveolar (LBA) ofrece una gran oportunidad para el estudio de los efectos que tiene el VIH en los pulmones, así como el impacto de las infecciones oportunistas asociadas a éste (Beck, 2005).

En cuanto a los pulmones se refiere, la infección por el VIH se encuentra relacionada estrechamente con una profunda susceptibilidad a presentar infecciones pulmonares (Shellito, 2004). Desde inicios de la epidemia y hasta nuestros días, infecciones pulmonares como la neumonía bacteriana y fúngica, además de la tuberculosis, son causas significativas de morbilidad y mortalidad en personas que viven con VIH (Gingo y Morris, 2012).

Pocos datos existen acerca del papel que desempeñan los neutrófilos durante una infección por el VIH en los espacios alveolares (Beck, 2005). Pese a esto, se sabe que el establecimiento del virus en los pulmones desencadena una estimulación y activación local inflamatoria que se ve potenciada tras la infección de un patógeno respiratorio bacteriano o fúngico (fase de SIDA) (Head *et al.*, 2019). En este sentido, después de haberse generado un microambiente proinflamatorio, resultado del incremento en la activación de macrófagos, al incremento de marcadores inflamatorios (IL-8, IL-15 y TNF- α), y a la invasión de un patógeno oportunista, un gran número de neutrófilos y otras células anti-inflamatorias (eosinófilos) se reclutan al espacio alveolar (Costiniuk y Jenabian, 2014). Las funciones efectoras de los neutrófilos podrían ser un reflejo de aquellas que se observan en sangre durante la infección por el VIH: alteraciones en la producción de ROS, deterioro en la

fagocitosis, aumento en la tasa apoptótica, entre otros. La sobrevivencia inapropiada de los neutrófilos alveolares podría inducir un estado inflamatorio crónico, regido por la continua liberación de mediadores inflamatorios, además de desencadenar una desregulación y daño pulmonar irreparables (Borregaard, 2010; Charles y Shellito, 2016; Head *et al.*, 2019).

7 *Activación inmunológica e inflamación crónica durante la infección por el VIH*

Tal como se mencionó, la infección del VIH induce el desarrollo de respuestas inmunológicas innato-adaptativas en el hospedero humano. Sin embargo, el efecto resolutorio de éstas es insuficiente o demasiado tardío como para erradicar al virus, circunstancias que establecen una latencia viral de por vida y conducen a un estado de inflamación crónica. Es a partir de esta última que surge el progreso a una inmunodeficiencia con eventos mortales en caso de no tratarse (Sokoya *et al.*, 2017). La inmunodeficiencia en personas con VIH no sólo se caracteriza por una disfuncionalidad del sistema inmunológico, sino también se determina por un estado crónico de activación inmunológica y un continuo recambio celular acompañado de una elevada tasa apoptótica (Mogensen *et al.*, 2010). Hoy en día, se considera a la activación inmunológica como una fuerza impulsora del agotamiento progresivo y muerte de las células T CD4⁺ (Paiardini y Müller-Trutwin, 2013).

Las primeras descripciones con relación a la activación inmunológica se basaron en observaciones clínicas y en análisis de muestras sanguíneas de personas en fase crónica del VIH. Los análisis sanguíneos revelaron un incremento notable en los marcadores de activación (co-expresión de los marcadores CD38 y el antígeno leucocitario humano HLA-DR⁺) y proliferación (Ki-67) tanto en células T CD4⁺ como en T CD8⁺. Dicho perfil inmunológico se asoció con el decremento de células T CD4⁺ y la progresión hacia la fase de SIDA (Paiardini y Müller-Trutwin, 2013; Utay y Hunt, 2016). Tiempo después se determinó que la activación persistente de células T se encontraba ligada a procesos inflamatorios, translocación microbiana y a niveles altos en los marcadores de coagulación en el hospedero (Paiardini y Müller-Trutwin, 2013; Sokoya *et al.*, 2017). Actualmente, el análisis de estos factores es un punto clave en la predicción de la enfermedad. Independiente a la carga viral (Chan-Cheng *et al.*, 2017; Paiardini y Müller-Trutwin, 2013) y a la cuantificación de células T CD4⁺, la activación inmunológica posee gran relevancia en el estudio de la inmunopatogénesis del VIH (Nyamweya *et al.*, 2013; Simon *et al.*, 2006).

Tras la infección por el VIH, existen múltiples mecanismos moleculares y celulares que pueden dar explicación a la activación inmunológica, esto debido a las complejas interacciones existentes entre el virus y el sistema inmunológico (Paiardini y Müller-Trutwin, 2013). La pérdida de la integridad del GALT, ocurrida durante la fase aguda de la infección, y la subsecuente translocación de productos bacterianos (peptidoglicanos, ácidos lipoteicoicos, LPS, flagelina, DNA ribosomal) desde el lumen intestinal hasta la circulación sistémica, son factores con gran relevancia en el desencadenamiento de la activación inmunológica e inflamación crónica. Lo anterior debido a que, tras su reconocimiento por TLRs de macrófagos, monocitos y PDC, los productos bacterianos desencadenan la producción de citocinas proinflamatorias, entre ellas IL-1 β , IL-6, TNF- α e interferones de tipo I, tales como IFN- α e IFN- β , hecho que desemboca en el estado de activación inmunológica sistémica e inflamación persistente (Deeks *et al.*, 2013; Sokoya *et al.*, 2017). La activación inmunológica asociada a VIH se caracteriza por un incremento sistémico de mediadores proinflamatorios: TNF- α , IFN- α , IL-2 e IL-8, además de células T reguladoras disfuncionales (T_{regs}); circunstancias que retroalimentan el estado inflamatorio indefinido (Deeks *et al.*, 2013; Mogensen *et al.*, 2010; Paiardini y Müller-Trutwin, 2013; Sokoya *et al.*, 2017; Sereti y Atfield, 2016).

La gran mayoría de los estudios ligados a la activación inmunológica se han realizado en sangre gracias a su fácil accesibilidad. En tejidos y mucosas, la activación inmunológica se caracteriza por un cambio radical en el perfil inmunológico probablemente debido a la gran expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias, y a la modificación en los receptores de migración en las células (Paiardini y Müller-Trutwin, 2013).

En los pulmones, específicamente, el cambio en el perfil inmunológico se refleja tanto en el tracto respiratorio superior como en el inferior. En la mucosa respiratoria superior el VIH induce alteraciones tanto en la eficiencia de la acción mucociliar del epitelio como en las propiedades defensivas de algunas moléculas solubles, entre ellas las α -defensinas. En el tracto inferior las respuestas inmunológicas innato-adaptativas también se ven modificadas de forma negativa (Beck, 2005; Crothers *et al.*, 2011; Shellito, 2004). Durante la etapa infectiva agudo-crónica, las personas con VIH presentan números altos de células T CD8⁺ citotóxicas en el intersticio y espacios alveolares, mismas que secretan grandes cantidades de

IFN- γ , citocina clave en la activación de las funciones efectoras de macrófagos. No obstante, al ser los macrófagos y células T (CD4⁺/CD8⁺) susceptibles a la infección por el virus, hacen de los pulmones uno de los reservorios virales más importantes del hospedero (Beck, 2005; Costiniuk y Jenabian, 2014; Crothers *et al.*, 2011; Koppensteiner *et al.*, 2012; Twigg III *et al.*, 2008). Como consecuencia, los macrófagos alveolares presentan deficiencias en el reconocimiento de patógenos y alteraciones en sus funciones inmunológicas, mismas que se reflejan en la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IFN- α) que potencian la proliferación de células T y, por ende, la replicación viral en la zona pulmonar (Beck, 2005; Crothers *et al.*, 2011; Shellito, 2004).

La sobreexpresión de citocinas proinflamatorias por parte de macrófagos y células T, así como el reclutamiento de los neutrófilos hacia los alveolos, son eventos que podrían tener un impacto positivo en la activación inmunológica y facilitar el desarrollo de comorbilidades asociadas a SIDA (Hensley-McBain y Klatt, 2018).

7.1 CD163s y CD143s como marcadores de activación inmunológica e inflamación crónica

Actualmente, la activación de monocitos y macrófagos tisulares se reconoce cada vez más como un importante mediador de la morbilidad y mortalidad asociadas al SIDA. Los marcadores de inflamación solubles (CD163s y CD14s) desempeñan un papel relevante en este proceso (Deeks *et al.*, 2013; Utay y Hunt, 2016).

CD163 es el receptor carroñero de hemoglobina (HbSR) que se expresa estrictamente en la superficie membranal de monocitos/macrófagos, cuya función es la absorción de hemoglobina/haptoglobina liberada en el plasma durante procesos fisiológicos o patológicos de hemólisis. Además de este papel metabólico, se reporta que diferentes ligandos bacterianos y virales tienen afinidad a este receptor, entre ellos el LPS (Deeks *et al.*, 2013; Møller, 2012). En respuesta a numerosos estímulos inflamatorios, el receptor CD163 es liberado en su forma soluble (CD163s), cuyas altas concentraciones en plasma reflejan una gran actividad de los macrófagos, así como procesos inflamatorios crónicos y agudos en relación a un amplio espectro de enfermedades (Etzerodt y Moestrup, 2013). En condiciones normales, CD163 se expresa en la gran mayoría de subpoblaciones de macrófagos tisulares maduros (Fabriek, *et al.*, 2005), en comparación con los monocitos circulantes, donde esta

expresión es menor (Utay y Hunt, 2016). Sin embargo, durante procesos inflamatorios como los inducidos por el VIH, la escisión en grandes cantidades de su forma soluble, CD163s, es un factor indicativo de inflamación en el tejido subyacente (Fabriek, *et al.*, 2005). Lo anterior sugiere que el biomarcador CD163s podría desempeñar un papel importante en la inflamación específica de tejidos tras una infección por VIH (Utay y Hunt, 2016).

Por su parte, CD14 es un marcador de diferenciación mieloide presente en monocitos circulantes y macrófagos tisulares (no expresado en macrófagos del GALT). Junto al TLR4, es un correceptor membranal anclado con gluco-fosfatidilinositol (GPI) de unión a LPS, componente de la pared celular en bacterias gram negativas (Deeks *et al.*, 2013; Sandler *et al.*, 2011). Tras la unión CD14 con LPS se produce la escisión y liberación sistémica de una de sus dos isoformas solubles (CD14s). Niveles altos de CD14s en plasma son un reflejo de la bioactividad y exposición sistémica al LPS. En personas VIH⁺, dicha exposición podría ser el resultado de una disbiosis intestinal y consecuente translocación bacteriana producida por el fenómeno de inflamación crónica persistente. Por lo anterior, CD14s es un elemento clave en la activación de monocitos/macrófagos tisulares, además de un indicativo de la progresión infectiva del VIH (Sokoya *et al.*, 2017; Shive, *et al.*, 2015). Hoy en día, los marcadores de inflamación CD163s y CD14s se encuentran estrechamente relacionados con anomalías pulmonares en pacientes con VIH (Head *et al.*, 2019).

8 *Microorganismos oportunistas en la infección por el VIH: coinfección VIH-Pneumocystis*

Pneumocystis jirovecii (antes denominado *Pneumocystis carinii*) es el hongo oportunista causante de neumonía (*Pneumocystis neumonía*; PCP) en humanos. Al igual que otros patógenos oportunistas, *P. jirovecii* ocasiona enfermedades en individuos inmunocomprometidos, particularmente en aquellos con el VIH (Kelly y Shellito, 2010). Durante los últimos 30 años, la pandemia del VIH incrementó notablemente la prevalencia de la PCP, que es una de sus complicaciones mayormente asociadas (Guo *et al.*, 2014).

En humanos, *P. jirovecii* tiene un tropismo por la superficie alveolar, en donde probablemente se nutre de líquido surfactante y otras células alveolares (Cortés-Télles *et al.*, 2011); su transmisión ocurre de persona a persona a través de la vía aérea (Truong y Ashurst, 2019). Basándose en su morfología, su ciclo de vida se conforma por 1) forma trófica:

mononuclear y de pared delgada (1 a 8 μm), predominante en la infección activa del espacio alveolar. Se ancla a los neumocitos tipo I y está caracterizada por su reproducción asexual; 2) prequiste o fase intermediaria de la reproducción sexual: posee una forma más alargada y esférica que la forma trófica (~ 4 a 8 μm), y 3) quiste o asca de esporas: caracterizada por una pared celular gruesa con una membrana externa (4 a 8 μm). Típicamente, cada quiste contiene de 2 a 8 esporas (~ 1 μm). Tras madurar, las formas tróficas juveniles son liberadas del quiste maduro (Kelly y Shellito, 2010; Skalski *et al.*, 2015). Tras su infección, la adherencia de *P. jirovecii* al epitelio alveolar desencadena respuestas inflamatorias que resultan en la quimiotaxis de macrófagos alveolares, neutrófilos y células T CD4⁺. No obstante, la persistencia fúngica induce una respuesta inflamatoria incontrolada que culmina en daño pulmonar y en un intercambio gaseoso deficiente, mismo que se refleja en el desarrollo de hipoxia y, en casos graves, fallo respiratorio agudo (Cortés-Télles *et al.*, 2011; Truong y Ashurst, 2019).

En pacientes con VIH, la PCP se describe como una enfermedad definitoria del SIDA (<200 células T CD4⁺ por mm³ de sangre). Actualmente, pese a que la tasa infectiva va en disminución progresiva, el TARc y la profilaxis primaria tan sólo retrasan la infección de *P. jirovecii*, no la erradican (Steele *et al.*, 2005). En países sin acceso universal al TAR, la PCP todavía es causa significativa de mortalidad y morbilidad tras una infección por el VIH (Cortés-Télles *et al.*, 2011). Clínicamente, las personas con una coinfección VIH-PCP se caracterizan por un cuadro sintomático compuesto por disnea progresiva, tos productiva o no de esputo claro, malestar y fiebre baja (Kelly y Shellito, 2010). Se estima que hasta un 75% de pacientes en fase de SIDA podrían desarrollar PCP (Cortés-Télles *et al.*, 2011).

9 Respuesta inmunológica durante una coinfección VIH-PCP: papel de los neutrófilos alveolares y células afines

Debido al tropismo alveolar que presenta *P. jirovecii*, los macrófagos alveolares son la primera línea de defensa en el control y prevención de la infección de este microorganismo. Su importancia radica en la habilidad de eliminar tanto las formas tróficas como quísticas a través del reconocimiento de PAMPs en la superficie del patógeno (Kelly y Shellito, 2010). No obstante, en una coinfección VIH-PCP, las funciones efectoras de los macrófagos se han visto en deterioro. Koziel y colaboradores (Koziel *et al.*, 1998), reportaron macrófagos

alveolares con una actividad fagocítica reducida en personas VIH⁺, en comparación con la observada en individuos sanos, misma que se relacionó con bajos niveles en la producción de receptores de manosa. La disminución en este receptor podría ligarse a la infección por el VIH, hecho que conduciría a una persistencia fúngica alta, y por ende, a una incidencia elevada de PCP en personas VIH⁺ (Steele *et al.*, 2005). Alteraciones en las funciones fagocíticas y efectoras de los macrófagos alveolares podrían reflejarse en el deterioro o potenciamiento del reclutamiento de neutrófilos al espacio alveolar en personas con esta coinfección.

Tal como se mencionó en el apartado 7 de la Introducción, el estado de inflamación crónica, inducido en parte por la gran actividad funcional de los macrófagos alveolares y la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias (entre ellas IL-8) en respuesta a LPS y otros estímulos antigénicos, es un factor que excacerba la disregulación del perfil inmunológico pulmonar (Costiniuk y Jenabian, 2014; Sokoya *et al.*, 2017). Dicha disregulación inmunológica podría definir la calidad y eficacia del reclutamiento de neutrófilos al espacio alveolar en personas VIH⁺PCP⁺. En este ámbito, la literatura científica ha reportado gran abundancia de neutrófilos en muestras de LBA de personas inmunocomprometidas (asociadas a VIH) y con una coinfección por PCP. Esta información sugiere que el estado de inmunodeficiencia, aunado a la inflamación pulmonar persistente ligada a la sobreexpresión de mediadores inflamatorios, son sinónimo de un incremento en el recuento de neutrófilos alveolares (Kelly y Shellito, 2010; Steele *et al.*, 2005).

Uno de los primeros estudios en este ámbito es el realizado por Jensen y colaboradores en 1991 (Jensen *et al.*, 1991), quienes reportaron que la colonización pulmonar de *P. jirovecii* en personas en fase de SIDA está caracterizada por un alto influjo de neutrófilos al espacio alveolar, además de un elevado número de células T CD8⁺. Aunque retrospectivo, este estudio correlaciona la cuantificación de neutrófilos con la función pulmonar y la gravedad clínica de *P. jirovecii* en pacientes VIH⁺ (Steele *et al.*, 2005). En contraste, uno de los pocos estudios que refutan esta correlación es el elaborado por Limper y colaboradores (Limper *et al.*, 1989), quienes reportaron, en muestras de LBA, un número elevado de neutrófilos alveolares en pacientes inmunocomprometidos (no asociados a VIH), así como niveles

reducidos de este tipo celular en pacientes VIH⁺PCP⁺. En su mayoría, los estudios actuales inmersos en este ámbito concuerdan con lo reportado por Jensen y colaboradores.

De forma importante, diferencias en el microambiente de citocinas son factores que influyen el perfil inmunológico pulmonar (Costiniuk y Jenabian, 2014). Por ejemplo, el estudio realizado por Benfield y colaboradores (Benfield, *et al.*, 1995) señala que el recuento de neutrófilos en el espacio alveolar se halla estrechamente en relación con los niveles sistémicos de IL-8, potente quimioatrayente de neutrófilos. Adicionalmente, estudios reportan que en respuesta a *P. jirovecii*, los neumocitos tipo I (blanco principal de *P. jirovecii*) son potenciales productores de CXCL8 (IL-8) y CCL2, factores que facilitan el reclutamiento de neutrófilos y monocitos/células T al espacio alveolar (Kelly y Shellito, 2010; Martin y Frevert, 2005; Norris *et al.*, 2006; Steele *et al.*, 2005).

Las funciones efectoras de los neutrófilos alveolares durante una coinfección VIH-PCP han sido poco estudiadas. Sin embargo, se cree que podrían desempeñar un papel potencialmente negativo. Algunos estudios reportan deficiencias en las funciones efectoras de este tipo celular, entre ellas, la disminución y deterioro en la producción de ROS, así como el funcionamiento anormal en la fagocitosis dependiente de anticuerpos (Steele *et al.*, 2005). A pesar de los avances científicos, estas investigaciones son escasas y la gran mayoría de ellas se elaboraron en modelos murinos, cuyos resultados suelen extrapolarse a la dinámica pulmonar humana.

