



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y NÓDULOS LINFÁTICOS
DE PERSONAS INFECTADAS POR VIH

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:
PALOMA CARRANZA PÉREZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. GUSTAVO REYES TERÁN (FACULTAD DE MEDICINA)

COMITÉ TUTOR:
DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO (INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS)
DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO (FACULTAD DE MEDICINA)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

FEBRERO 2017



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.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	4
Resumen.....	5
1. Introducción.....	7
1.1 Infección por VIH.....	7
1.1.1 Impacto global.....	7
1.1.2 Historia natural de la infección.....	7
1.2 Células dendríticas.....	12
1.2.1 Generalidades de las células dendríticas.....	12
1.2.2 Subtipos de células dendríticas.....	15
1.2.3 Función de las células dendríticas.....	16
1.3 Células dendríticas en la infección por VIH.....	21
1.3.1 Reconocimiento del virus y transmisión mediado por las células dendríticas.....	21
1.3.2 Restricción del VIH en las células dendríticas.....	23
1.3.3 Fenotipo y función de las células dendríticas en la infección por VIH.....	24
1.3.4 Células dendríticas y su papel en la inmunopatogénesis del VIH.....	28
1.3.5 Células dendríticas, prevención y terapia.....	30
2. Planteamiento del problema.....	32
3. Objetivos.....	33
4. Materiales y métodos.....	34
4.1 Sujetos de estudio.....	34
4.2 Muestras de nódulo linfático y sangre periférica.....	34
4.3 Análisis fenotípico de las células dendríticas por citometría de flujo.....	35

4.4 Determinación de la producción de citocinas de las células dendríticas.....	37
4.5 Análisis de polifuncionalidad de las células dendríticas.....	39
4.6 Determinación de la carga viral y conteo de linfocitos T CD4.....	39
4.7 Análisis estadístico.....	39
5. Resultados.....	42
5.1 Frecuencia de células dendríticas en sangre periférica y nódulos linfáticos de personas infectadas por VIH.....	42
5.2 Análisis fenotípico de células dendríticas convencionales.....	45
5.3 Asociaciones con la carga viral y PD-L1 en células dendríticas convencionales.....	50
5.4 Análisis fenotípico de células dendríticas plasmacitoides.....	51
5.5 Asociaciones con la carga viral en células dendríticas plasmacitoides.....	53
5.6 Análisis funcional de células dendríticas convencionales: producción de citocinas.....	54
5.7 Asociaciones con la carga viral y producción de citocinas en células dendríticas convencionales.....	59
5.8 Análisis funcional de células dendríticas plasmacitoides: producción de citocinas.....	60
5.9 Asociaciones con la carga viral y producción de citocinas en células dendríticas plasmacitoides.....	65
5.10 Polifuncionalidad de las células dendríticas convencionales.....	66
5.11 Polifuncionalidad de las células dendríticas plasmacitoides.....	69
6. Discusión de resultados.....	73
7. Conclusiones.....	88
8. Bibliografía.....	89
Anexos.....	101

Abreviaturas

VIH	Virus de la inmunodeficiencia adquirida
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
CD	Células dendríticas
CDp	Células dendríticas plasmacitoides
CDc	Células dendríticas convencionales
CDDM	Células dendríticas derivadas de monocitos
CVp	Carga viral en plasma
SP	Sangre periférica
NL	Nódulo linfático
LT	Linfocito(s) T
TARc	Tratamiento antirretroviral combinado
MGIF	Media geométrica de la intensidad de fluorescencia
FMO	del inglés fluorescence minus one
TLR	del inglés toll-like receptor
LPS	Lipopolisacárido
ssRNA	del inglés single stranded ribonucleic acid
PNH	Primates no humanos
VIS	Virus de inmunodeficiencia en simios
HLA-DR	del inglés human leukocyte antigen DR

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS DENDRÍTICAS OBTENIDAS DE SANGRE PERIFÉRICA Y NÓDULOS LINFÁTICOS DE PERSONAS INFECTADAS POR VIH.

Resumen

Las células dendríticas (CD) constituyen una población heterogénea de células de la inmunidad innata primordiales para el inicio de la respuesta inmunológica contra patógenos y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa. Las CD son potentes presentadoras de antígeno y pueden modular la respuesta inmune antiviral. Su papel en la inmunidad contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) continúa sin esclarecerse. Los reportes acerca del fenotipo y funcionalidad de las CD durante la infección por VIH continúan siendo controversiales. Dada la importancia de la función de las CD, en este trabajo se determinó la expresión de proteínas relevantes para la presentación de antígeno y la regulación de la activación de los LT (linfocitos T), así como también se determinó la producción de citocinas producidas por las CD convencionales (CDc) y plasmacitoides (CDp) de sangre periférica (SP) y nódulos linfáticos (NL) de personas infectadas por VIH. En este trabajo se discute la relevancia de las CD en la patología y la progresión de la infección por VIH, ya que nuestros resultados demuestran que las CD de NL de individuos VIH+ tienen un fenotipo activado y podrían contribuir al microambiente inflamatorio del NL afectando la activación de los LT. Las CDp de individuos VIH+ no solo producen IFN- α sino también TNF- α

después de ser estimuladas con ligandos de TLR, mientras que las CDc producen IL-12 y TNF- α pero también aumentan la expresión de PD-L1. Este hallazgo no solo ayuda en entender el papel de las CDc en la infección por VIH sino que puede tener un impacto importante en el uso de anticuerpos bloqueadores contra PD-1 o PD-L1 como terapia alternativa para rescatar a los LT exhaustos. Además, los resultados presentados en este trabajo podrían tener implicaciones en el uso de terapias inmunológicas basadas en CD, ya que el NL es el sitio anatómico dónde ocurre la presentación de antígeno. En conclusión, observamos que tanto las CDc como las CDp de personas con VIH tienen un fenotipo activado, es decir expresan marcadores de activación y proteínas co-estimuladoras, y además funcionalmente son capaces de producir citocinas en respuesta a distintos ligandos de TLR.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Infección por VIH

1.1.1 Impacto global de la infección por VIH

A más de 30 años de su descubrimiento como agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la epidemia por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) continúa siendo un problema de salud a nivel mundial, impactando a su vez, otras áreas como la social, la política y económica (ONUSIDA, 2015). En su último reporte, la ONUSIDA estimó que existen en el mundo más de 36.7 millones de personas infectadas por el virus, afectando por igual a hombres y mujeres (ONUSIDA, 2015). Además, se notificaron 2.1 millones de nuevas infecciones por VIH a nivel mundial y 1.1 millones de defunciones relacionadas con el SIDA en el año 2015 (ONUSIDA, 2015). En el mismo año, aproximadamente 17 millones de personas tuvieron acceso a la terapia antiretroviral, lo que representa el 46% de todas las personas que viven con VIH en el mundo (ONUSIDA, 2015). En México, al 2015, se estimó que existen 126,309 personas infectadas y aproximadamente 4,763 defunciones a causa del SIDA en el año 2014 (CENSIDA, 2015). En México, la epidemia se mantiene en poblaciones clave como son hombres que tienen sexo con hombres, hombres trabajadores del sexo y las personas que usan drogas inyectadas (CENSIDA, 2014).

1.1.2 Historia natural de la infección por VIH

La infección por el VIH se caracteriza por la pérdida progresiva de los linfocitos T (LT) CD4+. El VIH es un lentivirus de la familia retroviridae que tiene como principal blanco de infección a los LT CD4+, aunque también puede infectar otras células como a las células dendríticas, monocitos y macrófagos (Laforge et al., 2011, Smed-Sorensen et al., 2004, Granelli-Piperno et al., 2004, McElrath et al., 1991). Para entrar a las células el virus utiliza el receptor CD4 y los co-receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5. El número de LT CD4+ en sangre y la carga viral (copias de ARN viral en plasma) son parámetros clínicos que se utilizan para monitorear el estado inmunológico de las personas con VIH con respecto al tiempo. Estos parámetros también son útiles para describir la historia natural de la infección por VIH, en tres etapas principalmente, la etapa aguda, la etapa crónica y la etapa de SIDA (en personas sin tratamiento antirretroviral) (figura 1, línea azul y verde). Además de dichos parámetros clínicos, la historia natural de la infección por VIH se puede explicar detallando el número de LT CD4+ del intestino y la activación inmune crónica (figura 1, línea morada y roja respectivamente) (Grossman et al, 2006). Durante las primeras semanas posteriores a la exposición al virus, la carga viral en plasma aumenta rápidamente al mismo tiempo que el número de LT CD4+ en sangre e intestino disminuye drásticamente (Brenchley et al., 2004, Grossman et al., 2006). Durante la etapa aguda, entre el 25 y el 90% de los individuos recién infectados refieren tener dolor de cabeza, mareos, fiebre, diarrea entre otros síntomas parecidos a los de una gripe los cuales, en conjunto, se conocen como síndrome retroviral agudo (Braun et al., 2014). Al final de la

etapa aguda, la carga viral comienza a disminuir hasta llegar a un punto de equilibrio, mientras que el número de LT CD4+ en sangre se recupera parcialmente (Grossman et al., 2006) (figura 1, línea azul). La disminución observada en la carga viral en plasma al final de la etapa aguda se debe a la respuesta del sistema inmunológico, principalmente a la activación de los LT CD8+ o LT citotóxicos (figura 1, línea verde) (Grossman et al., 2006). Es importante mencionar que en la etapa aguda, el número de LT CD4+ del intestino disminuye dramáticamente y no se recupera en ningún momento (figura 1, línea morada) (Brenchley et al., 2004, Estes et al., 2008). La pérdida de los LT CD4+ del intestino promueve alteraciones en la barrera intestinal lo que provoca la traslocación de productos bacterianos del lumen del intestino hacia la circulación sanguínea (Brenchley et al., 2006). Este fenómeno es una de las causas de la activación crónica del sistema inmunológico y se observa desde la etapa temprana de la infección (figura 1, línea roja) (Brenchley et al., 2006). Durante la etapa crónica o asintomática, la carga viral y el número de LT CD4+ se mantiene constante durante un periodo aproximado de ocho a diez años (figura 1) (Grossman et al., 2006). Si la persona no recibe tratamiento antirretroviral, el número de LT CD4+ disminuye al grado de producir inmunodeficiencia severa y por ende la aparición de enfermedades oportunistas. La etapa de SIDA puede durar dos a tres años en promedio (figura 1) (Grossman et al., 2006).

Durante los primeros días posteriores a la exposición al VIH, el virus es llevado por las CD a los NL drenantes más cercanos a la ruta de entrada del virus. El NL se convierte en una especie de fábrica de virus ya que en él residen

cuantiosos números de células blanco de infección (Pantaleo et al., 1994). La presencia del virus en el NL y su replicación en los LT CD4+, promueve la infiltración de otras células del sistema inmune que, a su vez, inducen procesos inflamatorios en el NL y la activación de más células del sistema inmunológico, lo que provoca la hiperplasia del NL (Estes, 2013, Pantaleo et al., 1994).

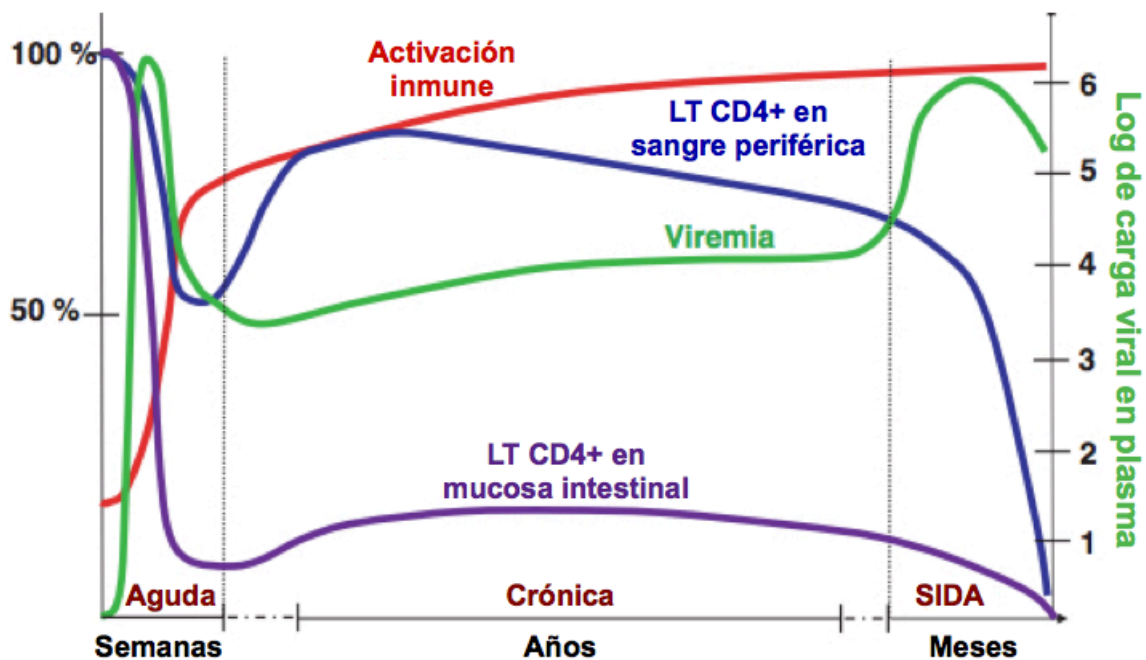


Figura 1. Historia natural de la infección por VIH. Modificado de Grossman *et al.*, 2006.

El virus, al no erradicarse en una persona infectada, promueve la producción de citocinas y la inflamación crónica en el NL. A su vez, la respuesta anti inflamatoria mediada por LT reguladores que producen IL-10 y TGF- β , promueve la producción de colágeno desde la etapa temprana de infección. Este proceso constante que promueve la deposición de colágeno (Zeng et al., 2012, Zeng et al., 2011, Schacker et al., 2002) con la consecuente pérdida de la estructura o arquitectura del NL, lo que favorece de manera importante el colapso del sistema inmunológico (figura 2) (Estes, 2013, Schacker et al., 2002).

La activación inmunológica crónica es una característica particular de la infección por VIH y uno de los mejores predictores de la progresión a SIDA (Sodora and Silvestri, 2008). Es un factor que distingue la infección patogénica y no patogénica en modelos con primates no humanos (PNH) infectados con el virus de la inmunodeficiencia en simios (VIS) (Sodora and Silvestri, 2008). Existen huéspedes naturales del VIS como los simios "sooty mangabey" (*Cercocebus atys*), los cuales no progresan a SIDA y no presentan activación inmunológica crónica a pesar de tener niveles elevados de replicación viral (Mir et al., 2012, Bosinger et al., 2011, Sodora et al., 2009).

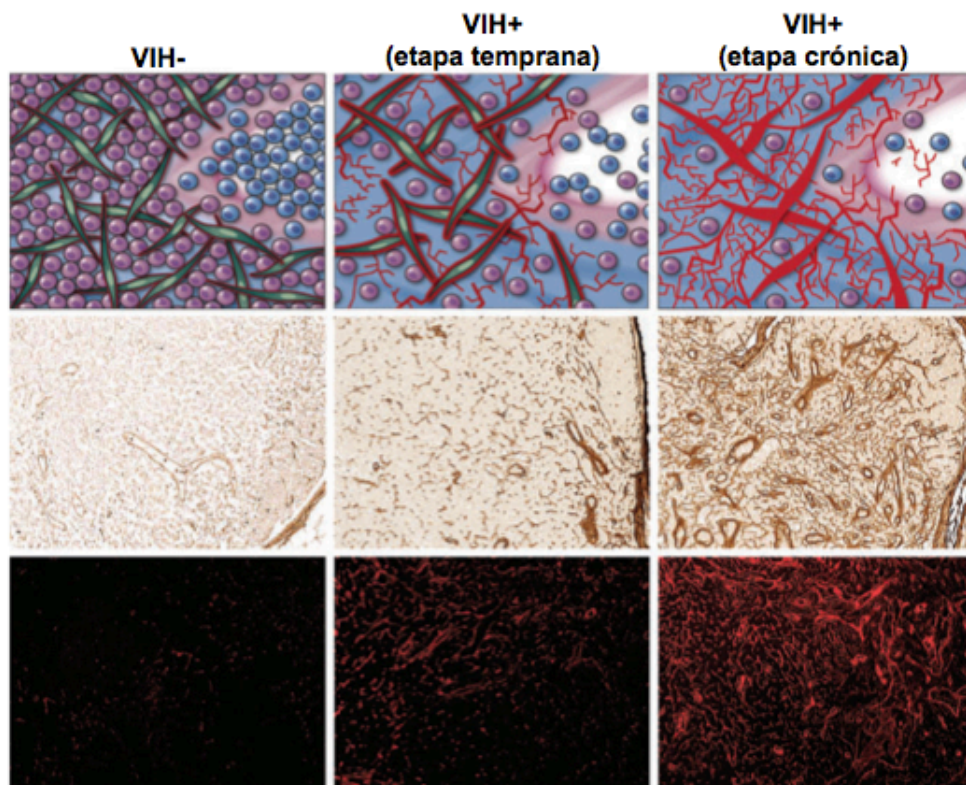


Figura 2. Patogénesis del VIH en el nódulo linfático. Modificado de Estes *et al*, 2013. En la primera columna de la figura se muestra esquematizada la estructura del NL en una persona no infectada (VIH-), la segunda columna representa el NL de un individuo infectado (VIH+) en etapa temprana y la tercera columna representa el NL de un individuo en etapa crónica. En la segunda fila se muestra una inmunohistoquímica del NL, en café se observa la tinción de colágeno y como éste se acumula conforme progresa la infección. En la tercera fila se muestra una microscopía de fluorescencia

del NL, en color rojo se observa la tinción de fibronectina y su acumulación en estadios avanzados de la infección por VIH.