10 Otros marcadores de activación asociados a neutrófilos: CD13, CD66b, CD11b y CD63

Con relación a los neutrófilos, el análisis de la expresión de diversos marcadores funcionales asociados a ellos es imprescindible para el entendimiento de los procesos biológicos involucrados en el reclutamiento de estas células durante un proceso inflamatorio. En esta investigación incluimos cuatro importantes marcadores de superficie celular (CD13, CD66b, CD11b y CD63) asociados a procesos efectoras como son la activación celular, la adhesión y la granulación de componentes antimicrobianos. La evaluación de la expresión de estos marcadores en LBA de personas con VIH y neumonía por PCP podría otorgar información clave sobre la dinámica de reclutamiento de neutrófilos bajo condiciones biológicas específicas.

CD13 (Aminopeptidasa N): marcador de superficie celular presente en neutrófilos humanos; se ha reconocido como un importante elemento regulador negativo en el proceso resolutorio inflamatorio a través de inhibición apoptótica de neutrófilos por la vía TNFR I y II - TNF α (Cowburn *et al.*, 2005; Fiddler *et al.*, 2016). La inhibición de esta proteína superficial induce un aumento significativo en la apoptosis de neutrófilos inducida por agonistas inflamatorios como TNF- α (Chenyang *et al.*, 2020).

CD66b: glicoproteína de membrana anclada con glicosilfofatidilinositol (GPI) expresada débilmente en neutrófilos inactivos y que bajo condiciones inflamatorias su expresión se ve en aumento (Therrien *et al.*, 2018). Se cataloga como un importante marcador de activación de granulocitos, inmerso en diversos procesos efectores como son la adhesión a las células endoteliales, degranulación y el aumento en la producción de ROS (Opasawatchai *et al.*, 2019).

CD11b (β 2-integrina): proteína integral de membrana cuya función primordial es la adhesión celular; desempeña un papel importante en la migración de neutrófilos y monocitos a los sitios inflamatorios (O'Hare *et al.*, 2015). Se puede acoplar con la β -integrina CD18 y formar un heterodímero complejo de migración. El aumento en la expresión membranal del complejo CD11b/CD18 es la base para una mayor adhesión celular, tras la activación celular inducida bajo condiciones inflamatorias (Abdel-Salam y Ebaid, 2014).

CD63: en neutrófilos, CD63 es una proteína integral de la membrana de los gránulos azurófilos citoplasmáticos que se transloca a la membrana celular a través de la vía de exocitosis bajo condiciones específicas inflamatorias. Por este motivo es reconocido como un importante marcador de degranulación en neutrófilos (Eichelberger *et al.*, 2019; Skubitz *et al.*, 2000).

Justificación

Hasta ahora, la presencia de los marcadores solubles CD163s y CD14s en plasma es un factor asociado a la progresión en la enfermedad crónica producida por el VIH. Lo anterior, debido a que ambos marcadores son liberados por macrófagos en respuesta a estímulos antigénicos durante el estado de inflamación crónica producido por la infección. La activación de macrófagos induce la liberación de citocinas clave en el reclutamiento de otras células leucocitarias al sitio inflamatorio, entre ellas los neutrófilos, células clave en la eliminación de patógenos oportunistas como los hongos. En una coinfección VIH-PCP, la inflamación pulmonar es característica debido al tropismo alveolar infectivo de *P. jirovecci*, por lo que el reclutamiento de neutrófilos, que hasta ahora ha sido poco descrito en lavado bronco-alveolar, podría generar información relevante en la prognosis de la enfermedad y el entendimiento del deterioro pulmonar inducidos durante una coinfección de esta naturaleza. Asimismo, se desconoce si el uso de tratamiento antirretroviral durante la coinfección VIH-PCP podría modular de forma más eficiente el reclutamiento de neutrófilos a la zona alveolar, cuyo objetivo sería controlar la infección de *P. jirovecci*. Con el presente estudio se pretende aportar información sobre la posible relación existente entre los niveles de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s, y las frecuencias de neutrófilos en muestras de lavado bronco-alveolar de personas VIH⁺PCP⁺. Además de definir si existen diferencias entre dicha relación en personas sin VIH y personas con VIH y tratamiento antirretroviral.

Hipótesis

El estado de inflamación crónica producido por el VIH resultará en concentraciones elevadas de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s, en conjunto con un número reducido de neutrófilos en muestras de lavado bronco-alveolar de personas VIH⁺PCP⁺.

Objetivos

Objetivo general

Definir si existe relación alguna entre las frecuencias de neutrófilos con las concentraciones de los marcadores de inflamación crónica, CD163s y CD14s, en muestras de lavado bronco-alveolar de personas VIH⁺PCP⁺.

Objetivos particulares

Definir si existen diferencias entre las frecuencias de neutrófilos de personas VIH_{neg}, VIH⁺PCP⁺ y VIH⁺PCP⁺/TAR.

Definir si existen diferencias entre los niveles de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en plasma y LBA de personas VIH_{neg}, VIH⁺PCP⁺ y VIH⁺PCP⁺/TAR.

Métodología

El presente estudio se realizó en el Centro de Investigación en Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) “Ismael Cosío Villegas”, en la Ciudad de México. Se utilizaron muestras biológicas de sobrenadante de lavado bronco-alveolar (LBA) y de plasma sanguíneo pertenecientes a personas con VIH. El uso de muestras y realización de experimentos fueron revisados y aprobados por los Comités de Investigación y el de Ética en Investigación del INER (clave asignada B08-16).

1 Características de la cohorte de estudio

Se catalogó a los participantes del estudio dentro de tres grupos de estudio o poblaciones distintas: muestras de personas sin VIH (VIH_{neg}/grupo control) (n=7), muestras de personas con VIH y una infección por el microorganismo oportunista pulmonar *P. jirovecci* (VIH⁺PCP⁺) (n=16), y muestras de personas con VIH e infección por *P. jirovecci* que se encuentran bajo el suministro de tratamiento antirretroviral: TAR (VIH⁺PCP⁺/TAR) (n=4). Respecto al grupo VIH⁺PCP⁺/TAR, la toma de muestra de tres de los cuatro pacientes se llevó a cabo dentro de un periodo de 4 a 5 años después de haber iniciado con el TARc; para el último caso la toma de muestra se realizó 2 meses después de haber iniciado con el TARc. El antiviral administrado en los primeros tres casos fue Atripla (Efavirenz/Emtricitabina/Tenofovir), mientras que para el último caso se administró una combinación de Kaletra (Lopinavir/Ritonavir) y Truvada (Tenofovir disoproxil). En cuanto al grupo VIH⁺PCP⁺, la toma de muestra para todas las personas se llevó a cabo entre 2016 y 2018. En común, todas las personas de este grupo se encontraron en etapas tardías de la infección por el VIH al momento de la toma de muestra. Las características epidemiológicas de las personas involucradas en este estudio se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características epidemiológicas de los participantes

	VIH_{neg} (n=7)	VIH⁺/PCP⁺ (n=16)	VIH⁺TAR/PCP⁺ (n=4)	<i>p</i> VIH_{neg} vs. VIH⁺/PCP⁺	<i>p</i> VIH_{neg} vs. VIH⁺TAR/PCP⁺	<i>p</i> VIH⁺/PCP⁺ vs. VIH⁺PCP⁺/TAR
Sexo (Femenino: Masculino)	(1:2)	(0:1)	(1:3)	<i>na</i>	<i>na</i>	<i>na</i>
Edad (años) Mediana (min-max)	42 (23-48)	42 (24-54)	35.5 (30-40)	0.523	0.527	0.140
CD4⁺ (%) Mediana (min-max)	43.5 (31-54)	4.5 (1-25)	10 (3-20)	<0.0001*	0.0095*	0.321
CD8⁺ (%) Mediana (min-max)	24 (15-32)	59 (12-84)	66.5 (53-72)	0.0007*	0.0095*	0.538
CD4:CD8 Mediana (min-max)	1.70 (0.97-3.49)	0.095 (0.02-0.56)	0.17 (0.05-0.27)	<0.0001*	0.0095*	0.398
log CV VIH Mediana (min-max)	0	5.36 (4.21-6.18)	2.71 (2.28-4.84)	<i>na</i>	<i>na</i>	0.0206*

VIH_{neg}: personas sin VIH; **VIH⁺PCP⁺**: personas con VIH y neumonía por *P. jirovecci*; **VIH⁺TAR/PCP⁺**: personas con VIH con TAR y neumonía por *P. jirovecci*; CV: carga viral.

Se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann Withney para encontrar diferencias significativas entre grupos. *na*: no aplica. Se consideró significancia estadística (*) al ser $p < 0.05$.

2 Obtención y procesamiento de las muestras de sangre periférica para la obtención de plasma sanguíneo y de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Como parte del protocolo B08-16, se recibieron 2 tubos ACD (citrato trisódico, ácido cítrico y dextrosa) por participante, con 8 ml de sangre periférica obtenida por venopunción. Para el procesamiento de las muestras se centrifugó cada uno de los tubos ACD a una velocidad de 2500 rpm durante 15 minutos (aceleración: 9, desaceleración: 1). Se recolectó el plasma sanguíneo en tubos Eppendorf™ con capacidad para 1.5 ml (0.5 ml del plasma en cada uno). Los tubos con plasma se etiquetaron y almacenaron a -80°C dentro del laboratorio de bioseguridad nivel III (BSL3) del CIENI para su uso posterior. El plasma sanguíneo resultante de este procedimiento se utilizó como referencia para realizar un ajuste en la sección de resultados, mismo que posteriormente se mencionará a detalle. Luego, como parte rutinaria, se llevó a cabo la obtención de PBMC mediante la técnica de separación por gradiente de densidad con Ficoll - Lymphoprep™ (modificado de [Stem Cell Technologies, 2020](#)).

Para este procedimiento se pasó el resto de la sangre de los tubos ACD a un tubo de 50 ml y se diluyó en una proporción 1:2 con medio HBSS (Hank's Buffered Saline Solution^{Lonza}); luego se agregó la sangre diluida por las paredes de otro tubo de 50 ml con Ficoll, en una proporción 1:3. Se centrifugó el tubo a 1500 rpm durante 30 minutos (aceleración: 6, desaceleración: 3). Se desechó la fase superior y se recuperó el anillo celular que contiene las PBMC en un tubo con 10 ml de medio HBSS, que luego se llevó a 50 ml con el mismo medio. Se centrifugó el tubo a 1200 rpm durante 15 minutos (aceleración y desaceleración: 9). Se decantó el sobrenadante y se resuspendieron las PBMC en 10 ml de buffer de lisis de eritrocitos durante 10 minutos a temperatura ambiente; luego se agregó medio HBSS hasta los 50 ml. Se centrifugó el tubo a 1200 rpm durante 15 minutos (aceleración y desaceleración: 9). Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de PBMC en 20 ml de medio HBSS. Finalmente se realizó la cuantificación de células (Countess^{Invitrogen}), se congelaron y criopreservaron a -80°C en un ultracongelador RevcoTM dentro del BSL3 del CIENI para su uso posterior. Todo este proceso se repitió para cada una de las muestras utilizadas en este proyecto de investigación.

3 Obtención y procesamiento de las muestras de lavado bronco-alveolar (LBA)

Para este estudio, el servicio de broncoscopia del INER otorgó tres jeringas con capacidad de 50 ml (J1, J2 y J3) con una muestra representativa de lavado bronco-alveolar perteneciente a cada uno de los participantes del protocolo B08-16. El contenido de las jeringas J2 y J3 se transfirió a un frasco con capacidad de 250 ml para homogeneizarse; luego se transfirió a dos tubos con capacidad para 50 ml. El contenido de la jeringa J1 se procesó de forma individual; se transfirió directamente el contenido de la jeringa a un tubo de 50 ml (tubo J1). Los tubos de 50 ml se centrifugaron a 2500 rpm durante 13 minutos (aceleración: 9, desaceleración: 6). Se hicieron alícuotas de 1 ml del sobrenadante resultante de la centrifugación en 15 tubos EppendorfTM con capacidad para 1.5 ml, mientras que el botón celular resultante de los tres tubos se resuspendió por separado en 5 ml de medio PBS (*Phosphate-buffered saline*). Luego se contaron (Countess^{Invitrogen}) y tiñeron las células para su análisis posterior en el citómetro de flujo LRSFortessa^{BD}. Los 15 tubos EppendorfTM fueron debidamente etiquetados y almacenados a -80°C en un ultracongelador RevcoTM dentro del BSL3 del CIENI para su uso posterior.

4 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA): CD163s, CD14s, urea

Para el presente estudio se desarrollaron tres inmunoensayos tipo ELISA para la obtención de las concentraciones de los marcadores de activación inmunológica e inflamación crónica, CD163s y CD14s, presentes en plasma y en los sobrenadantes de lavado bronco-alveolar (LBA). Asimismo, al tomar en cuenta que el fluido bronco-alveolar es una dilución del líquido del revestimiento bronco-alveolar (debido a que el LBA es el resultado de la instilación de una solución salina), también se determinaron las concentraciones de urea en plasma y en LBA para corregir y obtener las concentraciones reales de CD163s y CD14s presentes en las muestras de LBA, de acuerdo a lo descrito en [Rennard *et al.*, 1985](#) y [Tayman *et al.*, 2011](#). Los procedimientos y técnicas fueron realizados de acuerdo a los manuales de los kits correspondiente a cada analito: Quantikine™ ELISA: Human CD14 Immunoassay – R&D Systems, Inc–; Quantikine™ ELISA: Human CD163 Immunoassay –R&D Systems, Inc–; Urea Assay Kit – Sigma-Aldrich™ –.

ELISA CD163s

Previo el ensayo, las muestras de plasma se diluyeron en el calibrador RD5-24 en un factor 1:50; las muestras de LBA no fueron diluidas exceptuando el último ensayo, donde se diluyeron en un factor 1:2. Cada una de las muestras, estándares y control, tuvieron un duplicado. Se realizaron tres ensayos para la detección de CD163s en todas las muestras usadas en esta investigación.

A la microplaca se agregaron 50 µl de estándares, control y de cada una las muestras a los pozos correspondientes; se cubrió y dejó incubar durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se deshechó el contenido de la misma y se lavó manualmente cuatro veces con buffer de lavado. Luego se agregaron 200 µl del conjugado Human CD163 (anticuerpos monoclonales específicos a CD163 humano) a cada pozo. La microplaca se cubrió y dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente; después se repitió el proceso de lavado. Tras la incubación se añadieron 200 µl de la solución sustrato (peróxido de hidrógeno + tetrametil bencidina) a cada pozo. La microplaca se cubrió y dejó incubar por media hora a temperatura ambiente, protegida de la incidencia de luz. Luego se añadieron 50 µl de la solución para detener la reacción (ácido sulfúrico) a cada pozo, asegurando la resuspensión. Finalmente se determinó la densidad óptica de las muestras en un

espectrofotómetro a 540 nm y 570 nm, obteniéndose la delta (540 nm a 570 nm) para una mayor precisión de lectura.

ELISA CD14s

Previo el ensayo, las muestras de plasma se diluyeron en el calibrador RD5P en un factor 1:500; las muestras de LBA no fueron diluidas exceptuando el último ensayo, donde se diluyeron en un factor 1:2. Cada una de las muestras, estándares y control, tuvieron un duplicado. Se realizaron tres ensayos para la detección de CD14s en todas las muestras usadas en esta investigación.

A la microplaca se agregaron 100 µl de estándares, control y de cada una las muestras a los pozos correspondientes; se cubrió y dejó incubar durante tres horas a temperatura ambiente. Tras la incubación se deshechó el contenido de la misma y se lavó manualmente cuatro veces con buffer de lavado. Luego se agregaron 200 µl del conjugado Human CD14 (anticuerpos policlonales específicos a CD14 humano) a cada pozo. La microplaca se cubrió y dejó incubar por una hora a temperatura ambiente; después se repitió el proceso de lavado. Tras la incubación se añadieron 200 µl de la solución sustrato (peróxido de hidrógeno + tetrametil bencidina) a cada pozo; se cubrió y dejó incubar por media hora a temperatura ambiente, protegida de la luz. Se añadieron 50 µl de la solución para detener la reacción (ácido sulfúrico) a cada pozo, asegurando la resuspensión. Finalmente se determinó la densidad óptica de las muestras en un espectrofotómetro a 450 nm y 570 nm, obteniéndose la delta (450 nm a 570 nm) para una mayor precisión de lectura.

ELISA Urea

Previo el ensayo, las muestras de plasma se diluyeron con buffer de ensayo para urea en un factor 1:1000, exceptuando el último ensayo, donde hubo muestras que se diluyeron en un factor 1:200; las muestras de LBA no fueron diluidas. Cada una de las muestras, estándares y control contaron con un duplicado. Se realizaron tres ensayos para la detección de urea en todas las muestras usadas en esta investigación.

A la microplaca, se agregaron el blanco (buffer de ensayo para urea) y los estándares a los pozos correspondientes: de forma vertical, 0, 2, 4, 6, 8 y 10 µl de la solución estándar de urea previamente reconstituida, luego, cada conjunto de pozos (duplicados) se llevó a 50

μl con buffer de ensayo para urea. Después se agregaron 10 μl de las muestras a los pozos correspondientes, mismos que se llevaron a 50 μl con buffer de ensayo para urea. Luego se añadieron 50 μl del mix de reacción a todos los pozos, asegurando la resuspensión. Se dejó incubar la microplaca a 37 °C durante 60 minutos, protegiéndola de la incidencia de luz. Finalmente se determinó la densidad óptica de las muestras en un espectrofotómetro a 570 nm.

5 Citometría de flujo

Para este estudio se estructuró un panel de citometría de flujo mutiparamétrica para la identificación de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en muestras de sobrenadante de lavado broncoalveolar. Se utilizaron los anticuerpos anti CD45 (clona HI30^{Biolegend}), CD11b (clona ICRF-44^{Biolegend}), CD86 (clona IT2.2^{Biolegend}), CD80 (clona 2D10^{Biolegend}), CD16 (clona 3G8^{Biolegend}), CD66b (clona G10F5^{BD}), AmCyan (Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit^{Invitrogen}), LIN 2 (CD3: clona SK7^{BD}; CD19: clona SJ25C^{BD}; CD20: clona L27^{BD}; CD14: clona MφP9^{BD}; CD56: clona NCAM16.2^{BD}), MPO (polyclonal^{Biorbyt}), ARGINASA-1 (polyclonal^{R&D}), PD-L1 (clona MIH^{eBioscience}), CD63 (clona H5C6^{BD}), CD33 (clona WM53^{Biolegend}), CD13 (clona WM15^{Biolegend}), y CD15 (clona W6D3^{Biolegend}). El análisis de las células polimorfonucleares se llevó a cabo en un citómetro de flujo LRSFortessa^{BD}. Para el presente estudio se adquirieron todos los eventos disponibles (± 600, 000 células) por muestra adquirida en el citómetro de flujo LRSFortessa^{BD}.