Por otro lado, los macacos rhesus (*Macaca mulatta*), al ser infectados por el VIS desarrollan la patogénesis del virus similar a los humanos, es decir, la pérdida progresiva de LT CD4+, activación inmune crónica y progresión a SIDA (Bosinger et al., 2011, Pandrea et al., 2008).

Como ya se mencionó anteriormente, una de las causas de la activación inmune crónica es la traslocación bacteriana, en la cual las bacterias que se encuentran en el lumen del intestino pasan a la circulación sanguínea. La presencia de otros patógenos además del virus promueve un estado de activación constante en las células del sistema inmunológico. La activación inmune crónica induce la activación policlonal de los linfocitos B, aumento en el recambio de LT, mayor frecuencia de LT con fenotipo activado y mayores niveles de citocinas (como IL-6 y TNF- α) y quimiocinas proinflamatorias en plasma de personas con VIH (Sodora and Silvestri, 2008).

1.2 Células dendríticas

1.2.1 Generalidades de las células dendríticas

Las células dendríticas (CD) son consideradas el puente que une a la inmunidad innata con la adaptativa, son las principales células presentadoras de antígeno, lo cual las convierte en reguladoras del inicio de la respuesta inmune adaptativa. Su importancia radica en la capacidad que tienen de capturar y procesar

antígenos, los cuales, posteriormente son presentados a los LT en los órganos linfoides secundarios (Banchereau et al., 2009, Banchereau and Steinman, 1998).

Las CD constituyen un grupo de células heterogéneas cuyas diferencias radican en su localización, estado de maduración y función (Merad and Manz, 2009). En humanos, las CD de sangre periférica han sido las más estudiadas y se han clasificado principalmente en dos subtipos: las CD convencionales (CDc) y las CD plasmacitoides (CDp) (Merad and Manz, 2009). Ambas subpoblaciones se caracterizan por la ausencia de marcadores de otros linajes celulares como los de LT, monocitos, macrófagos, células B y células NK (CD3-, CD14-, CD19-, CD20- y CD56-) y expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC, del inglés major histocompatibility complex), como HLA-DR (Sato and Fujita, 2007). Tanto las CDc como las CDp expresan diversos receptores que les permiten reconocer patrones moleculares asociados a patógenos, entre estos receptores se encuentran los tipo toll (TLR, del inglés toll-like receptors) y las lectinas tipo C (Mellman, 2013).

Las CD se encuentran en casi todos los tejidos y constantemente detectan la presencia de patógenos. En ausencia de infecciones, las CD poseen un fenotipo inmaduro caracterizado por la expresión baja de proteínas co-estimuladoras (CD80 y CD40) y de adhesión como CD54; la expresión de receptores para quimiocinas inflamatorias (CXCR1, CCR1, CCR2 y CCR5), así como de receptores para antígenos bacterianos y del complemento (Lanzavecchia and Sallusto, 2000). Una vez que las CD reciben estímulos de maduración, tales como citocinas inflamatorias o los producidos por patógenos, éstas capturan y procesan el antígeno para después

comenzar el proceso de maduración. Al tiempo en que las CD van madurando, migran hacia el NL, proceso facilitado por un cambio en la expresión de receptores a quimiocinas (Sallusto and Lanzavecchia, 2000) e incrementado por señales inflamatorias (Randolph et al., 2008). El proceso de maduración implica la disminución de la capacidad endocítica, el aumento de la expresión del MHC clase II, el aumento en la expresión de proteínas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD86, la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1, -6, -12, -18, -23, TNF- α e IFN- α , y el incremento en la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 (Mellman, 2013). Este último facilita la migración de las CD hacia el NL, lugar donde realizan la presentación de antígeno a los LT (Förster et al., 2008). Se conoce que las CD comienzan a expresar el receptor CCR7 que las hace responder a un estímulo quimiotáctico generado por un gradiente de concentración de las quimiocinas CCL21 y CCL19 (producidas por las células de las venas linfáticas iniciales y terminales de los NL y por CD maduras, respectivamente) (Randolph et al., 2008). Así, después de recibir un estímulo de maduración, las CD que circulan en sangre migran y se acumulan en la zona paracortical del NL, que es una zona rica en LT (Sallusto and Lanzavecchia, 2000). Los inductores de maduración de las CD mejor caracterizados incluyen los ligandos de TLR, citocinas, la interacción con células NKT, NK y linfocitos gamma-delta, así como proteínas inducidas por la interacción de las CD con LT activados (CD40-CD40L) (Banchereau and Steinman, 1998). Una vez que las CD se localizan en tejidos linfoides como el bazo o el NL, éstas son capaces de activar a LT (Adema et al., 1997). De esta manera, se puede decir que el fenotipo “funcional” de una CD madura involucra la reducción en la

capacidad de captura del antígeno, la expresión de proteínas co-estimuladoras, la producción de ciertas citocinas, como IL-12, IL-18 y TNF- α , y el aumento en la capacidad estimuladora de los LT. Además de las proteínas co-estimuladoras y las citocinas que inducen la activación de un LT vírgen, la regulación de la activación de los LT en el NL, depende de señales inducidas por moléculas co-inhibidoras (PD-L1 y PD-L2) expresadas en la CD (Okazaki and Honjo, 2007). Se considera que si una CD expresa moléculas de MHC-II pero no expresa adecuadamente moléculas co-estimuladoras y tampoco es capaz de producir citocinas, esta célula inducirá tolerancia inmunológica (Steinman et al., 2003). Recientemente, se ha propuesto que la tolerancia inmune está relacionada con la expresión de moléculas co-inhibidoras de la familia B7-H1 (PD-L1) (Fife et al., 2009), es decir, que depende de receptores inhibidores de la señalización más que de la ausencia de marcadores de maduración expresados en la CD. Por tanto, las CD no sólo pueden activar a los LT específicos ante la presencia de patógenos, sino que también son capaces de regular la activación inmune al inducir LT reguladores e incluso pueden inducir anergia o muerte celular en aquellos LT autoreactivos y contribuir a la tolerancia periférica (Banchereau and Steinman, 1998).

1.2.2 Subtipos de células dendríticas

Las CD de sangre periférica se han clasificado principalmente en dos tipos, las convencionales (CDc) y las plasmacitoides (CDp) (Sato and Fujita, 2007). Las CDc pueden originarse tanto de precursores mieloides como linfoides y se caracterizan por ser CD33+, CD11c+ y HLA-DR+ (O'Doherty et al., 1994, Sato and

Fujita, 2007). Las podemos encontrar en órganos linfoides primarios y secundarios, así como en órganos no linfoides. Pueden realizar funciones de procesamiento de antígenos y, después de su estimulación, producen citocinas como IL-12 e IL-18 (Sato and Fujita, 2007, Dzionek et al., 2000, Ueno et al., 2007) y promueven la polarización de los LT hacia respuesta Th1 (respuesta inflamatoria) (Langenkamp et al., 2000) o hacia Th2 (Na et al., 2016). Por otro lado, las CDp se localizan en sangre periférica y órganos linfoides (representan 0.2 al 0.8% de las células mononucleares periféricas), expresan CD123, BDCA-2 y BDCA-4 (Dzionek et al., 2000, O'Doherty et al., 1994). Las CDp expresan los receptores CXCR4 y CCR5, los cuales son co-receptores de internalización del VIH (Zhang et al., 1997, Vicenzi et al., 2013, Gorry and Ancuta, 2011). Estas células migran de la sangre hacia tejido linfoides secundario; son las principales productoras de IFN- α en humanos, pueden producir hasta 1000 veces más IFN- α que otras células durante las infecciones virales, por ello su relevancia en la respuesta inmunológica contra los virus (Colonna et al., 2004, Ueno et al., 2007, Diebold et al., 2003, Stetson and Medzhitov, 2006, Lehmann et al., 2008, Siegal et al., 1999). Las dos subpoblaciones de CD también se distinguen por la expresión de receptores TLR y por las citocinas que producen una vez activadas. Mientras que las CDc expresan TLR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8 y -10 y producen IL-12 y TNF- α , las CDp expresan TLR-7 y -9 y son capaces de secretar IFN- α y otras citocinas pro-inflamatorias como IL-6 y TNF- α después de la estimulación de sus TLR (Jarrossay et al., 2001, Kadowaki et al., 2001).