6 Estrategia de análisis

La identificación y análisis de neutrófilos en LBA se llevó a cabo en el software FlowJo (V.10.6.1). Este programa se utilizó para reportar las frecuencias de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ respecto a las células identificadas con el antígeno común leucocitario, CD45⁺. Inicialmente se determinaron los eventos individuales o *singlets*, para los que se utilizó un gráfico FSC-A (área) contra FSC-H (altura). Este gráfico descartó los dobletes de células y permite analizar células únicas. Después se determinó la morfología de las células graficando FSC-A (tamaño) en contra de SSC-A (granularidad). Este gráfico descartó células T y monocitos/macrófagos de los granulocitos polimorfonucleares. Luego se determinó la viabilidad celular, cuyo gráfico, AmCyan en contra de SSC-A (granularidad), descartó las células muertas. Posteriormente, un gráfico con el marcador CD45 en contra de SSC-A (granularidad),

descartó todas aquellas células no leucocitarias (células CD45_{neg}). Luego se identificaron y separaron los granulocitos polimorfonucleares de aquellas células con marcadores de linaje (células T y B, macrófagos/monocitos y células NK), por lo que se utilizó un gráfico en el que se interpuso el marcador LIN2 (CD3/CD19/CD20/CD14/CD56), en contra de SSC-A (granularidad). En el gráfico anterior se seleccionaron todas las células negativas a LIN2. Después, con un gráfico en el que se interpuso CD15 en contra de SSC-A (granularidad), se seleccionaron las células CD15⁺ exclusivamente. Finalmente, se identificó a los neutrófilos polimorfonucleares CD15⁺CD16⁺ al realizarse un gráfico en el que se interpuso el marcador CD16 en contra del marcador CD15. Este último gráfico excluyó a los eosinófilos (**Fig. 9**) (Gustafson *et al.*, 2015).

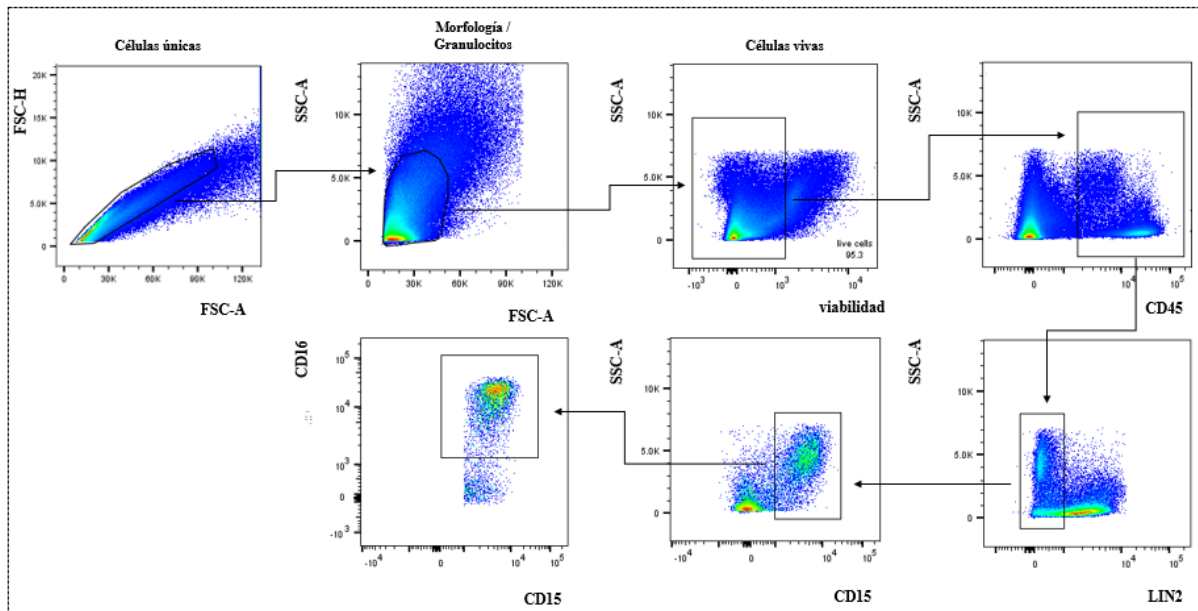


Fig. 9. Ejemplo representativo de la estrategia de análisis fenotípico de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en muestras de lavado bronqueo-alveolar perteneciente a una persona VIH⁺PCP⁺.

Debido a que el número de células de las muestras de LBA no permitió realizar la tinción de controles FMO, se utilizaron controles internos de cada muestra para corroborar la delimitación de las poblaciones de interés, en este caso las células LIN2⁺CD15⁻. Como ejemplo, la **Figura 10** muestra dos histogramas representativos de la expresión de las proteínas CD13 y CD66b en neutrófilos CD15⁺CD16⁺ (color rojo) y en células LIN2⁺CD15⁻ (color azul) (**Fig. 10**).

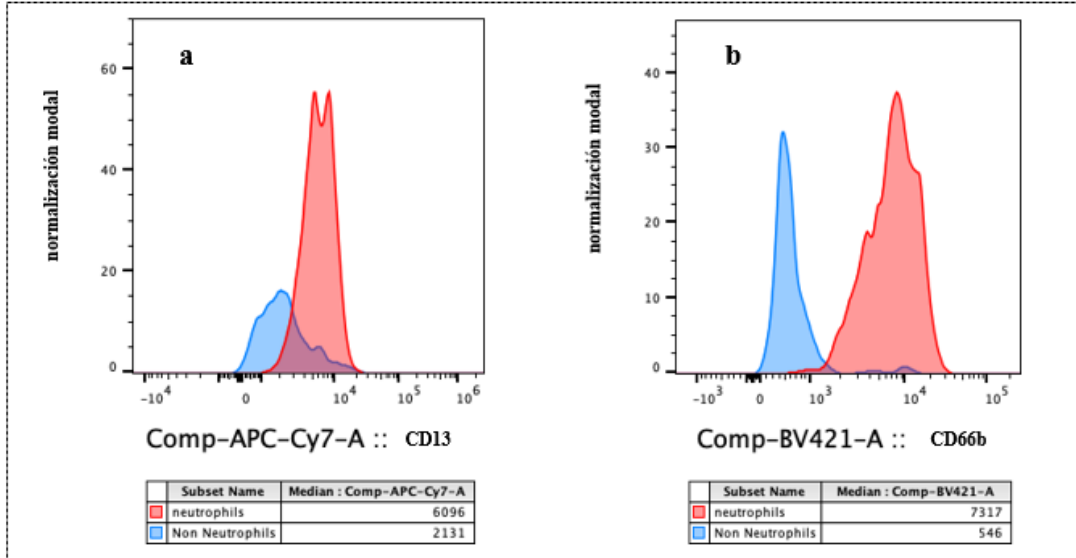


Fig. 10. Histogramas representativos de la expresión de las proteínas CD13 (a) y CD66b (b) en neutrófilos y en células LIN2⁺CD15⁻. El recuadro inferior de cada gráfica muestra el valor de la expresión de la proteína de interés en unidades de fluorescencia media (MFI) para células CD15⁺CD16⁺ (color rojo) y células LIN⁺CD15⁻ (color azul).

De forma complementaria, para corroborar la expresión positiva de las proteínas de interés (CD13, CD66b, CD11b, CD63, arginasa y MPO), se elaboraron gráficas que muestran diferencias en la expresión de proteínas de interés en células CD15⁺CD16⁺ y en otras células LIN2⁺CD15⁻ en gráficas de puntos. De acuerdo a la escala de expresión de las proteínas, tonalidades amarillo-rojas indican una mayor expresión de la proteína superficial de interés en la población CD15⁺CD16⁺ delimitada, mientras que tonalidades verde-azuladas indican una menor expresión de esta proteína (**Fig. 11**).

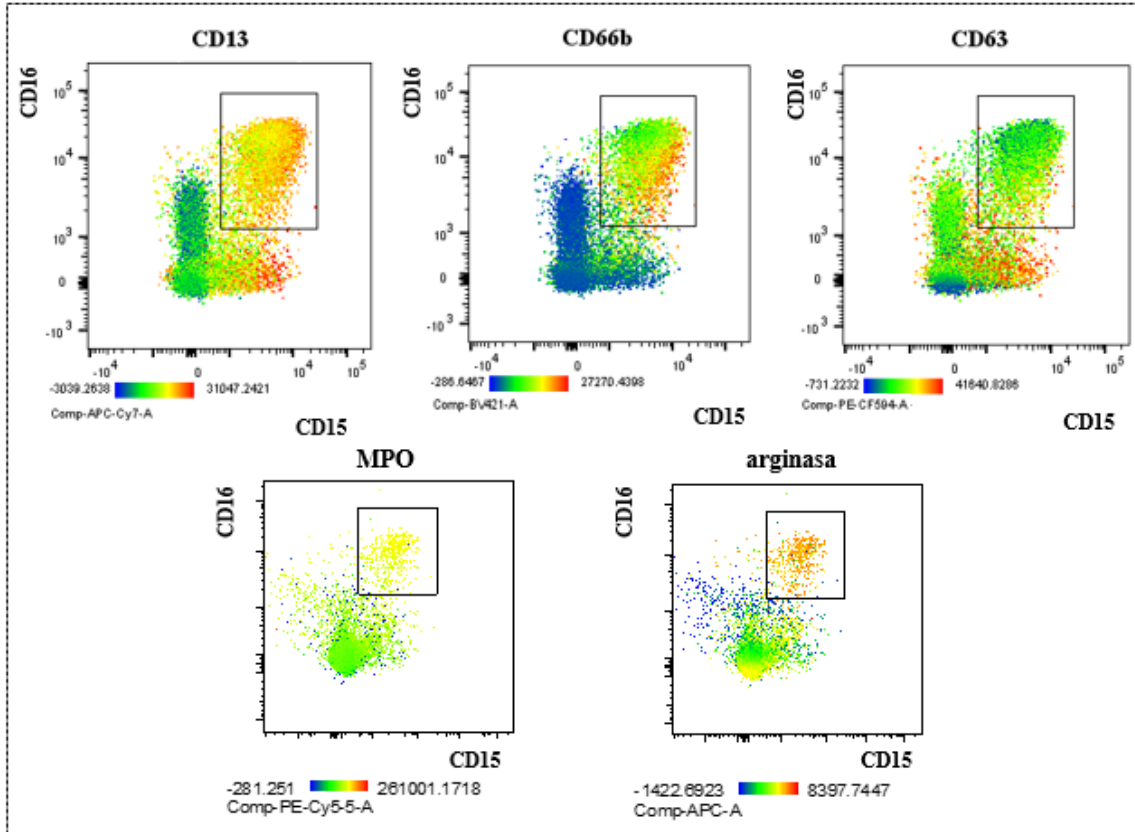


Fig. 11. Gráficas de la expresión de diferentes proteínas en células LIN2. Los neutrófilos fueron identificados como células CD15⁺CD16⁺ (recuadro). La escala de expresión de cada proteína se localiza en la parte inferior de cada gráfica. Tonalidades amarillas-rojas indican una mayor expresión de la proteína.

7 *Análisis estadísticos*

Para establecer los análisis estadísticos utilizados en esta investigación se llevó a cabo una prueba estadística Shapiro-Wilk con el objetivo de determinar el supuesto de distribución normal de las muestras. Al no cumplir con el supuesto de normalidad, se utilizó la prueba estadística no paramétrica U de Mann Witheny para encontrar diferencias significativas entre dos grupos. Adicionalmente, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para encontrar diferencias significativas entre más de dos grupos. Se consideró significancia estadística al ser $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el software GraphPad Prism (v. 8).

Resultados

Características de neutrófilos y factores solubles en LBA de personas con neumonía

1 Características de los neutrófilos alveolares en los grupos de estudio

Con el objetivo de describir y comparar la distribución de los neutrófilos ($CD15^+CD16^+$) presentes en LBA de las personas en los tres grupos de estudio (VIH_{neg} , VIH^+PCP^+ y VIH^+PCP^+/TAR), se compararon las frecuencias de estas células a partir del total de células identificadas con el antígeno común leucocitario $CD45^+$, marcador de casi todas las células hematopoyéticas diferenciadas con excepción de los eritrocitos maduros. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno los tres grupos de estudio ($p=0.583$) probablemente debido a una n pequeña en los grupos VIH_{neg} y VIH^+PCP^+/TAR ($n=7$ y $n=4$, respectivamente), a comparación del grupo con VIH sin tratamiento antirretroviral ($n=16$) (Fig. 12).

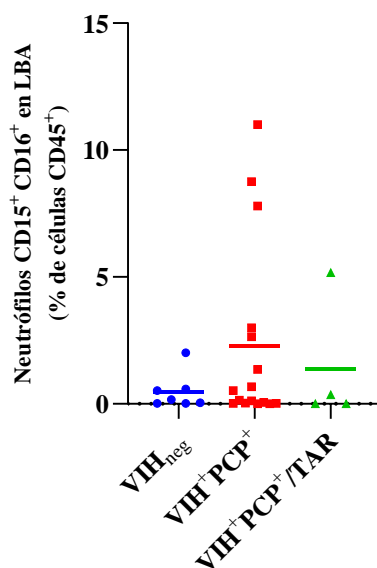


Fig. 12. Frecuencia de neutrófilos $CD15^+CD16^+$ en LBA por grupo de estudio. VIH_{neg} , personas sin VIH – círculos azules; VIH^+PCP^+ , personas con VIH y coinfección con PCP – cuadrados rojos; VIH^+PCP^+/TAR : personas con VIH bajo tratamiento antirretroviral y coinfección PCP – triángulos verdes. Las barras horizontales indican la media de los datos individuales por grupo mientras que los puntos representan valores individuales. Se realizó la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis para la determinación de diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, mientras que para la comparación de dos grupos se realizaron pruebas U de Mann Whitney (no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos).

1.1 Características fenotípicas de los neutrófilos alveolares en los grupos de estudio - MFI

Con el fin de evaluar la funcionalidad de los neutrófilos CD15⁺CD16⁺, se realizó el análisis de la expresión de cuatro marcadores superficiales asociados a diferentes funciones efectoras de los neutrófilos, entre ellas la migración, la adhesión celular y la degranulación de componentes antimicrobianos. A través de la detección de fluorescencia por citometría de flujo, se utilizaron como base de análisis las unidades de fluorescencia media (MFI) de los marcadores elegidos. Se determinó la expresión del marcador CD13, que se ha asociado con la activación de los neutrófilos, de los marcadores CD66b y CD63, asociados a la activación y degranulación celular, así como del marcador de adhesión celular CD11b.

Inicialmente, optamos por analizar y comparar la expresión de cada proteína (determinada por el valor de la MFI) en los tres grupos de estudio. Para la expresión de CD13 se encontraron diferencias significativas a lo largo de los tres grupos de estudio ($p=0.022$). Particularmente, la expresión de este marcador fue mayor en el grupo VIH⁺PCP⁺/TAR⁺ en comparación con el grupo VIH⁺PCP⁺ ($p=0.021$). Además, se observó una tendencia de mayor expresión de CD13 de los grupos VIH⁺PCP⁺ y VIH⁺PCP⁺/TAR⁺ con respecto al grupo VIH_{neg} ($p=0.078$ y $p=0.072$, respectivamente) (**Fig. 13a**). Con relación a la expresión de CD66b, no se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio ($p=0.105$). Sin embargo, se observó una tendencia hacia una mayor expresión de este marcador en las células del grupo VIH⁺PCP⁺ a comparación de las células del grupo VIH_{neg} ($p=0.055$) (**Fig. 13b**). Respecto a la expresión de CD11b, tampoco se encontraron diferencias significativas en los tres grupos de estudio ($p=0.112$). No obstante, se observó una tendencia de mayor expresión de este marcador en el grupo VIH⁺PCP⁺ a comparación del grupo VIH_{neg} ($p=0.065$) (**Fig. 13c**). Finalmente, en la evaluación de la expresión de CD63 no se encontraron diferencias significativas con relación a los tres grupos de estudio ($p=0.646$) (**Fig. 13d**).

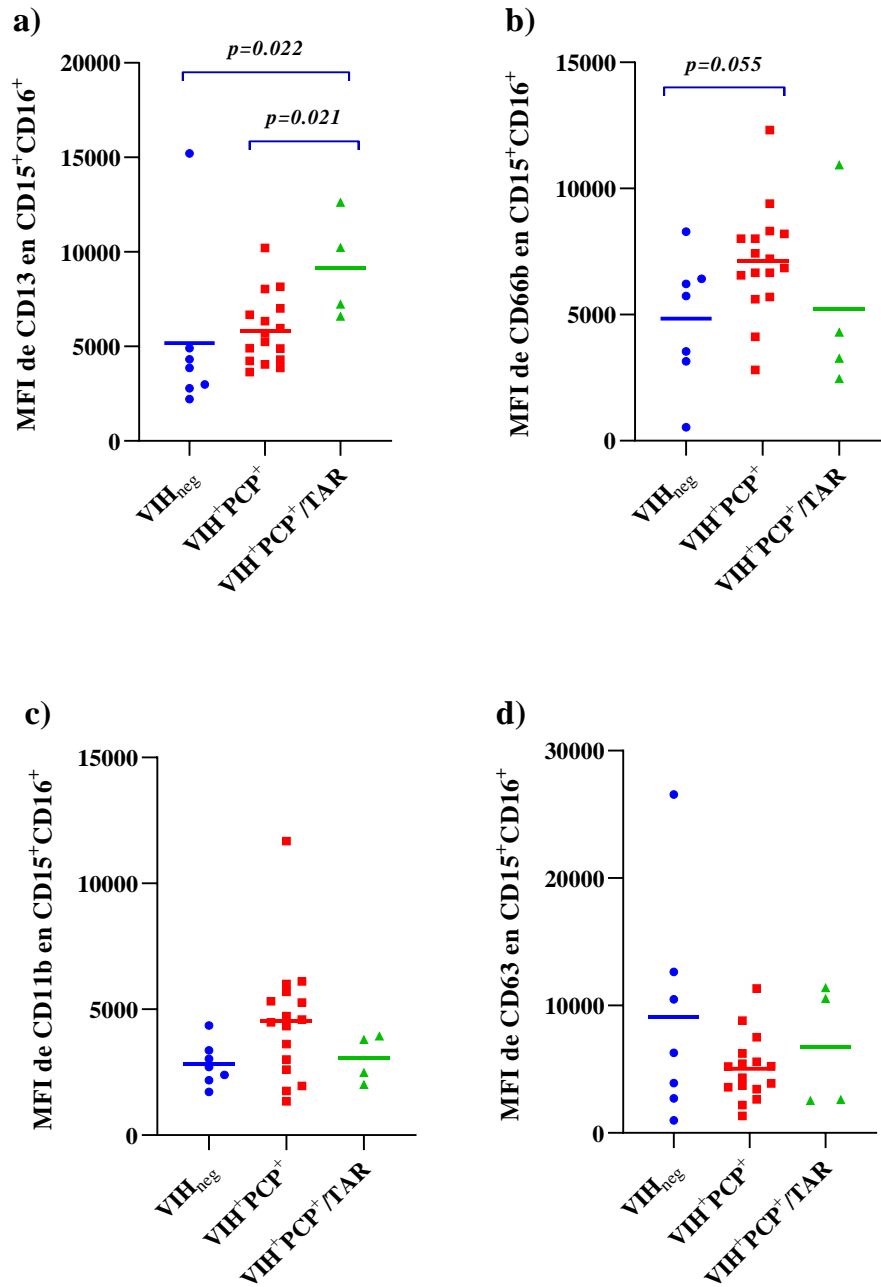


Fig. 13. Expresión de diferentes marcadores de activación en los neutrófilos del LBA por grupo de estudio. a) CD13; b) CD66b, c) CD11b; d) CD63). **VIH_{neg}**, personas sin VIH – círculos azules; **VIH⁺PCP⁺**, personas con VIH y coinfección con PCP – cuadrados rojos. **VIH⁺PCP⁺/TAR**, personas con VIH bajo tratamiento antirretroviral y coinfección PCP – triángulos verdes. Las barras horizontales indican la media de los datos individuales por grupo mientras que los puntos representan valores individuales. Para cada uno de los marcadores se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para la determinación de diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, mientras que para la comparación de dos grupos se realizaron pruebas U de Mann Whitney (sólo se muestran los valores de p significativos en las barras comparativas azules).