1.2.3 Función de las células dendríticas

Además de las diferencias mencionadas en la expresión de receptores, existen diferencias en la función de las CDc y CDp. Las CDc se ha considerado las principales células presentadoras de antígeno e inductoras de la respuesta de LT, mientras que las CDp las principales productoras de IFN- α ante estímulos virales (Siegal et al., 1999). El sitio anatómico donde las CDc llevan a cabo su función (presentación de antígeno) es en el tejido linfoide como el NL (Buettner and Bode, 2012), mientras que las CDp pueden ejercer su función en otros tejidos inflamados o infectados además del NL (Swiecki and Colonna, 2015).

Durante la presentación de antígeno se requiere de ciertas señales que la CDc provee al LT para su activación como: 1) antígenos, que corresponden a péptidos derivados de proteínas bacterianas, virales o endógenas, unidas a proteínas del MHC y que son reconocidos por el TCR (por sus siglas en inglés T cell receptor) (figura 3) (Davis and Bjorkman, 1988, Gonzalez et al., 2005, Kalergis et al., 2001) y 2) proteínas co-estimuladoras, que no son antígeno-específicas, tales como CD40, CD80 y CD86 que son reconocidas por el LT vírgen mediante receptores como CD40L y CD28 como se muestra en la figura 3 (Lenschow et al., 1996, Schwartz et al., 2002, Elgueta et al., 2009). El reconocimiento de estas dos señales moleculares en la superficie de la CD por el LT conduce a la formación de la sinapsis inmunológica (Grakoui et al., 2015) (Figura 3). Además, se requiere de una tercera señal que polariza la activación del LT hacia una respuesta de tipo Th1 o Th2, la cual involucra mediadores solubles, es decir, citocinas secretadas por la CDc en la sinapsis inmunológica, por ejemplo la IL-1, TNF- α , IL-18 e IL-12 (Kalinski et al., 1999). Las proteínas presentes en la sinapsis inmunológica son necesarias

para la activación del LT ya que permiten la proliferación, expansión y diferenciación de LT antígeno-específicos, los que finalmente se encargarán de eliminar al patógeno. Este proceso da inicio a la respuesta inmune adaptativa antígeno-específica mediada por LT (Kalergis et al., 2004).

El resultado de la activación de un LT depende en parte de las señales que provee la CD a través de las proteínas co-estimuladoras y co-inhibidoras (Steinman, 2003). Las proteínas CD40 y CD83 expresadas en la superficie de las CD se consideran marcadores de activación, ya que su expresión se regula positivamente una vez que la CD recibió señales de maduración al entrar en contacto con patógenos (O'Sullivan and Thomas, 2003, Prechtel and Steinkasserer, 2007).

Además, la unión de CD40 con su ligando (CD40L) promueve la sobrevivencia de las CD, la liberación de citocinas y la expresión de moléculas co-estimuladoras (Elgueta et al., 2009, van Kooten and Banchereau, 2000) mientras que la función de CD83 en la activación del LT es aún controversial, pero se ha descrito como inhibidora de la proliferación del LT (Lechmann et al., 2002). Es importante mencionar que el nivel de expresión de CD86 en una CDc es elevado y se expresa de manera constitutiva (Ni and O'Neill, 1997). La función tanto de CD80 como de CD86 expresado en la CD al unirse con su ligando CD28 en el LT, induce la secreción de citocinas por parte del LT (Porciello and Tuosto, 2016).

Además de las señales de co-estimulación, existen señales de co-inhibición que regulan negativamente la activación del LT por parte de la CD. Algunas de las proteínas más estudiadas involucradas en esta regulación son PD-L1 y PD-L2, expresados en la CD que se unen a su ligando PD-1 expresado en el LT (Okazaki and Honjo, 2007).

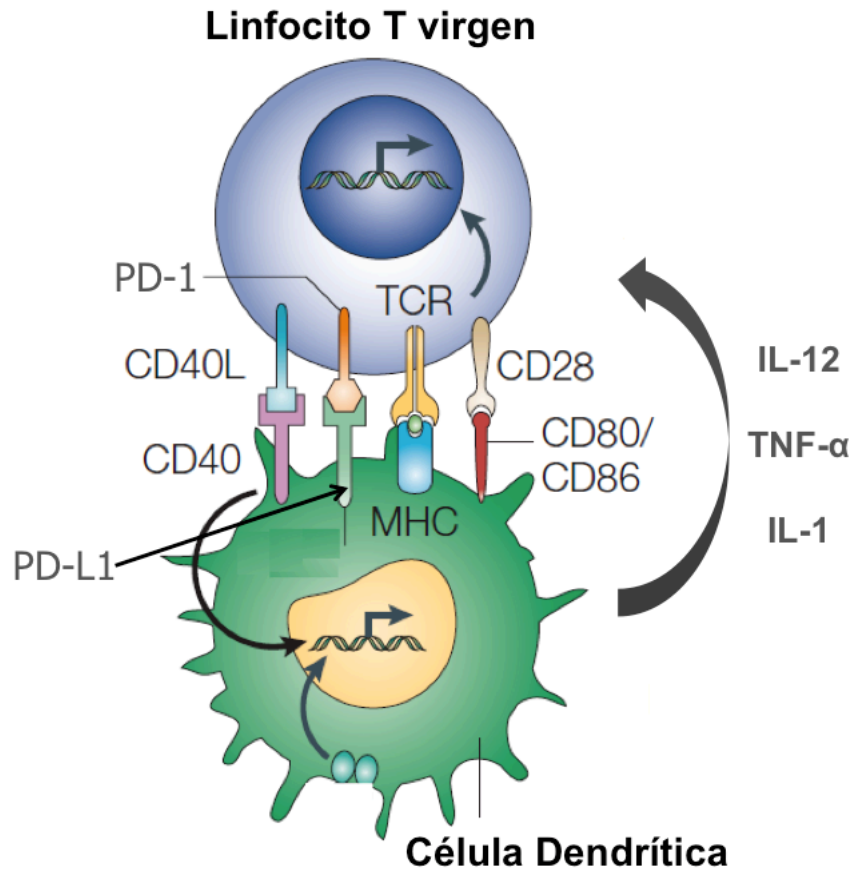


Figura 3. Activación de un LT en el NL. Modificado de Sugamura *et al.* 2004. Imagen representativa de una sinapsis inmunológica entre una CD y un LT en el NL. Señal 1: unión del MHC-péptido expresado en la CD con el TCR específico para el péptido expresado en el LT. Señal 2: co-estimulación, unión de las proteínas CD40, CD80 y CD86 en la CD con sus respectivos ligandos en el LT, CD40L y CD28; co-inhibición, unión de PD-L1 en la CD con PD-1 en el LT. Señal 3: secreción de citocinas tales como IL-12, TNF- α e IL-1.

La unión de PD-1 con su ligando PD-L1 modula negativamente la señalización a través del TCR durante la activación del LT naive (figura3) (Keir et al., 2007), además tiene un efecto inhibitor en las funciones efectoras del LT, en la proliferación y producción de citocinas (Keir et al., 2007, Nurieva et al., 2006).

Por otro lado, las CDp también son un factor importante que une la respuesta inmune innata con la adaptativa. En la figura 4 se resumen las diversas

funciones que de las CDp pueden ejercer (Swiecki and Colonna, 2015). La principal función que se ha descrito de las CDp es la de secretar IFN- α durante las infecciones virales (Siegal et al., 1999). Su capacidad de producir rápidamente IFN- α promueve un estado antiviral en el organismo, ya que induce la expresión de genes estimulados por interferón y la apoptosis de las células infectadas (Gessani et al., 2014). Más aún, las citocinas secretadas por la CDp, IFN- α , IL-12 e IL-18, intensifican la activación de las células NK y las funciones efectoras como la secreción de IFN- γ y la lisis celular (Dalod et al., 2002). Aunque son menos eficientes que las CDc para presentar antígeno, se ha reportado que también pueden activar a LT CD4 y CD8, ya que expresan MHC clase I y II, CD40, CD80 y CD86 (Villadangos and Young, 2008). La producción de IFN- α e IL-12 por parte de las CDp promueve las funciones efectoras de los LT CD8 así como también la polarización de los LT CD4 hacia células Th1 (Dalod et al., 2002, Mouries et al., 2008, Tough, 2012). La expresión de IDO e ICOSL en la CDp induce LT reguladores o LT Th17 respectivamente (Ito et al., 2007, Munn et al., 2004). Además, la expresión de TRAIL y la producción de Granzima B le confiere a la CDp la capacidad de matar células tumorales e inducir apoptosis en LT CD4 infectados y suprimir la proliferación de LT (Jahrsdorfer et al., 2010). Finalmente, la secreción de quimiocinas tales como CCL3, CCL4, CXCL8 y CXCL10 por parte de las CDp, permite el reclutamiento de otras células del sistema inmune hacia el sitio de inflamación o infección (Swiecki and Colonna, 2015).

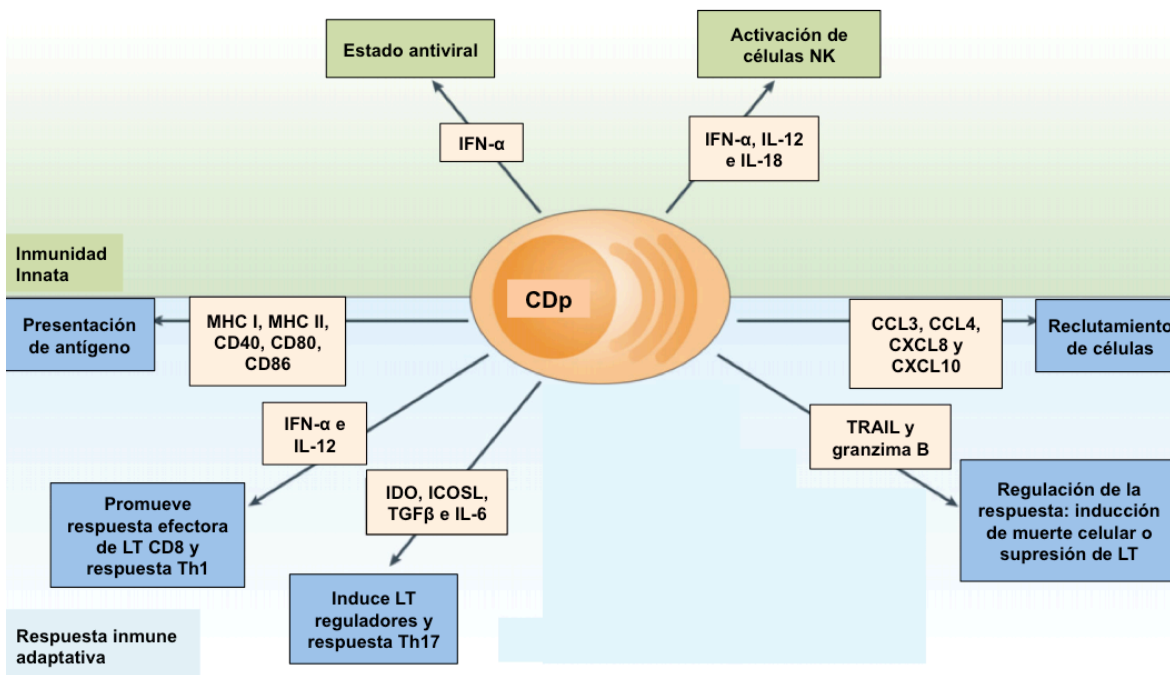


Figura 4. Resumen de las diversas funciones que las CDp pueden ejercer.
Modificado de Swiecki y Colonna, 2015.

1.3 Células dendríticas en la infección por VIH

1.3.1 Reconocimiento del virus y transmisión mediado por células dendríticas

Las CD se encuentran ampliamente distribuidas en todo el organismo y, debido a su localización, se ha propuesto que son las primeras células que entran en contacto con el VIH. Son capaces de reconocer al virus a través de receptores como los TLR (TLR-3, -7 y -8) y los receptores de tipo lectinas (Langerina, DCIR, DC-SIGN, Siglec-1 y BDCA-2), pueden activarse y migrar hacia órganos linfoides secundarios para iniciar una respuesta inmune específica contra el virus. Sin embargo, se ha observado que las CDc pueden mediar la diseminación del VIH hacia los órganos linfoides y establecer una infección permanente, ya que el NL es

el sitio donde el virus encuentra su principal blanco de infección, los LT CD4+ (Blanchet et al., 2011). Existen dos formas en que las CD pueden transmitir el virus a los LT, la más estudiada, ocurre sin que la CD sea infectada por el virus y se denomina infección *en trans* o *trans infección* (Kijewski and Gummuluru, 2015), mientras que la otra implica la infección productiva de la CD y se denomina infección *en cis* (Burleigh et al., 2006). La primera, implica la captura del virus por la CD a través de una lectina tipo C llamada Siglec-1 y su transporte a vesículas no lisosomales, es decir, no hay degradación del virus, por tanto al llegar al NL la CD transmite este virus a los LT (Kijewski and Gummuluru, 2015, Izquierdo-Useros et al., 2012). También se ha reportado que la proteína gp120 del VIH tiene afinidad por el receptor DC-SIGN expresado en las CD, que al unirse a gp120, induce la endocitosis del virus, pero éste en lugar de ser degradado es retenido en compartimentos endosomales tempranos, y al migrar hacia el NL la CD puede liberar el virus a LT no infectados creando una sinapsis infecciosa (Geijtenbeek et al., 2000). La segunda forma de transmisión del VIH, aunque ha sido menos estudiada que la primera, implica la infección productiva de la CD, es decir, desde la entrada del virus hasta la formación de viriones *de novo* y su liberación a los LT en el NL creando una sinapsis infecciosa (Burleigh et al., 2006, Turville et al., 2003, Dong et al., 2007).

La interacción entre la CD y el LT en el tejido linfoide es crítica para la generación de respuesta inmune específica, aunque inadvertidamente ésta interacción promueve la replicación del VIH-1 y la transmisión entre células (Cameron et al., 1992). El estudio de la interacción entre la CD y el VIH ha sido de gran importancia para desarrollar posibles estrategias terapéuticas que prevengan

dicha transmisión sin afectar la generación de respuesta inmune (Blanchet et al., 2011).

1.3.2 Restricción del VIH en células dendríticas

Las CD son susceptibles a la infección por el VIH ya que expresan los receptores usados por el virus para entrar a la célula (CD4, CCR5 y CXCR4), sin embargo la infectividad en éstas células es muy baja comparada con los LT CD4+ debido a que las CD expresan diversos factores de restricción viral que bloquean el ciclo de replicación del VIH en distintas etapas (Smed-Sorensen et al., 2005). Los factores de restricción viral que expresan las CD son APOBEC3G/3F (por sus siglas en inglés, apolipoprotein B mRNA-editing enzyme-catalytic pypeptide-like 3G/3F), TRIM-5 α (por sus siglas en inglés, tripartite motif 5 α), BST-2 o teterina (por sus siglas en inglés, bone marrow stromal cell antigen-2) y SAMHD1 (por sus siglas en inglés, sterile α motif and HD-domain containing 1) (Manches et al., 2014). APOBEC3G tiene un dominio citidin deaminasa el cual induce hipermutaciones durante la transcripción reversa del virus, es decir, induce cambios en la guanina y la convierte en una adenina, lo cual inhibe la replicación del virus (Pion et al., 2006). Por otro lado, TRIM-5 α se une a la cápside del virus durante la entrada e induce su desensamble antes de que se lleve a cabo la transcripción reversa (Grutter and Luban, 2012). Otro factor de restricción inducible por IFN- α es la BST-2 o teterina, la cual bloquea la gemación o liberación de los nuevos viriones (Coleman et al., 2011). Por último, SAMHD-1 es el principal factor de restricción en células mieloides, funciona como deoxinucleosido trifosfato trifosfohidrolasa que convierte

los dNTPs de la célula en nucleósidos sin el grupo fosfato, inhibiendo la transcripción reversa y la síntesis de cDNA, por lo que inhibe la replicación viral (Bloch et al., 2014).