2 Marcadores de inflamación CD163s y CD14s en plasma y LBA de personas VIH⁺ con neumonía por PCP⁺

Se sabe que las determinaciones en plasma de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s son un factor predictivo asociado a la progresión hacia la etapa de SIDA. Por tal motivo, optamos por analizar y comparar las concentraciones de ambos marcadores tanto en plasma como en LBA con el objetivo de determinar diferencias significativas. Obtenidas por ELISA, se compararon las concentraciones de las personas VIH⁺PCP⁺ sin tratamiento antirretroviral de nuestra cohorte de estudio. Para ambos marcadores inflamatorios se encontraron concentraciones mayores en plasma a comparación del LBA ($p < 0.0001$) (Figs. 14a y 14b).

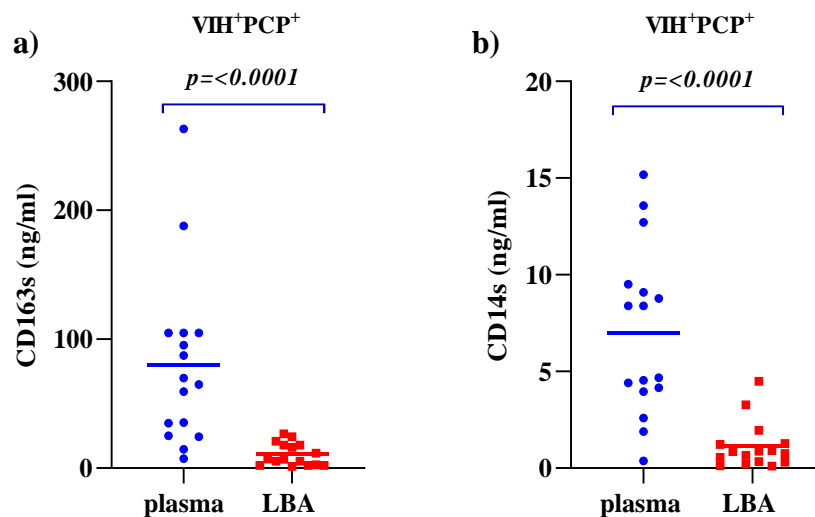


Fig. 14. Comparación de las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en LBA y plasma de personas VIH⁺PCP⁺ obtenidas por ELISA. a) CD163s; b) CD14s. VIH⁺PCP⁺, personas con VIH y coinfección con PCP. Las barras horizontales indican la media de los datos individuales por grupo mientras que los puntos representan valores individuales. Para la determinación de diferencias significativas entre ambos grupos se realizaron pruebas estadísticas U de Mann Whitney (valores de p situados en las barras comparativas azules).

2.1 Concentraciones de CD163s y CD14s como marcadores de inflamación en LBA

A partir del resultado obtenido en el análisis anterior, en el que las concentraciones de CD163s y CD14s son menores en LBA que en plasma, presentamos a partir de ahora solamente análisis en LBA con el objetivo de describir la dinámica del estado de inflamación crónica producido por el VIH en los pulmones. Para lo anterior se analizaron y compararon

las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s (**Fig. 15a**) y CD14s (**Fig. 15b**) presentes en LBA de nuestros grupos de estudio, obtenidas por ELISA. Al igual que en la distribución de los neutrófilos CD15⁺CD16⁺, en este análisis tampoco se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de ambos marcadores, tanto para CD163s ($p=0.701$) como para CD14s ($p=0.172$) en los tres grupos de estudio.

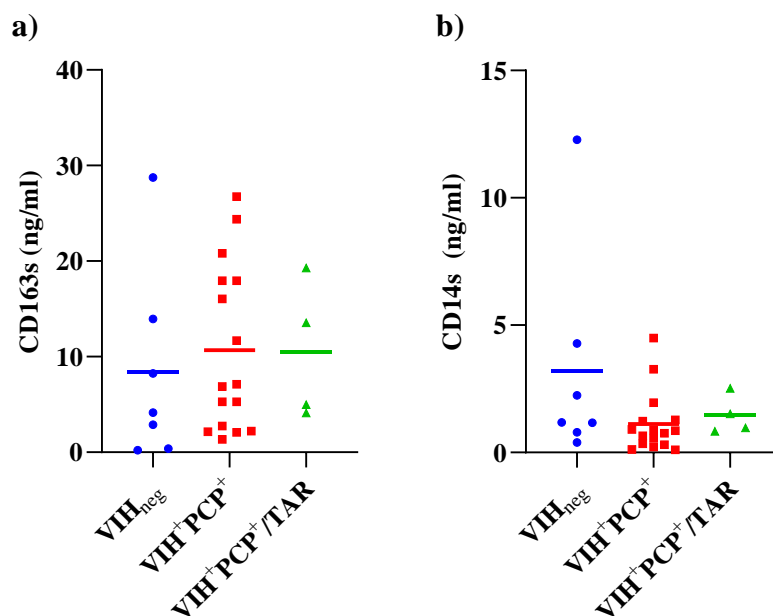


Fig. 15. Concentración de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en LBA por grupo de estudio, obtenida por ELISA. a) CD163s; b) CD14s. VIH_{neg}, personas sin VIH - círculos azules; **VIH⁺PCP⁺**, personas con VIH y coinfección con PCP - cuadrados rojos. **VIH⁺PCP⁺/TAR**, personas con VIH bajo tratamiento antirretroviral y coinfección PCP – triángulos verdes. Las barras horizontales indican la media de los datos individuales por grupo mientras que los puntos representan valores individuales. Para ambos marcadores se realizó la prueba estadística de Kruskal-Wallis para la determinación de diferencias significativas entre los tres grupos de estudio, mientras que para la comparación de dos grupos se realizaron pruebas U de Mann Whitney (no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos para ambos marcadores).

Asociaciones de las frecuencias de neutrófilos en LBA con marcadores clínicos y de la progresión de la enfermedad

Entre los marcadores clínicos más relevantes para llevar a cabo el diagnóstico de la enfermedad producida por el VIH se encuentran las células T CD4⁺ y T CD8⁺ en sangre periférica, y el número de copias virales del VIH en plasma. Por tal motivo, se decidió analizar si existen correlaciones entre dichos marcadores clínicos y las frecuencias de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA de las personas de nuestra cohorte de estudio. Para lo

anterior se usó la prueba del coeficiente de correlación de Spearman (r). Las asociaciones presentes en este estudio no indican ningún tipo de relación directa entre sí. En general, no se encontraron correlaciones entre las frecuencias de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ y los marcadores clínicos e inflamatorios en las muestras de LBA de las personas VIH⁺ de nuestra cohorte de estudio. Los datos utilizados para llevar a cabo estas asociaciones fueron otorgados por la unidad del laboratorio de diagnóstico virológico (LDV) del CIENI.

3 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA con el porcentaje de células T CD4⁺ en sangre de personas VIH⁺ con neumonía por PCP⁺

Debido a su papel en la activación de la respuesta inmunológica adaptativa contra el VIH, el porcentaje de células T CD4⁺ en sangre periférica es un factor clave en el diagnóstico de la enfermedad producida por el virus. Por tal motivo, se realizaron correlaciones estadísticas con el objetivo de corroborar si existe una relación entre el porcentaje de células T CD4⁺ en sangre y la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA de nuestros grupos de estudio. En cuanto al grupo VIH⁺PCP⁺, se encontró una tendencia a una posible correlación positiva entre la frecuencia de los neutrófilos CD15⁺CD16⁺ y el porcentaje de células T CD4⁺ circulantes ($r=0.484$; $p=0.059$) (**Fig. 16a**). Para los grupos VIH_{neg} y VIH⁺PCP⁺/TAR no se encontraron correlaciones entre las frecuencias de los neutrófilos CD15⁺CD16⁺ y el porcentaje de células T CD4⁺ circulantes ($r= -0.571$; $p=0.200$; $r=0.600$; $p=0.417$, respectivamente) (**Figs. 16b y 16c**). Esta información indica que no existe una relación entre la distribución de ambas variables en las personas de estos dos grupos. A continuación, mostramos las gráficas de correlación obtenidas para los tres grupos de estudio.

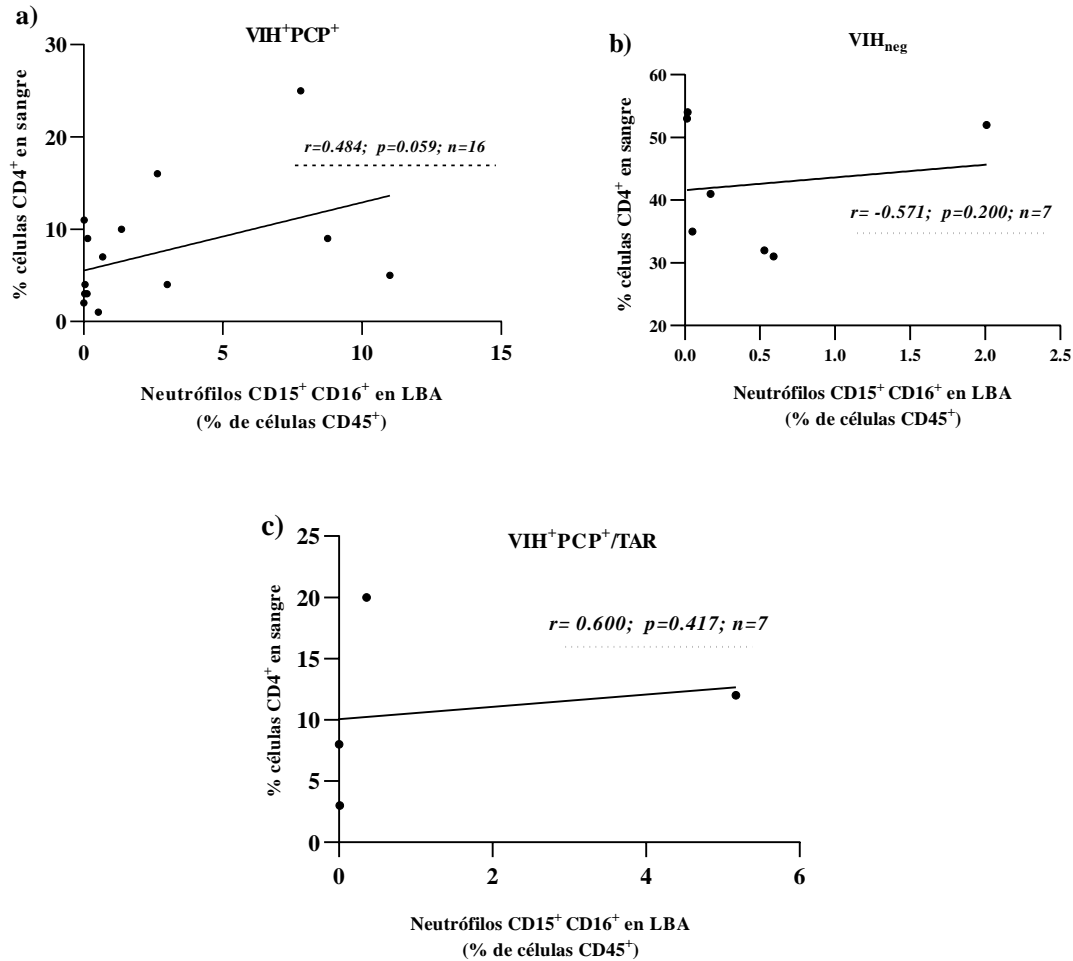


Fig. 16. Correlación entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA y el porcentaje de células T CD4⁺ por μ l de sangre en personas VIH⁺PCP⁺. a) VIH⁺PCP⁺, personas con VIH y coinfección con PCP; b) VIH_{neg}, personas sin VIH; c) VIH⁺PCP⁺/TAR, personas con VIH bajo tratamiento antirretroviral y coinfección PCP. Se realizaron pruebas estadísticas coeficiente de correlación de Spearman.

3.1 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA con el porcentaje de células T CD8⁺ en sangre de personas VIH⁺ con neumonía por PCP⁺

Al ser el porcentaje de células T CD8⁺ un factor clave en el diagnóstico de la enfermedad producida por el VIH, se realizaron correlaciones estadísticas para corroborar si existe una relación entre el porcentaje de células T CD8⁺ en sangre y la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA de las personas de nuestra cohorte de estudio. Para los grupos VIH⁺PCP⁺ ($r= -0.325$; $p=0.217$) (**Fig. 17**), VIH_{neg} ($r=0.464$; $p=0.302$) y

VIH⁺PCP⁺/TAR ($r = -0.200$; $p = 0.917$) no se encontraron correlaciones entre las frecuencias de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA y el porcentaje de células T CD8⁺ circulantes. Lo anterior indica que no existe una relación entre la distribución de ambas variables en las personas de toda nuestra cohorte de estudio. A partir de esta sección solamente se muestran las gráficas de correlación obtenidas para el grupo VIH⁺PCP⁺. Lo anterior, debido a que las gráficas de los grupos VIH_{neg} y VIH⁺PCP⁺/TAR presentan la misma tendencia de datos que las presentadas anteriormente.

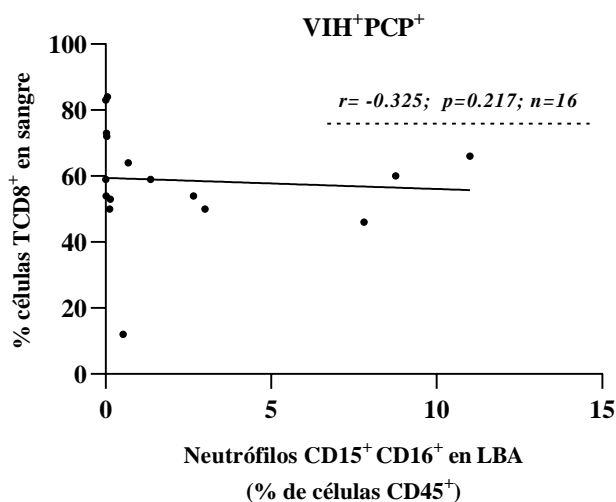


Fig. 17. Correlación entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA y el porcentaje de células T CD8⁺ por μ l de sangre en personas VIH⁺PCP⁺. Se realizó una prueba estadística coeficiente de correlación de Spearman.

3.2 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA con el cociente de células T CD4:CD8 en sangre de personas VIH⁺ con neumonía por PCP⁺

Debido a que en la enfermedad causada por el VIH el número de células T CD4⁺ disminuye y el número de células T CD8⁺ tiende a aumentar, decidimos evaluar la relación entre los porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica (cociente CD4:CD8) y la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA. Lo anterior, con el objetivo de comprobar si existe una relación entre el aumento o disminución de este cociente y la frecuencia de neutrófilos en la zona alveolar durante un estado de inflamación crónica. En cuanto al grupo VIH⁺PCP⁺, se encontró una correlación positiva entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA y

el cociente de células CD4:CD8 ($r= 0.517$; $p=0.023$) (**Fig. 18**). Lo anterior indicaría que, en personas con esta coinfección, a medida que aumenta el número de neutrófilos en LBA debido a un proceso inflamatorio, la relación entre el cociente de células CD4:CD8 también va en aumento. Con relación a los grupos VIH_{neg} ($r= -0.357$; $p=0.444$) y VIH⁺PCP⁺/TAR ($r=0.600$; $p=0.417$), no se encontraron correlaciones entre las frecuencias de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ y el cociente de células CD4:CD8. Esta información sugiere que no existe una relación entre la distribución de ambas variables en las personas de estos dos grupos.

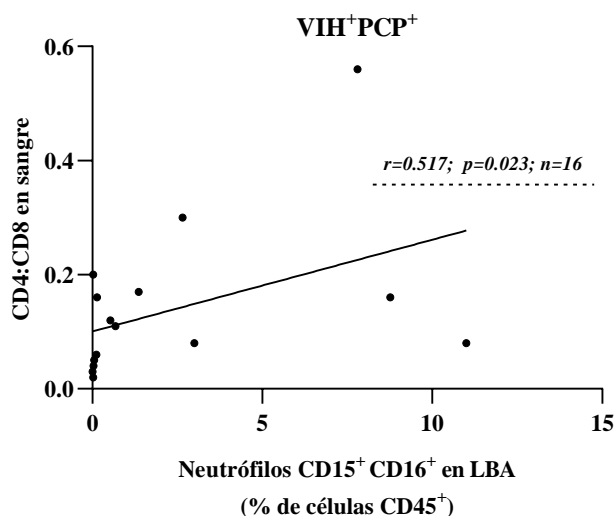


Fig. 18. Correlación entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA y el cociente de células T CD4:CD8 en sangre de personas VIH⁺PCP⁺. Se realizó una prueba estadística coeficiente de correlación de Spearman.

3.3 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA con el número de copias del VIH (CV) en plasma de personas VIH⁺ con neumonía por PCP⁺

La carga viral en plasma es uno de los principales factores predictivos de la progresión en la enfermedad producida por el VIH. Debido a esto, optamos por definir si existe alguna relación entre el número de copias del VIH en plasma y la frecuencia de neutrófilos en la zona alveolar, resultado de un proceso inflamatorio crónico. Para los grupos VIH⁺PCP⁺ ($r= -0.353$; $p=0.179$) (**Fig. 19**) y VIH⁺PCP⁺/TAR ($r= -0.0436$; $p=0.956$) no se encontraron correlaciones entre las frecuencias de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA y el número de

copias del VIH en plasma. Lo anterior indica que no existe una relación entre la distribución de ambas variables en las personas con VIH de nuestra cohorte de estudio.

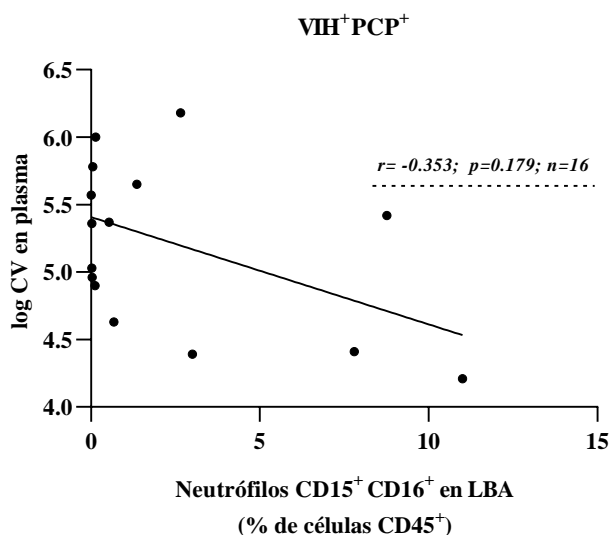


Fig. 19. Correlación entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA y el número de copias del VIH (log) por ml de plasma en personas VIH⁺PCP⁺. Se realizó una prueba estadística tipo coeficiente de correlación de Spearman para datos no paramétricos.

4 Asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ con las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en LBA de personas VIH⁺ con neumonía por PCP⁺

Realizamos correlaciones estadísticas entre las cantidades de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s, obtenidas por ELISA, y las frecuencias de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en LBA de las personas de nuestra cohorte de estudio. Lo anterior, con el objetivo de definir si ambos marcadores inflamatorios, resultado del estado de inflamación crónica, tienen alguna relación con el reclutamiento de neutrófilos al espacio alveolar bajo condiciones inflamatorias sistémicas. No se encontró correlación entre la frecuencia de los neutrófilos CD15⁺CD16⁺ y la concentración de CD163s ($r=0.032$; $p=0.908$), ni con la concentración de CD14s ($r=0.058$; $p=0.831$) en LBA del grupo VIH⁺PCP⁺ (Figs. 20a y 20b). Se observaron resultados similares en la asociación de ambas variables cuantitativas en los grupos VIH_{neg.} [CD163s ($r = -0.535$; $p=0.236$); CD14s ($r=0.214$; $p=0.662$)] y VIH⁺PCP⁺/TAR [CD163s ($r = -0.200$; $p=0.917$); CD14s ($r = -0.400$; $p=0.750$)]. Esta información indica que no existe una

relación entre la distribución de ambas variables cuantitativas en las personas de toda nuestra cohorte de estudio.

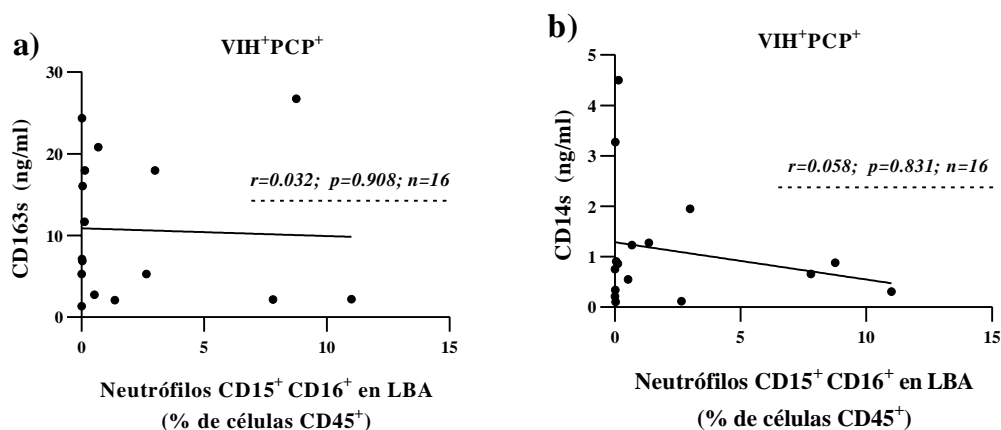


Fig. 20. Correlaciones entre la frecuencia de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ y las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s (a) y CD14s (b) en LBA de personas VIH⁺PCP⁺ obtenidas por ELISA. Se realizó una prueba estadística coeficiente de correlación de Spearman.

Asociaciones de las características fenotípicas de los neutrófilos de LBA con los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s

5 Asociaciones de marcadores de activación y características fenotípicas de los neutrófilos de LBA con los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s

Se realizó el análisis de las correlaciones entre los marcadores superficiales de activación celular CD13, degranulación celular CD66b y CD63, y de adhesión celular CD11b, con las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s en el LBA de nuestra cohorte de estudio. Lo anterior, con el objetivo de comprobar si el estado de activación inmunológica, reflejado en los niveles de CD163s y CD14s, es capaz de inducir la expresión de las diferentes proteínas de activación celular asociadas a neutrófilos antes presentadas. Para las correlaciones presentadas a continuación se utilizaron como base de análisis las unidades de fluorescencia media (MFI) de los marcadores elegidos, por medio de la detección de fluorescencia por citometría de flujo.

Asociación entre la cantidad de CD163s o CD14s con la expresión del marcador de activación celular CD13 en neutrófilos alveolares

Se realizaron correlaciones estadísticas entre los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s de LBA, obtenidas por ELISA, y las MFI de CD13 para comprobar si el estado de inflamación crónica inducido por el VIH tiene alguna relación con la expresión del marcador de activación celular CD13 en neutrófilos y su reclutamiento al espacio alveolar. No se encontró correlación entre la expresión de CD13 y la concentración de CD163s ($r = -0.364$; $p = 0.165$) (**Fig. 21a**) ni con la de CD14s ($r = 0.088$; $p = 0.746$) (**Fig. 21b**) en LBA del grupo VIH⁺PCP⁺. Se observaron resultados similares en la asociación de ambas variables cuantitativas en los grupos VIH_{neg.} [CD163s ($r = -0.107$; $p = 0.840$), CD14s ($r = -0.357$; $p = 0.444$)] y VIH⁺PCP⁺/TAR [CD163s ($r = 0.00$; $p = >0.990$), CD14s ($r = 0.400$; $p = 0.750$)].

Asociación entre la cantidad de CD163s o CD14s con la expresión del marcador de activación y degranulación celular CD66b en neutrófilos alveolares

Se realizaron correlaciones estadísticas entre los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s de LBA, obtenidas por ELISA, y las MFI de CD66b para comprobar si el estado de inflamación crónica inducido por el VIH tiene alguna relación con la expresión del marcador de degranulación celular CD66b en neutrófilos y su reclutamiento al espacio alveolar. No se encontró correlación entre la expresión de CD66b y la concentración de CD163s ($r = -0.314$; $p = 0.235$) (**Fig. 21c**) ni con la de CD14s ($r = 0.141$; $p = 0.602$) (**Fig. 21d**) en LBA del grupo VIH⁺PCP⁺. Se observaron resultados similares en la asociación de ambas variables cuantitativas en los grupos VIH_{neg.} [CD163s ($r = -0.535$; $p = 0.236$), CD14s ($r = 0.357$; $p = 0.444$)] y VIH⁺PCP⁺/TAR [CD163s ($r = -0.200$; $p = 0.917$), CD14s ($r = -0.400$; $p = 0.750$)].

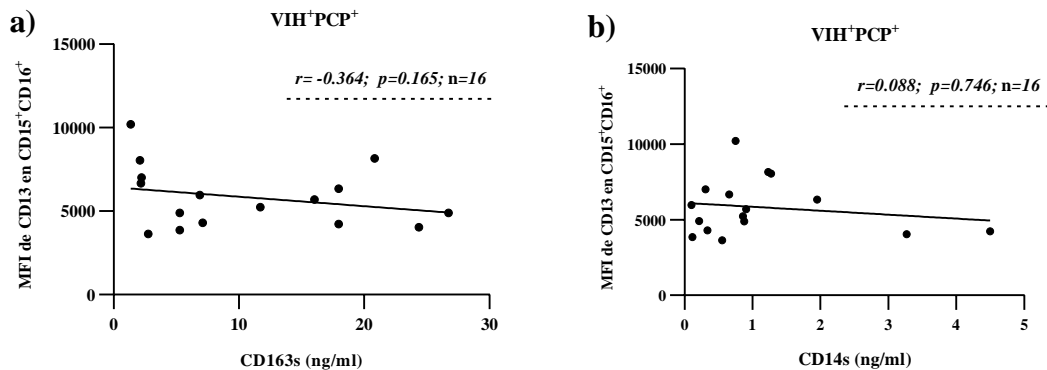
Asociación entre la cantidad de CD163s o CD14s con la expresión del marcador de adhesión celular CD11b en neutrófilos alveolares

Se realizaron correlaciones estadísticas entre los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s de LBA, obtenidas por ELISA, y las MFI de CD11b para comprobar si el estado de inflamación crónica inducido por el VIH tiene alguna relación con la expresión del marcador de migración celular CD11b en neutrófilos y su reclutamiento al espacio alveolar. No se encontró correlación entre la expresión de CD11b y la concentración de CD163s ($r = 0.097$;

$p=0.721$) (**Fig. 21e**) ni con la de CD14s ($r= 0.247$; $p=0.355$) (**Fig. 21f**) en LBA del grupo VIH⁺PCP⁺. Se observaron resultados similares en la asociación de ambas variables cuantitativas en los grupos VIH_{neg.} [CD163s ($r=0.250$; $p=0.595$), CD14s ($r= 0.392$; $p=0.396$)] y VIH⁺PCP⁺/TAR [CD163s ($r= -0.400$; $p=0.750$), CD14s ($r=0.200$; $p=0.917$)].

Asociación entre la cantidad de CD163s o CD14s con la expresión del marcador de degranulación celular CD63 en neutrófilos alveolares

Se realizaron correlaciones estadísticas entre los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s de LBA, obtenidas por ELISA, y las MFI de CD63 para comprobar si el estado de inflamación crónica inducido por el VIH tiene alguna relación con la expresión del marcador de degranulación celular CD63 en neutrófilos y su reclutamiento al espacio alveolar. No se encontró correlación entre la expresión de CD63 y la concentración de CD163s ($r= -0.364$; $p=0.165$) (**Fig. 21g**) ni con la de CD14s ($r= -0.379$; $p=0.148$) (**Fig. 21h**) en LBA del grupo VIH⁺PCP⁺. Se observaron resultados similares en la asociación de ambas variables cuantitativas en los grupos VIH_{neg.} [CD163s ($r= -0.500$; $p=0.267$), CD14s ($r=0.178$; $p=0.713$)] y VIH⁺PCP⁺/TAR [CD163s ($r= -0.400$; $p=0.750$), CD14s ($r=0.200$; $p=0.917$)].



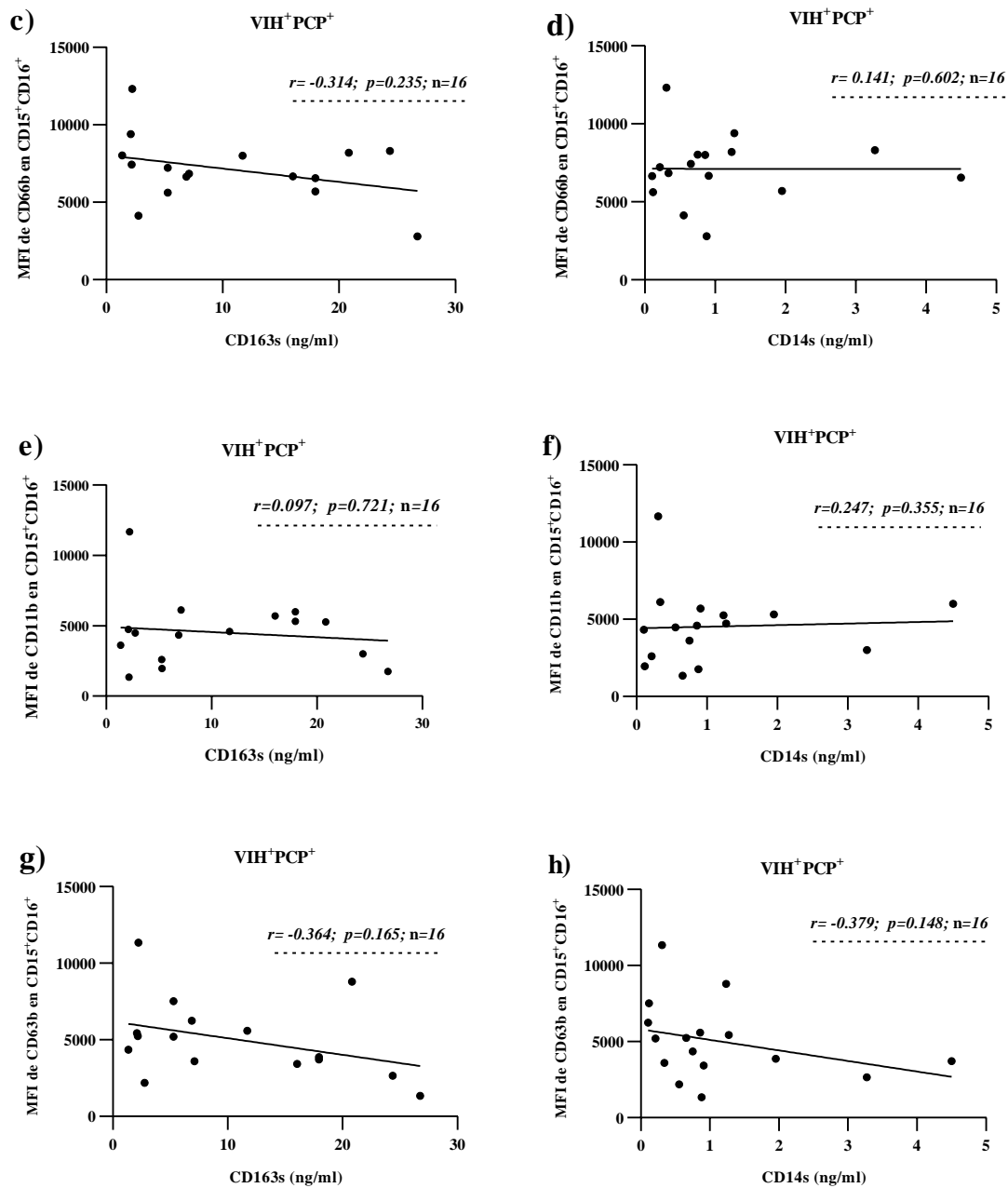


Fig. 21. Correlaciones entre las concentraciones de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s, obtenidas por ELISA, y la expresión de los marcadores asociados a funciones efectoras de los neutrófilos: activación celular CD13 (a y b); activación y degranulación celular CD66b (c y d); adhesión celular CD11b (e y f) y degranulación celular CD63 (g y h) en LBA de personas VIH⁺PCP⁺. Para cada análisis se realizó una prueba estadística coeficiente de correlación de Spearman.

Discusión

El análisis de la distribución de los neutrófilos en enfermedades respiratorias como la neumonía por *Pneumocystis*, que es hasta hoy una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad en personas inmunocomprometidas con o sin VIH, a pesar del implemento de la terapia antirretroviral, ha sido poco descrito (Limper *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 2015).

Estudios pioneros enfocados en la respuesta inmunológica de neutrófilos han mostrado discrepancias entre sí con relación a la cantidad de neutrófilos en LBA de personas con una coinfección VIH⁺PCP⁺. En su mayoría, los procesos inflamatorios asociados a *P. jirovecci* en personas VIH⁺ han sido reportados como sinónimo de un aumento en el recuento de este tipo celular en la zona alveolar y correlacionados con la gravedad clínica provocada por este microorganismo oportunista (Jensen *et al.*, 1991; Mason, *et al.*, 1989; Sadaghdar *et al.*, 1992). Limper y colaboradores (Limper *et al.*, 1989), en contraste, han reportado números reducidos de este tipo celular en LBA de personas VIH⁺PCP⁺. Pocos estudios han evaluado el recuento de neutrófilos en LBA de una cohorte de estudio conformada por personas con y sin VIH, y personas que se encuentren bajo terapia antirretroviral. A su vez, todas ellas con neumonía por *Pneumocystis*.

En la presente investigación comparamos las frecuencias de los neutrófilos en LBA de personas VIH⁺PCP⁺, sin VIH y con VIH más tratamiento antirretroviral. En contraste con lo esperado, no se encontraron diferencias significativas entre la distribución de los mismos ($p=0.583$). Hasta el momento, varios estudios han reportado diferencias significativas en este ámbito. Por ejemplo, Limper *et al.*, 1989 reportaron que la neumonía provocada por *P. jirovecci* se encuentra acompañada de una mínima infiltración de neutrófilos (2.3% del total de células inflamatorias diferenciales en LBA, entre ellas neutrófilos, macrófagos, eosinófilos y células T) a la zona alveolar en personas VIH⁺ en comparación con lo sucedido con otras enfermedades del sistema inmunológico no asociadas a VIH (leucemia o linfoma), o en el caso de pacientes bajo terapia de corticosteroides. En Mason, *et al.*, 1989 y Jensen *et al.*, 1991, se reportó que la neutrofilia (>10% del total de células inflamatorias diferenciales) en LBA de personas con VIH en fase de SIDA y neumonía por *P. jirovecci* se encuentra en estrecha relación con la gravedad de la infección, morbilidad y mortalidad de *P. jirovecci* en dichos pacientes.

A pesar de que en este punto nuestros resultados no se ajustan a los dos reportes anteriores, debido al desequilibrio existente entre nuestra cohorte de estudio, rechazamos nuestra hipótesis experimental inicial en la que esperábamos observar un número disminuido de neutrófilos en LBA de personas VIH⁺ y coinfección por PCP, y formulamos una nueva hipótesis relacionada con lo reportado por [Mason, et al., 1989](#) y [Jensen et al., 1991](#), entre otros. Lo anterior debido a que las frecuencias de neutrófilos en LBA de cada grupo mostraron una tendencia a presentar posibles diferencias entre sí (una media de frecuencias de 0.482 para el grupo VIH_{neg}, 2.261 para el grupo VIH⁺PCP⁺ y 1.385 para el grupo VIH⁺PCP⁺/TAR). Tal como reportaron [Mason, et al., 1989](#) y [Jensen et al., 1991](#), con una cohorte de estudio más equilibrada esperaríamos observar en el grupo VIH⁺PCP⁺ un número mayor de neutrófilos en LBA respecto al grupo VIH_{neg}, y en menor grado respecto al grupo VIH⁺PCP⁺/TAR.