1.3.3 Fenotipo y función de las células dendríticas en la infección por VIH

Hasta ahora, y de manera concluyente, se ha reportado que ambas subpoblaciones de CD se encuentran disminuidas en sangre periférica de personas con VIH, fenómeno observado desde etapas tempranas de la infección (Sabado et al., 2010). Además, ésta disminución se asocia con niveles elevados de virus en plasma (carga viral) y con un bajo número de LT CD4+ en sangre (Killian et al., 2006, Lehmann et al., 2008). Debido a la baja infectividad de las CD, es poco probable que su infección explique la frecuencia reducida de éstas células en personas con VIH. El número reducido de CDc y CDp en sangre podría deberse al IFN- α secretado durante la infección por VIH, ya que se ha observado que el IFN- α altera la diferenciación de las CDc (Kodama et al., 2010) y regula negativamente el número de CDp *in vivo* (Swiecki et al., 2011). La redistribución de las CD a órganos linfoides secundarios también podría explicar la frecuencia reducida observada en sangre (Dillon et al., 2008, Lehmann et al., 2010).

En humanos, dada la limitación de obtener órganos linfoides, la mayoría de los trabajos se enfocan al estudio de las subpoblaciones de CD en SP (Fontaine et al., 2009, Barron et al., 2003, Fantuzzi et al., 2004, Fiorentini et al., 2008). Además,

debido al número reducido de CD en las personas con VIH, los estudios funcionales se han realizado *in vitro* con CD derivadas de monocitos (CDDM) (Alter et al., 2010, Fan et al., 2007, Fantuzzi et al., 2004), y se ha mostrado que la exposición de las CDDM a la proteína del VIH gp120 induce la maduración de éstas células pero se reduce la producción de IL-12 y su capacidad estimuladora de LT (Fantuzzi et al., 2004). Similarmente se observó que las CDDM de personas con VIH y VHC producen menos IL-12 en respuesta a CD40L, aunque la expresión de proteínas de CD83 y CD86 no se ve afectada (Fan et al., 2007). En un estudio más reciente se demostró que la proteína Tat del VIH induce la maduración de CDDM, aumenta la expresión de CD80, CD83 y CD86, pero también se sobreexpresa la proteína co-inhibidora PD-L1 (Planes et al., 2014). Además, se ha reportado que las CDDM de personas en etapa tardía de la infección por VIH muestran reducida la capacidad de presentar antígeno y de inducir proliferación en LT (Sachdeva et al., 2015). Interesantemente se demostró que el factor antiviral SAMHD1 limita la presentación de antígenos del VIH en las CDDM (Ayinde et al., 2015).

La función de las CD *ex vivo* de personas con VIH también se ha estudiado, se ha observado que las CD de personas con VIH tienen una menor capacidad de estimular respuesta de LT (Roberts et al., 1994) y que las CDp secretan menos IFN- α después de ser estimuladas con ligandos de TLR-7 y -8 (Martinson et al, 2007). En otro estudio se mostró que las CDc y CDp de personas en etapa aguda de la infección maduran normalmente en respuesta a ligandos de TLR-7 y -8, inducen mayor respuesta de LT alogénicos y producen mayor cantidad de citocinas que las CDc de donadores sanos (Sabado et al, 2010). Durante la etapa crónica de la

infección, se ha observado que las CDDM de personas con VIH tienen menor capacidad estimular la respuesta de los LT ya que la secreción de IL-12 está reducida y la de IL-10 incrementada (Buisson et al., 2009). Similarmente, se observó que las CDDM expuestas a plasma de personas infectadas con VIH muestran menor producción de IL-12 así como una menor capacidad de estimular la respuesta de LT (Miller et al., 2012). También se ha observado que las CDc de personas con VIH en etapa tardía expresan menos CD40, CD80, CD86 y HLA-DR después de ser estimuladas con LPS (Sachdeva et al., 2015).

Se desconoce si lo observado en CD de SP o CDDM reflejen lo que ocurre en NL, sitio anatómico donde se lleva a cabo la presentación de antígeno. Aunque existe evidencia de que los LT son activados en el NL de personas infectadas por VIH (Biancotto et al., 2007) se desconoce si estos LT efectores son inducidos por las CDc en los NL. Pocos trabajos han reportado el estado de maduración de las CD en NL o tejido linfoide de personas con VIH (Loré et al., 2002; Dillon et al., 2008; Alter et al., 2010; Lehman et al., 2010) y los datos obtenidos en estos estudios son controversiales (ver tabla 1). Se observó que las personas infectadas por VIH en etapa aguda tienen mayor porcentaje de CDc CD40+, CD80+, CD83+ y CD86+ en las amígdalas, comparado con personas no infectadas (Lore et al., 2002). Sin embargo al comparar con personas infectadas por el virus de Epstein Barr la frecuencia de CDc CD80+ y CD86+ es menor en personas con VIH (Lore et al., 2002). En otro estudio de personas con VIH en etapa temprana se reportó que las CDc de NL expresan menos CD40, CD80, CD83 y CD86 que las CDc de NL de personas sin VIH (Alter et al., 2010). Por otro lado, Dillon y colaboradores

reportaron la expresión de CD40 y CD83 en CDc de NL de personas con VIH en etapa crónica y no observaron diferencias significativas con respecto a las CDc de NL de personas sin VIH (Dillon et al., 2008). En el caso de las CDp, este mismo grupo de investigación reportó un incremento en la expresión de CD40 y disminución de CD83 en las CDp de NL de personas con VIH (Dillon et al., 2008). Mientras que el grupo de Lehman y colaboradores reportaron que la expresión de CD40 aumenta en CDp de personas con VIH comparado con las CDp de individuos no infectados, pero la expresión de CD83 y CD86 en estas células no aumenta ni disminuye (Lehmann et al., 2010).

Referencia	Características de la cohorte	Características experimentales	Resultados/Observaciones VIH- vs VIH+	
			CDc	CDp
Loré et al 2002	Etapa aguda N = 4 VIH- 6 VIH+	Amígdalas Tinción histológica	+ CD40 (%) en VIH+ + CD80 (%) en VIH+ + CD83 (%) en VIH+ + CD86(%) en VIH+	
Dillon et al 2008	Etapa crónica N = 6 VIH- 10 VIH+	NL inguinales Citometría, (tinción de células en fresco)	= CD40 (MFI) en VIH+ = CD83 (MFI) en VIH+	+ CD40 (MFI) en VIH+ - CD83 (MFI) en VIH+
Lehman et al 2010	Etapa crónica N = 11 VIH- 8 VIH+	NL cervicales y axilares Citometría, (tinción de células descongeladas)		+ CD40 (GMFI) en VIH+ = CD83 (GMFI) en VIH+ = CD86(GMFI) en VIH+
Alter et al 2010	Etapa temprana (1er. año de infección) N = 5 VIH- 10 VIH+	NL axilares Citometría, (tinción de células descongeladas)	- CD40 (MFI) en VIH+ - CD80 (MFI) en VIH+ - CD83(MFI) en VIH+ - CD86(MFI) en VIH+	

Tabla 1. Diferencias observadas en el fenotipo de células dendríticas. VIH- representa el grupo control, VIH+ respresenta el grupo de personas con VIH. %=porcentaje de células. MFI (Median Fluorescence Intensity) y GMFI (Geometric mean of Fluorescence Intensity) representan la expresión de la proteína estudiada. El signo + significa incremento, el signo - significa disminución y el signo = sin cambio.

Se ha propuesto entonces que las CDc de NL se encuentran inmaduras, ya que no aumentan la expresión de CD40 ni de otras proteínas co-estimuladoras como CD80 o CD86 (Alter et al., 2010, Dillon et al., 2008) y como consecuencia no serían capaces de activar LT específicos contra el VIH y contra otros patógenos que causan infecciones oportunistas. A pesar de los avances científicos, el papel biológico de las CD en la infección del VIH no está claramente definido, por lo tanto, comprender la función de estas células es crucial para desarrollar opciones terapéuticas que modulen su respuesta, con el fin de controlar la infección por el VIH (Smed-Sorensen and Lore, 2011, Wonderlich and Barratt-Boyes, 2012).

Las diferencias encontradas en los estudios también pueden deberse a factores que afectan la composición y el fenotipo de las CD en personas con VIH, por ejemplo, el sitio anatómico de la muestra, la etapa de infección en la que se realizó el análisis o la cohorte de pacientes, el tipo de técnica utilizada (ej. citometría o inmunohistoquímica), las condiciones de cultivo o estímulos utilizados, si las células fueron congeladas y descongeladas para su análisis o si las CD fueron derivadas de monocitos (Manches et al., 2014, Yonkers et al., 2011).