El aumento o disminución de neutrófilos es un factor clave en la determinación de enfermedades pulmonares ([Martin y Frevert, 2005](#)). De acuerdo a lo anterior, en las personas VIH⁺PCP⁺ de nuestra cohorte de estudio, la inmunodeficiencia en sí misma ya es un factor que permite el rápido crecimiento y diseminación alveolar de *P. jirovecci* ([Mason, et al., 1989](#); [Martin y Frevert, 2005](#); [Lee et al., 2015](#)). De tal manera que al encontrarse en etapas crónica y de SIDA producidas por el VIH, las personas de este grupo cuentan con un estado de deterioro inmunológico en el que la cuantificación de células leucocitarias, y particularmente de neutrófilos, es mínimo en LBA. Aunado a lo anterior, si tomamos en cuenta que bajo condiciones normales los neutrófilos representan aproximadamente el 1% de las células asociadas al perfil inmunológico pulmonar ([Martin y Frevert, 2005](#)), en una coinfección VIH⁺PCP⁺ esperaríamos un porcentaje de neutrófilos todavía menor. Debido a lo anterior, al llevar a cabo un análisis adicional en LBA de personas en etapas más tempranas de la coinfección VIH-PCP, tendríamos la posibilidad de hallar en la zona alveolar una frecuencia mayor de neutrófilos que la que obtuvimos en este estudio. De esta manera, estaríamos corroborando cómo se da el inicio en el aumento de la permeabilidad capilar-alveolar y el subsecuente incremento en la extravasación de neutrófilos al espacio alveolar. Más tarde se esperaría la alteración en el intercambio gaseoso y el fallo respiratorio progresivo; fenómenos correlacionados a etapas crónicas y de SIDA de la infección ([Lee et al., 2015](#); [Mason, et al., 1989](#); [Sadaghdar et al., 1992](#)). De forma importante, estos cambios

en la respuesta inflamatoria pulmonar no son los mismos reflejados en sangre periférica (Jensen *et al.*, 1991).

De acuerdo a Twigg y colaboradores (Twigg III *et al.*, 2008), el implemento de TARc en personas VIH⁺ se asocia con una disminución progresiva de la carga viral pulmonar y a una reconstitución celular alveolar a estado normal, por lo que en cuanto a neutrófilos se refiere, se esperaría una disminución progresiva del microambiente inflamatorio pulmonar y una baja en el recuento de los mismos en LBA. Finalmente, en contraste con nuestros resultados, uno de los pocos estudios en este ámbito (Lee *et al.*, 2015) reportó neutrofilia (>5% al 10% del total de células inmunológicas pulmonares diferenciales) en personas VIH_{neg} y PCP⁺, hecho asociado directamente con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. En contraste con Twigg y colaboradores, en Lee *et al.*, 2015 se reportó que la neutrofilia en personas con y sin VIH es un marcador útil para la detección de daño pulmonar durante una infección por *P. jirovecii*; daño inducido por los mismos neutrófilos al llevar a cabo procesos efectores inflamatorios y que resultan en un síndrome de dificultad respiratoria. Con una cohorte de estudio más completa y en etapas más tempranas de la infección por VIH, podríamos observar resultados similares a los reportados por Lee y colaboradores. Asimismo, tras el implemento de TARc, en etapas tardías de la infección podríamos corroborar lo reportado por Twigg y colaboradores.

Evaluamos la expresión de diferentes marcadores asociados a funciones efectoras de los neutrófilos, entre ellas la activación celular (CD13), la activación y degranulación de componentes antimicrobianos (CD66b y CD63), y la adhesión celular (CD11b). En LBA, una mayor expresión de estos marcadores en los neutrófilos reflejaría una importante actividad inflamatoria en la zona alveolar, lo que sugeriría no solamente un incremento en el reclutamiento de estas células, sino también una probable relación directa entre la presencia de los neutrófilos y la densidad de expresión de otros marcadores inflamatorios. De forma importante, el reclutamiento de neutrófilos CD13⁺ y de neutrófilos CD66b⁺ estaría asociado con la activación inmunológica resultado de la coinfección VIH-PCP, y de la subsecuente activación de macrófagos alveolares y la expresión de citocinas proinflamatorias quimioatrayentes de neutrófilos en el espacio alveolar. Dicho reclutamiento podría ser mayormente observado en etapas iniciales de la coinfección VIH-PCP.

Respecto a CD13, encontramos una mayor expresión de esta proteína reguladora de la activación y apoptosis de los neutrófilos en el grupo VIH⁺PCP⁺/TAR con respecto al grupo VIH⁺PCP⁺ ($p=0.021$). De acuerdo con Cowburn *et al.*, 2005 y Fiddler *et al.*, 2016, quienes han descrito la expresión de este marcador en neutrófilos de personas con cáncer, el papel de CD13 en la apoptosis de neutrófilos es crítico para la resolución de un proceso inflamatorio. En procesos inflamatorios crónicos, como lo es una coinfección VIH⁺PCP⁺ (Tasaka, 2015), la acumulación excesiva de neutrófilos en la zona alveolar contribuye al daño pulmonar, mismo que es el resultado de un proceso resolutorio inefectivo (apoptosis retardada) o de una fagocitosis anormal en estas células. CD13 se caracteriza por impedir dicha apoptosis al inducir la remoción del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR1), y por ende, la inhibición de la interacción ligando TNFR1-TNF α . En este estudio esperaríamos observar una mayor expresión de este marcador en los neutrófilos de las personas VIH⁺PCP⁺ sin tratamiento antirretroviral, lo que indicaría, de acuerdo a los autores, procesos de apoptosis retardada y una resolución inflamatoria inefectiva. Sin embargo, al tomar en cuenta que las personas de este grupo se encuentran en etapas muy tardías de la infección, es posible que la acumulación de neutrófilos y la expresión de CD13 en la zona alveolar sean mínimas. Aún así, encontramos una mayor densidad de expresión de CD13 para este grupo. Debido a lo anterior, un análisis de LBA en etapas más tempranas de una coinfección VIH-PCP podría ser útil para corroborar una mayor expresión de CD13 en los neutrófilos alveolares de estas personas.

Contrariamente, en nuestros resultados se observa una mayor expresión de CD13 en los neutrófilos de las personas que se encuentran bajo terapia antirretroviral, lo que indicaría procesos resolutorios inefectivos además de un daño al tejido pulmonar continuo. Sin embargo, lo que se esperaría para este grupo sería la menor expresión de esta proteína, hecho que conduciría al restablecimiento gradual de la homeostasis pulmonar y a la disminución progresiva en el número de neutrófilos en la zona alveolar, es decir, al perfil inmunológico pulmonar ideal. Una posible explicación sobre la mayor expresión de CD13 para las personas bajo TARc, es la referida por Fiddler y colaboradores (Fiddler *et al.*, 2016), quienes han referido su importancia en la migración de células endoteliales cancerígenas. En los neutrófilos del grupo VIH⁺PCP⁺ bajo TARc, la elevada expresión de CD13 podría indicar la migración fuera del sitio inflamatorio para el restablecimiento del microambiente pulmonar.

Sin embargo, esto es sólo una hipótesis. Para el grupo VIH_{neg}, la expresión de CD13 confirma, de acuerdo a los autores, que la ausencia de un proceso inflamatorio crónico reduce significativamente la expresión superficial de CD13, indicando para los neutrófilos de este grupo procesos resolutorios más efectivos y un mayor índice de apoptosis, a pesar de tener neumonía.

En cuanto al marcador de activación y degranulación celular CD66b, observamos una tendencia a una mayor expresión en el grupo VIH⁺PCP⁺ respecto al grupo sin VIH ($p=0.055$). Los reportes del análisis de la expresión de este marcador en los neutrófilos de personas con una coinfección VIH⁺PCP⁺ son escasos. Uno de los reportes más completos que se tienen hasta el momento es de un estudio en personas infectadas por el virus del dengue, en el que se reportó que la expresión de CD66b en neutrófilos circulantes es un indicativo del aumento en la adhesión a celular, degranulación de componentes antimicrobianos y de la producción de ROS ([Opawatchai et al., 2019](#)). De acuerdo con nuestros resultados, una tendencia a una mayor expresión de CD66b en personas con una coinfección VIH⁺PCP⁺ podría ser el reflejo del establecimiento de un microambiente inflamatorio pulmonar continuo, inducido, en primera instancia, por la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias como IL-8 y TNF- α , y, secundariamente, por el incremento en el reclutamiento y las funciones efectoras de los neutrófilos dentro del espacio alveolar.

Respecto al marcador de adhesión celular CD11b, se sabe que la migración de neutrófilos bajo la gran mayoría de circunstancias inflamatorias requiere del complejo de adhesión celular CD11b/CD18 ([Abdel-Salam y Ebaid, 2014](#)). En nuestros resultados se observó una tendencia de los neutrófilos del grupo VIH⁺PCP⁺ a expresar mayormente este marcador respecto al grupo sin VIH ($p=0.065$). De acuerdo a los autores antes mencionados, la participación y regulación de los neutrófilos en enfermedades de carácter inflamatorio crónico, como la coinfección VIH-PCP, se encuentra en estrecha relación con las citocinas y moléculas resultantes de un microambiente inflamatorio. Como ejemplo de lo anterior, en [Abdel-Salam y Ebaid, 2014](#) se reportó una expresión mayor del complejo CD11b/CD18 en neutrófilos circulantes de personas sanas al ser estimuladas con IL-2 ([Abdel-Salam y Ebaid, 2014](#)). Por tal motivo, hipotetizamos que el análisis de las concentraciones de IL-2 en LBA durante la coinfección VIH⁺PCP⁺, en etapas más tempranas, podría otorgar información útil

sobre el reclutamiento de neutrófilos al espacio alveolar. Sin embargo, es necesario considerar que IL-2 es una interleucina asociada más bien a la sobrevivencia y proliferación celular de células T, que al reclutamiento de células hacia tejidos. De forma importante, se ha reportado que su producción disminuye en etapas avanzadas de una infección por VIH (Sokoya *et al.*, 2017), y se encuentra asociada mayormente a células T. En las personas bajo TARc de nuestro estudio, la disminución en la expresión de CD11b, y más específicamente, del complejo CD11b/CD18, estaría ligada a la disminución del microambiente inflamatorio generado por el VIH. Esto último sería mejor observado con una cohorte de estudio más completa en cuanto al grupo VIH⁺PCP⁺/TAR se refiere.

Respecto al marcador de degranulación CD63, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos de nuestra cohorte de estudio ($p=0.646$). En este ámbito, Skubitz y colaboradores (Skubitz *et al.*, 2000) han reportado que existe una relación estrecha entre la expresión de CD63 y la producción del complejo de adhesión celular CD11b/CD18 en neutrófilos circulantes de humanos, por lo que con una cohorte de estudio más equilibrada podríamos llegar a observar si este fenómeno también ocurre en los neutrófilos del grupo VIH⁺PCP⁺.

Comparamos los niveles de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s tanto en plasma como en LBA de las personas VIH⁺PCP⁺ pertenecientes a nuestra cohorte de estudio, encontrando diferencias significativas ($p<0.0001$) entre el plasma y LBA para ambos marcadores; encontrándose en plasma concentraciones significativamente más altas. Hasta hoy se ha descrito que la activación inmunológica e inflamación crónica en personas con VIH son un factor predictor de la progresión en la enfermedad producida por la infección (Sandler *et al.*, 2011). Particularmente, las concentraciones en plasma de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s son el reflejo de dos aspectos importantes en una infección por VIH: la inflamación crónica y el reservorio de las células infectadas (Parisi *et al.*, 2018). Por tal motivo, se trata de dos moléculas con potencial biomarcador para la enfermedad producida por el VIH (Møller, 2012). Sin embargo, en LBA no existen reportes de la determinación de estos marcadores inflamatorios durante la coinfección VIH⁺PCP⁺. En su lugar, la mayor parte de la información se enfoca en el estudio de plasma en otra clase de

coinfecciones, por ejemplo, la coinfección VIH⁺TB (*Mycobacterium tuberculosis*) (Boulougoura y Sereti, 2016).

Un estudio reciente (Wang *et al.*, 2019) en plasma sanguíneo de una cohorte de pacientes VIH⁺ con neumonía (dos de ellos asociados a *P. jirovecii*) y sin TARc, reportó niveles elevados de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s, entre otros marcadores inflamatorios (p. e. IL-6). En el plasma de las personas VIH⁺PCP⁺ de esta investigación, la expresión elevada de estos marcadores es el indicador de una actividad importante en la activación de macrófagos y monocitos, además de sugerir procesos de disbiosis intestinal y translocación bacteriana; procesos característicos de una etapa infectiva tardía del VIH (Krastinova *et al.*, 2015). Encontramos una mayor cantidad de estas proteínas inflamatorias en plasma debido a su naturaleza homogénea y estable al ser liberadas en su forma soluble al torrente sanguíneo. De forma interesante, CD163s sigue siendo altamente estable durante semanas a 4°C, y posiblemente durante años a -20°C, después de haber sido separada de los eritrocitos (Møller, 2012). Por tales motivos, corroboramos que la medición de CD163s y CD14s en plasma sigue siendo un factor clave para la prognosis de la enfermedad producida por el VIH. En contraste, a pesar de la gran utilidad que provee el LBA para el estudio del tracto respiratorio inferior, una de sus limitaciones es que necesita de la instilación de líquido salino al tracto respiratorio. Por lo anterior, el volumen de LBA recuperado después del procedimiento es una mezcla variable de solución salina y del líquido de revestimiento epitelial pulmonar, así como de los componentes de este último (Rennard *et al.*, 1985; Tayman *et al.*, 2011). Ésta podría ser una de las principales razones por las cuales observamos niveles inferiores tanto de CD163s como de CD14s en LBA en comparación con el plasma sanguíneo. Además, también hipotetizamos la inestabilidad molecular y degradación de ambas proteínas inflamatorias en LBA una vez llevado a cabo el proceso de instilación salina al tracto respiratorio inferior.

Respecto a los demás grupos de nuestra cohorte de estudio, tampoco se observaron diferencias significativas en la cantidad de CD14s ($p=0.172$) y CD163s ($p=0.701$) en LBA. Lo anterior puede deberse, al igual que en la distribución de los neutrófilos, al tamaño de muestra de dos de los grupos de estudio. Con una cohorte de estudio más equilibrada esperaríamos observar diferencias significativas respecto a ambos marcadores inflamatorios

comparando el grupo VIH⁺PCP⁺ con el resto. De forma similar a [Wang et al., 2019](#), en nuestros resultados encontramos una tendencia de mayor cantidad de CD163s en el LBA los grupos VIH⁺PCP⁺ y VIH⁺PCP⁺/TAR, indicando que en este último grupo, posiblemente, la inflamación anormal sigue persistiendo incluso después del uso de terapia antirretroviral. Para CD14s observamos una tendencia de mayor expresión en LBA de personas sin VIH en comparación de los grupos restantes. Lo anterior puede deberse al estado inflamatorio pulmonar producido por la neumonía de estos pacientes a pesar de no tener VIH. Sin embargo, esta hipótesis es poco viable ya que, como mencionamos antes, la liberación de CD14s es el resultado de un constante estado de inflamación crónica sistémica que difícilmente podría ser inducido en personas sin una infección por VIH. Adicionalmente, de acuerdo a Parisi y colaboradores ([Parisi et al., 2018](#)), tanto CD163s como CD14s se encuentran independientemente asociados a un alto riesgo de mortalidad en personas con y sin TARc, sugiriendo que su reducción en los procesos de inflamación podría desempeñar un papel importante en la disminución del riesgo de muerte en personas con esta coinfección. A pesar de no haber encontrado diferencias significativas entre grupos en este estudio, la sola presencia de ambos marcadores en LBA sigue siendo un indicador importante de la activación inmunológica en personas con una coinfección VIH⁺PCP⁺ ([Sandler et al., 2011](#)).

Posteriormente realizamos correlaciones entre las frecuencias de neutrófilos alveolares y algunos marcadores clínicos asociados a la enfermedad (% de células T CD4⁺ y CD8⁺ en sangre periférica y el número de copias virales en plasma) producida durante una coinfección VIH⁺PCP⁺. Lo anterior con el objetivo de comprobar si dichos marcadores clínicos cuentan con un impacto durante el reclutamiento de neutrófilos al espacio alveolar en una coinfección de esta naturaleza.

Observamos una tendencia a una correlación positiva ($r=0.484$; $p=0.059$) entre la frecuencia de neutrófilos alveolares y el porcentaje de células T CD4⁺ circulantes. Como se mencionó en la introducción, la etapa más temprana durante una infección por VIH se caracteriza por un incremento en la activación de células T y B, y por un aumento en la producción de citocinas proinflamatorias, particularmente en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, las personas del grupo VIH⁺PCP⁺ de este estudio se encuentran en etapas más tardías de la infección, por lo que descartamos la hipótesis de

correlación positiva entre células T CD4⁺ en sangre y la frecuencia de neutrófilos en LBA. Lo anterior, principalmente, debido a que todas las personas del grupo VIH⁺PCP⁺ cuentan con un porcentaje menor al 16% de células T CD4 en sangre (el rango habitual de este tipo celular en sangre es de 30-60%) ([aidsinfontet, 2014](#)). Y que, además, en el estadístico obtenido para esta prueba ($r=0.484$; $p=0.059$), el valor de r carece de fuerza de correlación. Por esto, no existe una relación definitoria entre la frecuencia de neutrófilos en LBA y el porcentaje de células T CD4⁺, al menos en etapas crónica y de SIDA de la infección. Sin embargo, una reducción en el número de células T CD4⁺ circulantes, por medio de TARc, induciría un posible decremento aún mayor en el número de neutrófilos en LBA en etapas tardías de una coinfección VIH⁺PCP⁺. Para definir correlación definitoria entre ambas variables proponemos llevar a cabo este análisis en etapas más tempranas de la coinfección VIH-PCP.

Similar a los resultados obtenidos para las células T CD4⁺, tampoco observamos correlación definitoria en ninguno de los grupos respecto a la frecuencia de neutrófilos en LBA y el porcentaje células T CD8⁺ circulantes. En este ámbito, se ha reportado que la cantidad de células T CD8⁺ circulantes aumenta hasta un 50% durante la etapa aguda infectiva del VIH ([Deeks et al., 2013](#)), y que a medida que la infección progresa y el estado de activación inmunológica incrementa, se produce un acortamiento progresivo en la longevidad y sobrevivencia tanto de las células T CD4⁺ como de T CD8⁺ ([Sokoya et al., 2017](#)). De acuerdo a la fundación Toronto People With AIDS ([PWA, 2012](#)), el porcentaje de células T CD8⁺ circulantes bajo condiciones normales varía de entre 15 a 40%. En nuestros resultados, para todas las personas VIH⁺PCP⁺ el porcentaje de este tipo celular se encontró por arriba del 50% de células T CD8⁺. Debido a este elevado porcentaje, hipotetizamos que el microambiente inflamatorio crónico en estos pacientes, a pesar de encontrarse en etapas tardías de la infección, se encuentra aún en estado activo y las células citotóxicas no se han diferenciado al perfil exhausto, ni su sobrevivencia se ha visto del todo disminuída por el VIH ([Norris et al., 2006](#); [Sokoya et al., 2017](#)). En el grupo con TARc, se esperarí una disminución del número de células T CD8⁺ y de neutrófilos en LBA (perfil inmunológico ideal), sin embargo, esto difícilmente es observado en nuestros resultados debido al tamaño de muestra reducido. Teniendo en cuenta que la toma de muestra en los pacientes VIH⁺PCP⁺ se llevó a cabo hace más de 5 años, análisis recientes sobre el porcentaje de células T CD8⁺

en sangre podrían establecer otro tipo de relación entre células citotóxicas y los neutrófilos en LBA. En este análisis se esperaría observar una reducción considerable de este porcentaje de células en sangre periférica y, a su vez, una reducción de neutrófilos en LBA debido al estado inflamatorio crónico.