1.3.4 Células dendríticas y su papel en la inmunopatogénesis del VIH

Las CDp se acumulan en NL de personas con VIH y contribuyen con la activación inmune crónica produciendo citocinas inflamatorias, principalmente IFN- α (Lehman et al, 2010). En humanos, el IFN- α contribuye al fenotipo exhausto de los LT durante la etapa crónica de la infección ya que promueve la expresión de PD-1 en los LT (Kulpa et al., 2013). Además, el IFN- α induce la expresión de receptores

de muerte como TRAIL y DR5 en la membrana del LT, que al unirse a su receptor, induce la muerte por apoptosis en los LT (Gougeon and Herbeuval, 2012, Herbeuval et al., 2005b, Herbeuval et al., 2005a). Importantemente, la señalización prolongada de IFN- α durante infecciones crónicas, induce la expresión de proteínas inhibitoras como PD-1 en los LT, lo cual contribuye al establecimiento de la latencia viral o reservorio en los LT CD4+ infectados, es decir el DNA viral es integrado en el genoma de la célula huésped y permanece inactivo transcripcionalmente (Kulpa et al., 2013). Se desconoce la contribución de las diferentes subpoblaciones de CD a la secreción prolongada de IFN- α durante la infección por VIH, pero la estimulación frecuente de las CDp por el virus y de las CDc por productos bacterianos y citocinas inflamatorias, juegan un papel importante en la patogénesis de la infección.

Se ha propuesto que la activación inmune crónica favorece la deposición de colágeno en órganos linfoides secundarios de individuos infectados por VIH, lo cual promueve el deterioro de la arquitectura del tejido (Zeng et al., 2011). Una de las causas podría ser el incremento en el número de LT reguladoras observado en órganos linfoides secundarios de personas con VIH (Boasso et al., 2007, Boasso et al., 2006, Nilsson et al., 2006). Las CD podrían estar participando en el daño provocado en el tejido linfoide, ya que la señalización por TLR también puede inducir la expresión de enzimas inmunoreguladoras. Por ejemplo, la enzima IDO, cuya expresión está incrementada en CDc de personas con VIH, regula el catabolismo de triptófano y juega un papel importante en el control de la proliferación de los LT activados, sin embargo también promueve la diferenciación de LT reguladores, los cuales producen IL-10, citocina anti-inflamatoria que inhibe la

respuesta de los LT Th1, células NK y macrófagos (Couper et al., 2008, Favre et al., 2010). También las CDp activadas por el VIH y otros agonistas de TLR son capaces de expresarIDO e inducir la generación de LT reguladores a partir de LT naive (Manches et al., 2008).

1.3.5 Células dendríticas, prevención y terapia

Descritas como adjuvantes naturales, las CD muestran características únicas que las vuelven blanco de estudio para generar una vacuna eficiente contra el VIH. La activación y función de ambos subtipos de CD es primordial durante las infecciones virales, ya que las CDc favorecen una respuesta adaptativa específica contra el virus y las CDp son las principales productoras de IFN- α , citocina esencial para el control y eliminación del virus.

Las CD contribuyen a la patogénesis de la infección por VIH a través de múltiples mecanismos, descritos previamente, desde la transmisión del virus, reclutamiento de células blanco, la secreción de citocinas inflamatorias y alteraciones en la dinámica de los LT. El bloqueo o la modulación de dichas vías podrían resultar en estrategias benéficas para las personas infectadas por VIH. La activación continua de las CD y la secreción de citocinas por parte de las mismas podrían ser bloqueadas utilizando antagonistas o bloqueadores de los TLR como la cloroquina (d'Etorre et al., 2011). Las CD son potentes presentadoras de antígeno, por tal motivo, se ha estudiado la posibilidad de utilizar a las CD como vacuna, a través de promover la presentación de antígenos virales y de epítopes de escape predictivos del virus, con el fin de mejorar la respuesta inmune y el control de la

replicación viral (Ahlers and Belyakov, 2009). Se ha reportado un incremento en la respuesta de los LT específicos contra el VIH utilizando CD autólogas pulsadas previamente con el VIH inactivado (Garcia et al., 2013). Además, la vacunación con CD puede ser mejorada utilizando bloqueadores de la vía PD-1 PD-L1 (Davar et al., 2015).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el contexto de la infección por VIH, se han estudiado principalmente las CD de SP o CDDM dada la limitación de obtener órganos linfoides de humanos. Sin embargo, se desconoce si lo observado en cuanto al fenotipo y funcionalidad las CD de SP o CDDM reflejen lo que ocurre en las CD de NL, sitio anatómico donde se lleva a cabo la presentación de antígeno.

En los pocos reportes que hay acerca de las CD de NL, se ha propuesto entonces que las CDc de NL se encuentran inmaduras, ya que no aumentan la expresión de CD40 ni de otras proteínas co-estimuladoras como CD80 o CD86 y como consecuencia no serían capaces de activar LT específicos contra el VIH y contra otros patógenos que causan infecciones oportunistas. Sin embargo, el fenotipo y funcionalidad de las CD de NL de personas con VIH no ha sido ampliamente descrito.

A pesar de los avances científicos, el papel biológico de las CD en la infección del VIH no se ha esclarecido por completo y es claro que las CD pueden tener un papel muy importante en la transmisión del virus, en la activación inmune crónica y en la disfunción de los LT, características de la infección por VIH. Por tanto, analizar y describir ambas subpoblaciones de CD en SP y sobre todo en NL nos permitirá comprender la función o contribución de estas células en la patogénesis de la infección por el VIH y a su vez, facilitará encontrar blancos para el uso e intervención de nuevas estrategias terapéuticas, con el fin de controlar la infección por el VIH e incluso en otras patologías como el cáncer.

3. Objetivos

Generales

- Caracterizar fenotípicamente a las CD de SP y NL de personas infectadas por VIH.
- Determinar la capacidad funcional de las CD de SP y NL de personas infectadas por VIH.

Particulares

- Determinar, por citometría de flujo multiparamétrica, la frecuencia de las CD tanto en SP como en NL de personas infectadas por VIH.
- Determinar la frecuencia de las CD apoptóticas en SP de personas con VIH por medio de la detección de Anexina V.
- Realizar la descripción detallada del fenotipo celular de las CD de personas con VIH mediante la determinación de marcadores de activación (CD40 y CD83), de proteínas co-estimuladoras (CD80 y CD86) y proteínas co-inhibidoras (PD-1 y PD-L1).
- Determinar si las CD de personas infectadas por VIH son funcionales mediante un ensayo de producción de citocinas (TNF- α , IFN- α e IL-12).
- Analizar la polifuncionalidad de las CD de SP y NL de personas infectadas por VIH.

4. Materiales y métodos

4.1 *Sujetos de estudio*

Todas las consideraciones éticas asociadas a este proyecto fueron evaluadas y aprobadas por el Comité de Ciencia y Bioética del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Las muestras de SP y NL se obtuvieron de individuos con VIH y, como controles se obtuvieron muestras de individuos VIH negativos, después de haber entregado su consentimiento informado por escrito.

Para el ensayo fenotípico y funcional de las CD, los médicos del CIENI, reclutaron 36 individuos con VIH sin tratamiento ARV y sin enfermedades oportunistas al momento de la toma de muestra. Se obtuvieron muestras de SP de individuos con VIH con una mediana de carga viral de 97,559 copias de VIH/mL de plasma (3,180-2'577,701 copias de RNA/mL) y una mediana de LT CD4+ de 414 células/ μ L de sangre (4-1,190 LT CD4+/ μ L de sangre). Como control, se obtuvieron muestras de SP de 5 individuos sin VIH con una mediana de LT CD4+ de 1,371 células/ μ L de sangre (970-2,788 células/ μ L). Las características demográficas y clínicas de la cohorte de estudio se detallan en la tabla 2.

4.2 *Muestras de nódulo linfático y sangre periférica*

Para la caracterización fenotípica de CD en NL, se obtuvieron células de biopsias de NL palpable en la zona cervical de individuos que requerían el procedimiento con fines diagnósticos; ninguno de los pacientes incluidos en este estudio tuvo infecciones oportunistas. Las muestras de SP fueron colectadas el mismo día de la biopsia de NL para determinar la CV en plasma (para las personas con VIH), el

conteo de LT CD4+ y la caracterización de las CD. Las células de SP se separaron por gradiente de densidades con Ficoll-Hypaque (Accurate, Florida, USA). Para determinar el fenotipo de las CD, las biopsias de NL fueron puestas en medio Hanks (Lonza, Walkersville, MD) e inmediatamente transferidas al laboratorio para su procesamiento. El tejido linfoide se cortó en pedazos pequeños con un bisturí y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en medio Hanks con calcio (1.27 mM), magnesio (0.8 mM) (Lonza, Walkersville, MD) y colagenasa D (400 unidades/mL, Roche, Basilea, Switzerland). Las células se obtuvieron por disociación del tejido para lo cual se utilizó una malla de 70 µm y el émbolo de una jeringa. Para la determinación de citocinas, las biopsias de NL fueron puestas en medio Hanks, el tejido linfoide se cortó en pedazos con un bisturí y se procesó en el aparato GENTLE MACS (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany) para obtener las células por disociación. Una vez separadas las células de SP y NL, éstas fueron teñidas inmediatamente con distintos anticuerpos monoclonales y fijadas para el análisis por citometría de flujo.