Observamos también una correlación positiva entre la frecuencia de neutrófilos en LBA y el cociente de células T CD4:CD8 ($r= 0.517$; $p=0.023$) en personas VIH⁺PCP⁺. El cociente de células T CD4:CD8 describe con precisión la disfunción inmunológica tras una infección por VIH y podría ser una opción viable en cuanto al diagnóstico del progreso en la enfermedad producida, a la respuesta al tratamiento (TARc), y al análisis de la morbilidad y mortalidad. Cocientes entre 1.5 y 2.5 son generalmente considerados normales, habiendo de forma usual el doble de células T CD4⁺ que de células T CD8⁺. Cocientes menores del rango mínimo o invertidos son asociados a un fenotipo inmunológico de riesgo, senescencia inmunológica e inflamación crónica en personas con o sin VIH (McBride y Striker, 2017). En personas VIH⁺, el cociente de células T CD4:CD8 tiende a disminuir en etapas iniciales debido al aumento súbito de células T CD8⁺. En contraste, el implemento de TARc tiende a restaurar el número de células T CD4⁺ y a disminuir el número de células T CD8⁺, lo que conlleva a la normalización del cociente. El análisis del cociente de células T CD4:CD8 ha sido escasamente estudiado durante el desarrollo de otras enfermedades crónicas o coinfecciones con VIH, tales como la coinfección VIH⁺PCP⁺ (McBride y Striker, 2017). Al encontrarse en etapas crónicas de la infección, en nuestro grupo VIH⁺PCP⁺, la cantidad de células T CD8⁺ se encuentra varias veces por encima de las células T CD4⁺, obteniendo una mediana de cocientes de 0.095 (ver **Tabla 1**). Además de que, como ya hemos mencionado, el conteo de neutrófilos en LBA es mínimo en este punto de la coinfección. Por lo anterior, nuestros resultados contrastan con la información de la literatura al indicar un progresivo aumento del cociente de células T CD4:CD8 (más células T CD4⁺ que células T CD8⁺) en personas VIH⁺PCP⁺ a medida que también aumenta la frecuencia de neutrófilos en LBA ($r= 0.517$; $p=0.023$). Lo que se esperaría para este grupo, al menos en etapas más tempranas de la coinfección, sería otro comportamiento entre ambas variables. Es decir, un aumento en el número de neutrófilos en LBA ligados a procesos inflamatorios, y a su vez, una disminución del cociente de células T CD4:CD8, misma que es el resultado del declive gradual de las células T CD4⁺. El contraste de nuestros resultados contra lo publicado hasta el momento

puede estar debido a la naturaleza de la coinfección VIH⁺PCP⁺. Bajo TARc, un reanálisis de este cociente en la actualidad podría indicar la normalización del cociente de células T CD4⁺:CD8 y la mínima cantidad de neutrófilos en LBA.

Respecto a la carga viral en plasma, no encontramos correlaciones entre ésta y la frecuencia de neutrófilos en LBA tanto en el grupo VIH⁺PCP⁺ como en el grupo VIH⁺PCP⁺/TAR. Históricamente, la carga viral del VIH en plasma ha servido como un marcador de la supresión inmunológica y la respuesta al tratamiento antirretroviral en personas VIH⁺. Sin embargo, incluso con las ventajas del tratamiento antirretroviral actual, el conteo absoluto de células T CD4⁺ y la carga viral en plasma no siempre reflejan el buen estado inmunológico de la persona (McBride y Striker, 2017; Wang *et al.*, 2019), especialmente en los casos de personas con falla virológica durante el TARc (>1000 copias/ml de plasma después de haber iniciado el tratamiento antirretroviral) (Alave *et al.*, 2013). Acorde a esto último, en nuestro grupo de estudio bajo TARc, tres de las personas se hallaron por debajo de las 500 copias/ml de plasma y una se halló con carga viral indetectable, todas ellas con más de 5 años bajo el tratamiento, razón por la que no hallamos una correlación entre la carga viral en plasma y la frecuencia de neutrófilos en LBA de este grupo de estudio. En cuanto al grupo VIH⁺PCP⁺, con una cohorte de estudio más equilibrada y en etapas tempranas de la infección, se esperarí que una mayor cantidad de neutrófilos en LBA tenga una correlación directa con el aumento de la carga viral en plasma, indicando de este modo la persistente inflamación crónica en personas bajo esta coinfección.

A continuación, llevamos a cabo el análisis de las asociaciones entre la frecuencia de neutrófilos y la cantidad de los marcadores inflamatorios CD163s ($r=0.032$; $p=0.908$), y CD14s ($r=0.058$; $p=0.831$) en LBA de las personas VIH⁺PCP⁺ de nuestra cohorte de estudio, para el cual no observamos diferencias significativas. Los resultados anteriores pueden estar relacionados con el hecho de que, en LBA, hallamos concentraciones disminuidas de ambos marcadores. Nos parece, por lo tanto, un resultado esperado el no haber hallado correlación alguna entre la frecuencia de neutrófilos y las concentraciones de ambos marcadores inflamatorios en LBA. A pesar de los resultados obtenidos, tal como reportaron Wang y colaboradores (Wang *et al.*, 2019), el análisis de ambos marcadores en plasma (mayormente que en LBA) sigue siendo potencial predictivo en la mortalidad de personas con una

coinfección VIH⁺PCP⁺. De igual forma, corroboramos que el aumento de la frecuencia de neutrófilos en LBA es el reflejo de un ambiente inflamatorio crónico sistémico.

Finalmente, realizamos el análisis de posibles asociaciones entre la cantidad de los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s y la expresión de los marcadores de activación celular CD13, degranulación celular CD66b y CD63, y de adhesión celular CD11b en neutrófilos de LBA. Para los tres grupos de nuestra cohorte de estudio no se encontraron correlaciones entre ambas variables cuantitativas. Lo anterior puede deberse, en primera instancia, a la mínima cantidad de ambos marcadores inflamatorios, tanto CD163s como CD14s, en el LBA de los tres grupos de estudio. No obstante, una sobreexpresión de los marcadores de activación, degranulación y adhesión celular en los neutrófilos en LBA, sigue siendo el reflejo de un microambiente proinflamatorio crónico-pulmonar producido durante la activación inmunológica en una coinfección VIH⁺PCP⁺.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos podemos concluir de este estudio que no es posible establecer correlaciones lineales definitivas entre la frecuencia de neutrófilos y las cantidades de las concentraciones de CD163s y CD14s en LBA de nuestra cohorte de estudio. Lo anterior podría deberse, con gran probabilidad, a que nuestra cohorte fue limitada en dos de los grupos (VIH_{neg} y VIH⁺PCP⁺/TAR), y a la poca cantidad de dichos marcadores inflamatorios que hallamos en LBA. Pese a esto, corroboramos que la acumulación de neutrófilos CD15⁺CD16⁺ en el tracto respiratorio inferior, es el reflejo de un microambiente inflamatorio pulmonar persistente, mismo que es el resultado del establecimiento de la activación inmunológica e inflamación crónica en personas VIH⁺PCP⁺. Asimismo, corroboramos que los marcadores inflamatorios CD163s y CD14s son, como ya se ha reportado, indicadores independientes de la progresión en la enfermedad producida por la infección del VIH, misma que probablemente pueda llegar a agravarse debido a una coinfección con *P. jirovecci*. Sin embargo, la poca cantidad de ambos marcadores disponible en LBA disminuye su uso potencial como biomarcador pronóstico de la coinfección, por lo que la cuantificación de tales marcadores sigue siendo una opción más viable en plasma sanguíneo.

Perspectivas

Otorgamos debida importancia a una de las técnicas utilizadas en esta investigación y que sin la cual no se hubiera podido llevar a cabo. El LBA es una muestra biológica humana que requiere del seguimiento estricto de un protocolo estructurado evaluado por Comités de Ética y de Investigación. Por lo que el LBA, aparte de ser un tipo de muestra biológica ideal para el diagnóstico y entendimiento de una gran cantidad de enfermedades pulmonares, también es una muestra biológica muy difícil de obtener para estudios de ciencia básica y translacional. Es por estas razones que las perspectivas futuras asociadas al estudio de elementos biológicos presentes en LBA se ven ciertamente limitadas, pero no por ello definitivamente excluidas. Estudios posteriores que impliquen la inclusión de una cohorte de estudio equilibrada podría llegar a ser la base para el establecimiento de correlaciones lineales directas significativas bajo los mismos criterios de estudio que se utilizaron en esta investigación.

Agradecimientos

Al CIENI y a todos sus integrantes: equipo médico, técnico y clínico, que sin su gran aporte, este escrito no hubiera podido llevarse a cabo.

A las personas del protocolo B08-16, pilar de esta investigación.

A la Dra. Perla Del Río, por el acompañamiento y guía para la elaboración de este escrito a pesar de la pandemia por SARS-CoV-2.

Referencias

1. Abbas, A., Lichtman, A. y Pillai, S. (2012). Células y tejidos del sistema inmunitario. En *Inmunología celular y molecular (7ma ed.)* Barcelona: Elsevier.
2. Abdel-Salam, B., y Ebaid, H. (2014). Clinical immunology Expression of CD11b and CD18 on polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-2. *Central European Journal of Immunology*, **2**, 209–215. <https://doi.org/doi:10.5114/ceji.2014.43725>
3. Aidsinfonet (2014). Análisis de células CD4 (células T). Recuperado 2 de enero de 2022, de http://www.aidsinfonet.org/fact_sheets/view/124?lang=spa
4. Alave, J., Paz, J., González, E., Campos, M., Rodríguez, M., Willig, J. y Echeverría, J. (2013). Risk factors associated with virologic failure in HIV- infected patients receiving antiretroviral therapy at a public hospital in Peru. *Revista chilena de infectología*, **30** (1), 42-48. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000100006>
5. Aung, H., Sivakumar, A., Gholami, S., Venkateswaran, S., Gorain, B. y Md. S. (2019). An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung. En Kesharwani, P. (Ed.) *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*. Academic Press.
6. Becerra, J., Bildstein, L. S. y Gach, J. (2016). Recent Insights into the HIV/AIDS Pandemic. *Microbial Cell*, **3**(9), 450–474. <https://doi.org/10.15698/mic2016.09.529>
7. Beck, J. (2005). The Immunocompromised Host: HIV Infection. *Proceedings of the American Thoracic Society*, **2**(5), 423–427. <https://doi.org/10.1513/pats.200507-077js>
8. Benfield, T., Vestbo, J., Junge, J., Nielsen, T., Jensen, B. y Lundgren, J. (1995). Prognostic Value of Interleukin-8 in AIDS-associated *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, **151**(4), 1058–1062. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/151.4.1058>
9. Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, **40**(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
10. Boraschi, D., e Italiani, P. (2018). Innate Immune Memory: Time for Adopting a Correct Terminology. *Frontiers in Immunology*, **9**. <https://doi:10.3389/fimmu.2018.00799>

11. Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity*, 33(5), 657–670. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.011>
12. Borrow, P. y Bhardwaj, N. (2008). Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 3(1), 36–44. <https://doi.org/10.1097/coh.0b013e3282f2bce7>
13. Boulougoura, A., y Sereti, I. (2016). HIV infection and immune activation: the role of coinfections. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 11(2), 191–200. <https://doi:10.1097/coh.0000000000000241>
14. Burleson, G., Burleson, S. y Burleson, F. (2015). Pulmonary Immunology of Infectious Disease. En Parent, A. (Ed.) *Comparative Biology of the Normal Lung*. 2nd Edition. USA: Elsevier.
15. Burnard, J. (2008). *Respiratory Physiology: The Essentials*. 8th Edition. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
16. CENSIDA (2019). Boletín de atención integral para personas con VIH. Recuperado 8 de abril de 2020, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/545616/Bolet_n_DAI_4to_trimestre_VF.pdf
17. CENSIDA (2019). Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México Registro Nacional de Casos de SIDA. Actualización al Cierre de 2019. Recuperado 6 de abril de 2020, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/533424/RN_4o_Trim_2019.pdf
18. Chan-Cheng, H., Monge-Rodríguez, S. y Espinoza-Mora, Ma.-R. (2017). Activación inmunológica crónica en la patogénesis de la enfermedad por virus de inmunodeficiencia humana. *Acta Médica Costarricense*, 59(1), 7-14. Recuperado 22 de abril de 2020 de http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S000160022017000100007&lng=en&tlng=es.
19. Charles, T. y Shellito, J. (2016). Human Immunodeficiency Virus Infection and Host Defense in the Lungs. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 37(2), 147–156. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1572553>

20. Chenyang, Lu., Mohammad, A. y Fox, A. (2020). CD13/Aminopeptidase N Is a Potential Therapeutic Target for Inflammatory Disorders. *The Journal of Immunology*, 204(1), 3–11. <https://doi.org/doi:10.4049/jimmunol.1900868>
21. Coffin, J. y Swanstrom, R. (2013). HIV Pathogenesis: Dynamics and Genetics of Viral Populations and Infected Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012526>
22. Cohen, M., Shaw, G., McMichael, A. y Haynes, B. (2011). Acute HIV-1 Infection. *New England Journal of Medicine*, 364(20), 1943–1954. <https://doi.org/10.1056/nejmra1011874>
23. Cortés-Télles, A., Juárez-Fernández, F. y Peña-Mirabal E. (2011). Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con VIH. *NCT Neumología y Cirugía de Tórax*, 70(3), 165-171.
24. Costiniuk, C. y Jenabian, M.-A. (2013). The lungs as anatomical reservoirs of HIV infection. *Reviews in Medical Virology*, 24(1), 35–54. <https://doi.org/10.1002/rmv.1772>
25. Cowburn, A., Sobolewski, A., Reed, B., Deighton, J., Murray, J., Cadwallader, K., Bradley, J. y Chilvers, E. (2006). Aminopeptidase N (CD13) Regulates Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis in Human Neutrophils. *Journal of Biological Chemistry*, 281(18), 12458–12467. <https://doi.org/10.1074/jbc.m511277200>
26. Craig, A., Mai, J., Cai, S. y Jeyaseelan, S. (2009). Neutrophil Recruitment to the Lungs during Bacterial Pneumonia. *Infection and Immunity*, 77(2), 568–575. <https://doi.org/10.1128/iai.00832-08>
27. Crothers, K., Thompson, B., Burkhardt, K., Morris, A., Flores, S., Diaz, P., Chaisson, R., Kirk, G., Rom, W. y Huang, L. (2011). HIV-Associated Lung Infections and Complications in the Era of Combination Antiretroviral Therapy. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 8(3), 275–281. <https://doi.org/10.1513/pats.201009-059wr>
28. Deeks, S., Tracy, R. y Douek, D. (2013). Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity*, 39(4), 633–645. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.001>

29. Drescher, B. y Bai, F. (2013). Neutrophil in viral infections, friend or foe? *Virus Research*, 171(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.11.002>
30. Eichelberger, K., Jones, G., y Goldman, W. (2019). Inhibition of Neutrophil Primary Granule Release during *Yersinia pestis* Pulmonary Infection. *American Society for Microbiology*, 10(6), <https://doi.org/10.1128/mbio.02759-19>
31. Etzerodt, A. y Moestrup, S. (2013). CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(17), 2352–2363. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4834>
32. Fabriek, B., Dijkstra, C., y van den Berg, T. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*, 210(2-4), 153–160. <https://doi:10.1016/j.imbio.2005.05.010>
33. Fettig, J., Swaminathan, M., Murrill, C. y Kaplan, J. (2014). Global Epidemiology of HIV. *Infectious Disease Clinics of North America*, 28(3), 323–337. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2014.05.001>
34. Fiddler, C., Parfrey, H., Cowburn, A., Luo, D., Nash, G. B., Murphy, G. y Chilvers, E. (2016). The Aminopeptidase CD13 Induces Homotypic Aggregation in Neutrophils and Impairs Collagen Invasion. *PLOS ONE*, 11(7), e0160108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160108>
35. Forsman, A. y Weiss, R. (2008). Why is HIV a pathogen? *Trends in Microbiology*, 16(12), 555–560. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.004>
36. French, C. (2009). Respiratory Tract. En Cibas, E. y Ducatman, B. *Citology. Diagnostic Principles and Clinical Correlated*. 3rd Edition. USA: Elsevier.
37. Gasteiger, G., D’Osualdo, A., Schubert, D., Weber, A., Bruscia, E. y Hartl, D. (2016). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *Journal of Innate Immunifleurty*, 9(2), 111–125. <https://doi.org/10.1159/000453397>
38. German Advisory Committe Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup ‘Assessment of Pathogens Transmissible by Blood’. (2016). Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3), 203–222. <https://doi.org/10.1159/000445852>
39. Giacalone, V., Margaroli, C., Mall, M. y Tirouvanziam, R. (2020). Neutrophil Adaptations upon Recruitment to the Lung: New Concepts and Implications for

- Homeostasis and Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 851.
<https://doi.org/10.3390/ijms2103085>
40. Gingo, M. y Morris, A. (2012). Pathogenesis of HIV and the Lung. *Current HIV/AIDS Reports*, 10(1), 42–50. <https://doi.org/10.1007/s11904-012-0140-x>
 41. Girard, M. Osmanov, S., Assossou, O. y Kieny, M.-P. (2011). Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: A review. *Vaccine*, 29(37), 6191–6218. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.06.085>
 42. Golubicic, P. y Tekavec-Trkanjec, J. (2015). Upper Respiratory Tract Infections. En Blasi, F. y Dimopoulos, G. *Textbook of Respiratory & Critical Care Infection*. UK: JP Medical Publishers.
 43. Grommes, J. y Soehnlein, O. (2011). Contribution of Neutrophils to Acute Lung Injury. *Molecular Medicine*, 17(3-4), 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2010.00138>
 44. Guo, F., Chen, Y., Yang, S.-L., Xia, H., Li, X.-W. y Tong, Z.-H. (2014). *Pneumocystis* Pneumonia in HIV-Infected and Immunocompromised Non-HIV Infected Patients: A Retrospective Study of Two Centers in China. *PLoS ONE*, 9(7), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101943>
 45. Gustafson, M., Lin, Y., Maas, M., Van Keulen, V., Johnston, P., Peikert, T., Gastineau, D. y Dietz, A. (2015). A Method for Identification and Analysis of Non-Overlapping Myeloid Immunophenotypes in Humans. *PloS ONE*, 10(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121546>
 46. Head, B., Mao, R., Keyvan, Y. y Rueda, Z. (2019). Inflammatory mediators and lung abnormalities in HIV: A systematic review. *PloS ONE*, 14(12), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226347>
 47. Hernandez-Vargas, E. y Middleton, R. (2013). Modeling the three stages in HIV infection. *Journal of Theoretical Biology*, 320, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2012.11.028>
 48. Hensley-McBain, T. y Klatt, N. (2018). The Dual Role of Neutrophils in HIV Infection. *Current HIV/AIDS Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11904-018-0370-7>
 49. Inglis, T. (2007). *Master Medicine. Microbiology and Infection*. 3rd Edition. UK: Churchill Livingstone Elsevier.

50. Iwasaki, A., Foxman, E. y Molony, R. (2016). Early local immune defences in the respiratory tract. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 7–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.117>
51. Jensen B., Lisse I., Gerstoft J., Borgeskov S. y Skinhøj P. (1991). Cellular profiles in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-in- fected patients with pulmonary symptoms: relation to diagnosis and prognosis. *AIDS* 5(5): 527–533. <https://doi.org/10.1097/00002030-199105000-00008>
52. Jiyuan, T., Ahmadi, C. y Inthavong, K. (2013). The Human Respiratory System. En *Computational Fluid and Particle Dynamics in the Human Respiratory System*. USA: Springer.
53. Jouve, M., Sol-Foulon, N., Watson, S., Schwartz, O. y Benaroch, P. (2007). HIV-1 Buds and Accumulates in “Nonacidic” Endosomes of Macrophages. *Cell Host & Microbe*, 2(2), 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.06.011>
54. Kelly, M. y Shellito, J. (2010). Current understanding of *Pneumocystis* immunology. *Future Microbiology*, 5(1), 43–65. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.116>
55. Klimas, N., Koneru, A. y Fletcher, M. (2008). Overview of HIV. *Psychosomatic Medicine*, 70(5), 523–530. <https://doi.org/10.1097/psy.0b013e31817ae69f>
56. Koppensteiner, H., Brack-Werner, R., y Schindler, M. (2012). Macrophages and their relevance in Human Immunodeficiency Virus Type I infection. *Retrovirology*, 9(1), 82. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-82>
57. Koziel, H., Eichbaum, Q., Kruskal, B., Pinkston, P., Rogers, R., Armstrong, M. Richards, F., Rose. R. y Ezekowitz, R. (1998). Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation. *The Journal of Clinical Investigation*, 102(7), 1332-1344. <https://doi.org/10.1172/JCI560>
58. Krastinova, E., Lecuroux, C., Leroy, C., Seng, R., Cabie, A., Rami, A., Venet, A., Meyer, L., y Goujard, C. (2015). High Soluble CD14 Levels at Primary HIV-1 Infection Predict More Rapid Disease Progression. *Journal of Infectious Diseases*, 212(6), 909–913. <https://doi.org/doi:10.1093/infdis/jiv145>
59. Lee, J., Park, H., Kim, Y., Yu, S., Chong, Y., Kim, S., Sung, H., Lee, S., Kim, M., Lim, C., Kim, Y., Koh, Y., Woo, J. y Choi, S. (2015). Cellular Profiles of

- Bronchoalveolar Lavage Fluid and Their Prognostic Significance for Non-HIV-Infected Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(4), 1310-136. <https://doi.org/10.1128/JCM.03494-14>
60. Leslie, K. y Wick, M. (2018). *Lung Anatomy. Practical Pulmonary Pathology: A Diagnostic Approach*, 1–14.e2. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-44284-8.00001-6>
61. Lewthwaite, P. y Wilkins, E. (2009). Natural history of HIV/AIDS. *Medicine*, 37(7), 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.04.015>
62. Limper, A., Offord, K., Smith, T., y Martin II, W. (1989). *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Differences in Lung Parasite Number and Inflammation in Patients with and without AIDS. *American Review of Respiratory Disease*, 140(5), 1204–1209. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/140.5.1204>
63. Ling, B., Apetrei, C., Pandrea, I., Veazey, R., Lackner, A., Gormus, B., y Marx, P. A. (2004). Classic AIDS in a Sooty Mangabey after an 18-Year Natural Infection. *Journal of Virology*, 78(16), 8902–8908. <https://doi:10.1128/jvi.78.16.8902-8908.2004>
64. McBride, J. y Striker, R. (2017). Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLOS Pathogens*, 13(11), e1006624. <https://doi:10.1371/journal.ppat.1006624>
65. Marieb, E. y Hoehn, K. (2013). The Respiratory System. En *Human Anatomy & Physiology*, 9th Edition. USA: Pearson.
66. Martin, T. y Frever, C. (2005). Innate Immunity in the Lungs. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 2(5), 403–411. <https://doi.org/10.1513/pats.200508-090js>
67. Mason, G., Hashimoto, C., Dickman, P., Foutty, L. y Cobb, C. (1989). Prognostic Implications of Bronchoalveolar Lavage Neutrophilia in Patients with *Pneumocystis carinii* Pneumonia and AIDS, *American Review of Respiratory Disease*, 139(6), 1336-1342. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/139.6.1336>
68. Maas, S., Soehnlein, O. y Viola, J. (2018). Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02739>

69. Melhuish, A. y Lewthwaite, P. (2018). Natural history of HIV and AIDS. *Medicine*, 46(6), 356–361. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2018.03.010>
70. Meyer, K. (2002). Lung Immunology and Host Defense. En Bittar, E. (Ed.) *Pulmonary Biology in Health and Disease*, USA: Springer.
71. Mindel, A. (2001). ABC of AIDS: Natural history and management of early HIV infection. *BMJ*, 322(7297), 1290–1293. <https://doi.org/10.1136/bmj.322.7297.1290>
72. Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(7), 1283–1299. <https://doi.org/10.1084/jem.20122220>
73. Mogensen, T., Melchjorsen, J., Larsen, C. y Paludan, S. (2010). Review Innate immune recognition and activation during HIV infection. *Retrovirology*, 54(7), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-7-54>
74. Møller, H. (2012). Soluble CD163. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 72(1), 1–13. <https://doi.org/10.3109/00365513.2011.626868>
75. Nicod, L. (1999). Pulmonary Defence Mechanisms. *Respiration*, 66(1), 2–11. <https://doi.org/10.1159/000029329>
76. Norris, K., Morris, A., Patil, S. y Fernandes, E. (2006). Pneumocystis Colonization, Airway Inflammation, and Pulmonary Function Decline in Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Immunologic Research*, 36(1-3), 175–187. <https://doi.org/10.1385/ir:36:1:175>
77. Nyamweya, S., Hegedus, A., Jaye, A., Rowland-Jones, S., Flanagan, K. y Macallan, D. (2013). Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. *Reviews in Medical Virology*, 23(4), 221–240. <https://doi.org/10.1002/rmv.1739>
78. Novitsky, V. y Essex, M. (2012). Using HIV viral load to guide treatment-for-prevention interventions. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 7(2), 117–124. <https://doi.org/10.1097/coh.0b013e32834fe8ff>
79. O'Hare, F., Watson, W., O'Neill, A., Grant, T., Onwuneme, C., Donoghue, V., Mooney, E., Downey, P., Murphy, J., Twomey, A. y Molloy, E. (2015). Neutrophil and monocyte toll-like receptor 4, CD11b and reactive oxygen intermediates and

- neuroimaging outcomes in preterm infants. *Pediatric Research*, 78(1), 82–90.
<https://doi.org/10.1038/pr.2015.66>
80. Opasawatchai, A., Amornsupawat, P., Jiravejchakul, N., Chan-in, W., Spoerk, N. J., Manopwisedjaroen, K., Singhasivanon, P., Yingtaweesak, T., Suraamornkul, S., Mongkolsapaya, J., Sakuntabhai, A., Matangkasombut, P. y Loison, F. (2019). Neutrophil Activation and Early Features of NET Formation Are Associated With Dengue Virus Infection in Human. *Frontiers in Immunology*, 9, 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03007>
81. Owen, J., Punt, J., Stranford, S. y Jones, P. (2014). Células, Órganos y Microambientes del Sistema Inmunitario. En *Kuby Inmunología (7ma ed.)* México: McGraw Hill Education.
82. Paiardini, M. y Müller-Trutwin, M. (2013). HIV-associated chronic immune activation. *Immunological Reviews*, 254(1), 78–101.
<https://doi.org/10.1111/imr.12079>
83. Parisi, S., Andreis, S., Mengoli, C., Menegotto, N., Cavinato, S., Scaggiante, R., Andreoni, M., Palù, G., Basso, M. y Cattelan, A. (2018). Soluble CD163 and soluble CD14 plasma levels but not cellular HIV-DNA decrease during successful interferon-free anti-HCV therapy in HIV-1–HCV co-infected patients on effective combined anti-HIV treatment. *Medical Microbiology and Immunology*, 207(3-4), 183–194. <https://doi:10.1007/s00430-018-0538-1>
84. Pavelka, M. y Roth, J. (2010). Alveoli: Gas Exchange and Host Defense. *Functional Ultrastructure*, 248–249. https://doi.org/10.1007/978-3-211-99390-3_128
85. Peate, I. (2018). Anatomy and physiology of the respiratory system. *British Journal of Healthcare Assistants*. 12(4), 178–181.
<https://doi.org/10.12968/bjha.2018.12.4.178>
86. Pechous, R. (2017). With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00160>
87. Phanuphak, N. y Gulick, R. (2020). HIV treatment and prevention 2019. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 15(1), 4–12.
<https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000588>

88. Rennard, S., Basset, G., Lecossier, D., O'Donnell, K., Pinkston, P., Martin, P. y Crystal, R. (1985). Estimation of volume of epithelial lining fluid recovered by lavage using urea as marker of dilution. *Journal of Applied Physiology*, 60(2), 532–538. <https://doi.org/10.1152/jappl.1986.60.2.532>
89. Rogers, K. (Ed). (2011). *The Respiratory System (Human Body)*. UK: Rosen Educational Publishing.
90. Rosales, C., Demaurex, N., Lowell, C. y Uribe-Querol, E. (2016). Neutrophils: Their Role in Innate and Adaptive Immunity. *Journal of Immunology Research*, 1–2. <https://doi.org/10.1155/2016/1469780>
91. Rossaint, J. y Zarbock, A. (2013). Tissue-Specific Neutrophil Recruitment into the Lung, Liver, and Kidney. *Journal of Innate Immunity*, 5(4), 348–357. <https://doi.org/10.1159/000345943>
92. Ruelas, D. y Greene, W. (2013). An Integrated Overview of HIV-1 Latency. *Cell*, 155(3), 519–529. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.044>
93. Sadaghdar, H. Huang, Z-B. y Eden, E. (1992). Correlation of Bronchoalveolar Lavage Findings to Severity of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in AIDS. Evidence for the Development of High-Permeability Pulmonary Edema. *Chest*; 102(1), 63–69, <https://doi.org/10.1378/chest.102.1.63>
94. Saitoh, T., Komano, J., Saitoh, Y., Misawa, T., Takahama, M., Kozaki, T., Uehata, T., Iwasaki, H., Omori, H., Yamaoka, S., Yamamoto, N. y Akira, S. (2012). Neutrophil Extracellular Traps Mediate a Host Defense Response to Human Immunodeficiency Virus-1. *Cell Host & Microbe*, 12(1), 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.05.015>
95. Sandler, N., Wand, H., Roque, A., Law, M., Nason, M., Nixon, D. E., Pedersen, C., Ruxrungtham, K., Lewin, S., Emery, S., Neaton, J., Brenchley, J., Deeks, S., Sereti, I. y Douek, D. (2011). Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 203(6), 780–790. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq118>
96. Sato, S. y Kiyono, H. (2012). The mucosal immune system of the respiratory tract. *Current Opinion in Virology*, 2(3), 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.009>

97. Sereti, I., y Lane, H. (2001). Immunopathogenesis of Human Immunodeficiency Virus: Implications for Immune-Based Therapies. *Clinical Infectious Diseases*, 32(12), 1738–1755. <https://doi.org/10.1086/320758>
98. Sereti, I. y Altfeld, M. (2016). Immune activation and HIV. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 11(2), 129–130. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000244>
99. Sharp, P. y Hahn, B. (2011). Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), a006841. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006841>
100. Shellito, J. (2004). Failure of Host Defenses in Human Immunodeficiency Virus. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 25(1), 73–84. <https://doi.org/10.1055/s-2004-822307>
101. Shi, X., Sims, M., Hanna, M., Xie, M., Gulick, P., Zheng, Y.-H., Basson, M. y Zhang, P. (2014). Neutropenia during HIV Infection: Adverse Consequences and Remedies. *International Reviews of Immunology*, 33(6), 511–536. <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.893301>
102. Shive, C., Jiang, W., Anthony, D., y Lederman, M. (2015). Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS*, 29(10), 1263–1265. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000735>
103. Simon, V. y Ho, D. (2003). HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nature Reviews Microbiology*, 1(3), 181–190. <https://doi.org/10.1038/nrmicro772>
104. Simon, V., Ho, D. y Abdool Karim, Q. (2006). HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment. *The Lancet*, 368(9534), 489–504. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)69157-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(06)69157-5)
105. Skalski, J., Kottom, T., y Limper, A. (2015). Pathobiology of Pneumocystis pneumonia: life cycle, cell wall and cell signal transduction. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov046. <https://doi:10.1093/femsyr/fov046>
106. Skubitz, K., Campbell, K., y Skubitz, A. (2000). CD63 associates with CD11/CD18 in large detergent-resistant complexes after translocation to the cell surface in human neutrophils. *FEBS Letters*, 469(1), 52–56. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01240-0](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01240-0)

107. Sly, P. y Collins, R. (2008). Applied Clinical Respiratory Physiology. En Taussig, L., Lesouef, P., Martinez, F., Landau, L., Morgan, W. y Sly, P. (Eds.). *Pediatric Respiratory Medicine. 2nd Edition*. USA: Mosby Elsevier.
108. Sokoya, T., Steel, H., Nieuwoudt, M. y Rossouw, T. (2017). HIV as a Cause of Immune Activation and Immunosenescence. *Mediators of Inflammation*, **2017**, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2017/6825493>
109. Steele, C., Shellito, J. y Kolls, J. (2005). Immunity against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis*. *Medical Mycology*, **43(1)**, 1–19. <https://doi.org/10.1080/13693780400015360>
110. Stem Cell Technologies. (2020). Lymphoprep™. Density gradient medium for the isolation of mononuclear cells. Recuperado 30 de agosto de 2020, de https://cdn.stemcell.com/media/files/pis/10000000358-PIS_02.pdf?_ga=2.117272000.732739377.1597545461-1620441065.1597545461
111. Stevenson, M. (2003). HIV-1 pathogenesis. *Nature Medicine*, **9(7)**, 853–860. <https://doi.org/10.1038/nm0703-853>
112. Tasaka, S. (2015). Pneumocystis Pneumonia in Human Immunodeficiency Virus–infected Adults and Adolescents: Current Concepts and Future Directions. *Clinical Medicine Insights: Circulatory, Respiratory and Pulmonary Medicine*, **9(1)**, <https://doi.org/10.4137/ccrpm.s23324>
113. Tayman, C., El-Attug, M., Adams, E., Van Schepdael, A., Debeer, A., Allegaert, K., y Smits, A. (2011). Quantification of Amikacin in Bronchial Epithelial Lining Fluid in Neonates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **55(9)**, 3990–3993. <https://doi.org/10.1128/AAC.00277-11>
114. Therrien, A., Chapuy, L., Bsat, M., Rubio, M., Bernard, G., Arslanian, E., Orlicka, K., Weber, A., Panzini, B., Dorais, J., Bernard, E., Soucy, M., Bouin, M. y Sarfati, M. (2018). Recruitment of Activated Neutrophils Correlates with Disease Severity in Adult Crohn’s Disease. *Clinical & Experimental Immunology*. **195**, 251–264. <https://doi.org/10.1111/cei.13226>
115. Tomashefski, J. y Farver, C. (2008) Anatomy and Histology of the Lung. En Tomashefski, J., Cagle, P., Farver, C. y Fraire, A. *Dail and Hammar’s Pulmonary Pathology. Volume I: Nonneoplastic Lung Disease. 3rd Edition*. USA: Springer.

116. Truong, J. y Ashurst J. (2019). *Pneumocystis (Carinii) Jiroveci Pneumonia*. StatPearls Publishing. Recuperado 26 de abril de 2020, de: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482370/#_NBK482370_pubdet_
117. Turner, B. y Summers, M. (1999). Structural biology of HIV. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 1–32. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2354>
118. Twigg III, H., Weiden, M., Valentine, F., Schnizlein-Bick, C., Bassett, R., Zheng, L., Wheat, J., Day, R., Rominger, H., Collman, R., Fox, L., Brizz, B., Dragavon, J., Coombs, R. y Bucy, P. (2008). Effect of Highly Active Antiretroviral Therapy on Viral Burden in the Lungs of HIV-Infected Subjects. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(1), 109–116. <https://doi.org/10.1086/523766>
119. UNAIDS. (2019). Global HIV & AIDS statistics — 2019 fact sheet. Recuperado 6 de abril de 2020, de <https://www.unaids.org/en/resources/fact-sheet>
120. Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. y Zychlinsky, A. (2006). Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cellular Microbiology*, 8(4), 668–676. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00659.x>
121. Utay, N. y Hunt, P. (2016). Role of immune activation in progression to AIDS. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 11(2), 131–137. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000242>
122. Wang, J., Wright, T. y Gigliotti, F. (2011). Immune Modulation as Adjunctive Therapy for *Pneumocystis pneumonia*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2011, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2011/918038>
123. Wang, R., Moore, J., Moisi, D., Chang, E., Byanyima, P., Kaswabuli, S., Musisi, E., Sanyu, I., Sessolo, A., Lalitha, R., Worodria, W., Davis, J., Crothers, K., Lin, J., Lederman, M., Hunt, P. y Huang, L. (2019). HIV infection is associated with elevated biomarkers of immune activation in Ugandan adults with pneumonia. *PLOS ONE*, 14(5), e0216680. <https://doi:10.1371/journal.pone.0216680>
124. Wauth, A. y Grant, A. (2014). The respiratory system. En *Ross and Wilson. Anatomy and Physiology in Health and Illness. 12th Edition*. USA: Elsevier
125. World Health Organization. (2020). Global Health Observatory (GHO) data. Recuperado 6 de abril de 2020, de <https://www.who.int/gho/hiv/en/>

126. Yaseen, M., Abuharfeil, N., Yaseen, M. y Shabsoug, B. (2017). The role of polymorphonuclear neutrophils during HIV-1 infection. *Archives of Virology*, 163(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3569-9>