4.3 Análisis fenotípico de las células dendríticas por citometría de flujo

Las células de SP y NL separadas como previamente se describió, fueron lavadas dos veces con PBS (Lonza, Walkersville, MD) e incubadas por 10 minutos a 4°C con un compuesto que se une al grupo amino de las proteínas para descartar las células muertas (LIVE/DEAD fixable stain, Molecular Probes, Oregon, USA). Posteriormente, las células fueron lavadas una vez con PBS y una vez con PBA (1% albumina y 1% azida de sodio en PBS) e incubadas durante 20 minutos con los anticuerpos monoclonales biotinados contra CD3 (clona UCHT), CD14 (clona

61D3), CD20 (clona 2H7), CD56 (clona CSSMB; eBioscience, California, USA). Se lavaron las células dos veces y se incubaron por 30 minutos a 4°C con estreptavidina PE Texas RED (BD, San Jose, CA) y los siguientes anticuerpos conjugados: HLA-DR APCCy7 (clona L243, BD), CD11c AF700 (clona 3.9, eBioscience), CD123 PE (clona 7G3, BD), CD40 APC (clona 5C3, eBioscience), CD83 FITC (clona HB15e, eBioscience), CD80 V450 (clona L307.4, BD) and CD86 PECy5 (clona IT2.2, eBioscience). Una vez incubadas, las células se lavaron dos veces y se fijaron con paraformaldehído al 3% (diluido en PBS). Un segundo panel se usó para determinar la expresión de proteínas co-inhibidoras y la frecuencia de Anexina V: la misma mezcla de anticuerpos biotinados CD3, CD14, CD20, CD56 seguido de la estreptavidina PE Texas RED, HLA-DR AF700 (clona LN3, eBioscience), CD11c APC (clona B-ly6, BD), CD123 PECy5 (clona 9F5, BD), PD-1 PE (clona MIH4, BD), PD-L1 PECy7 (clona MIH1, BD) y después de ser lavadas con PBS, las células se incubaron con Anexina V (BD). La adquisición de las células se realizó en un citómetro FACS ARIA (BD). El análisis se realizó en el programa Flowjo versión 7.6.5 (TreeStar Inc., Oregon, USA). Para el análisis se excluyeron células dobles o cúmulos basado en el tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A), seguido de la eliminación de células muertas. Las CDc se caracterizan por ser LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD20⁻, and CD56⁻), HLA-DR⁺ y CD11c⁺, las CDp se caracterizan por ser LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD20⁻, and CD56⁻), HLA-DR⁺ y CD123⁺. Se determinó la expresión de proteínas de activación como CD40 y CD83, proteínas co-estimuladoras como CD80 y CD86, proteínas co-inhibidoras como PD-1 y PD-L1. Se utilizaron controles FMO (por sus siglas en inglés, Fluorescence Minus One) para definir la expresión positiva de los antígenos de superficie

previamente mencionados. La media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGIF) se calculó de la población positiva para comparar las CDc y CDp de individuos VIH- y VIH+.

4.4 Determinación de la producción de citocinas de las células dendríticas

Una vez separadas las células de SP y NL como se describió previamente, se incubaron de 3-5 millones de células con los siguientes ligandos de TLRs: LPS (1 µg/mL), CpG (3 µg/mL), ssRNA40 (2 µM) y una combinación de LPS+CpG (1 µg/mL y 3 µg/mL, respectivamente). Cuatro horas después se incubó con Brefeldina (1 µg/mL) (BD) para detener el transporte de proteínas y capturar las citocinas producidas intracelularmente. Las células se dejaron en cultivo a 37 °C por 18 horas en medio HUT (suero fetal bovino al 10%, penicilina-estreptomicina al 1% y glutamina al 1%). Finalizada la incubación se procedió a teñir las células con distintos anticuerpos monoclonales para el análisis por citometría de flujo. Las células de SP y NL fueron lavadas dos veces con PBS (Lonza, Walkersville, MD) e incubadas por 15 minutos a TA con una amina reactiva (LIVE/DEAD fixable stain, Molecular Probes, Oregon, USA). Posteriormente, las células fueron lavadas una vez con PBS y una vez con buffer de tinción (BioLegend) e incubadas durante 20 minutos con una mezcla de anticuerpos biotinados contra CD3 (clona UCHT), CD14 (clona 61D3), CD19 (HIB19), CD20 (clona 2H7), CD56 (clona CSSMB; eBioscience, California, USA). Las células se lavaron dos veces y se incubaron por 20 minutos a TA con estreptavidina PE Texas RED (BD, San Jose, CA) y con los siguientes anticuerpos conjugados: HLA-DR BV785 (clona L243, Biolegend), CD11c BV711 (clona 3.9, Biolegend), CD123 PerCPCy5.5 (clona 7G3, BD), CD40

PECy5 (clona 5C3, BD), CD83 FITC (clona HB15e, eBioscience), CD80 BV605 (clona 2D10, Biolegend) and CD86 BV650 (clona IT2.2, Biolegend), PD-L1 PECy7 (clone MIH1, BD). Una vez incubadas, las células se lavaron dos veces y se incubaron con buffer Perm2 (BD) durante 20 minutos para permeabilizar la membrana y proceder a la tinción intracelular. Una vez terminado el tiempo de incubación las células se lavaron con Perm Wash (BD) dos veces y se incubaron con la mezcla de los siguientes anticuerpos: IL-12 p40/p70 PE (clona C11.5, BD), IL-10 BV421 (clona JES3-9D7, Biolegend), IFN- α AF647 (clona 7N4-1, BD) y TNF- α AF700 (clona MAb11, BD) durante una hora a TA. Una vez incubadas, las células se lavaron dos veces con Perm Wash (BD) y se fijaron con paraformaldehído al 1% (diluido en PBS).

La adquisición de las células se realizó en un citómetro FORTESSA (BD). El análisis se realizó en el programa FlowJo versión X 10.0.7r2 (TreeStar Inc., Oregon, USA). Para el análisis se excluyeron los cúmulos o dobletes de células basado en el tamaño (FSC-A) y granularidad (SSC-A), seguido de la eliminación de células muertas (figura 1, sección de resultados). Las CDc se caracterizan por ser LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD20⁻, CD19⁻ y CD56⁻), HLA-DR⁺ y CD11c⁺, las CDp se caracterizan por ser LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD20⁻, CD19⁻ y CD56⁻), HLA-DR⁺ y CD123⁺ (figura 1, sección de resultados). Se determinó la expresión de las proteínas de activación CD40 y CD83, de las proteínas co-estimuladoras CD80 y CD86, y de la proteína co-inhibidoras PD-L1. De igual forma se determinó la producción de las citocinas IL-12, IL-10, IFN- α y TNF- α . Se utilizó la condición sin estímulo como control para definir la expresión positiva de los antígenos de

superficie e intracelulares inducida por los estímulos. La media geométrica de la intensidad de fluorescencia (MGIF) se calculó de la población positiva. Se compararon las CDc y CDp de SP y NL de individuos VIH+.

4.5 Análisis de polifuncionalidad de las células dendríticas

Se utilizaron los programas PESTLE y SPICE (Simplified Presentation of Incredibly Complex Evaluations) para evaluar la capacidad polifuncional de las CD (Roederer et al., 2011). El programa SPICE utiliza los datos booleanos que se obtienen del análisis de las muestras en Flowjo. Los datos booleanos representan aquellas poblaciones que expresan o producen más de una proteína o citocina simultáneamente. Se obtiene la frecuencia de todas las combinaciones posibles.

4.6 Determinación de la carga viral y conteo de linfocitos T CD4

Se determinó la CVp y el número de LT CD4+ en los individuos infectados por VIH que participaron en el estudio. La carga viral en plasma se cuantificó por PCR en tiempo real con un sistema automatizado m200 (Abbott Laboratories, Abbot Park, IL). El rango de detección de la CV en plasma fué de 40 a 10,000,000 copias/mL. El conteo de LT CD4+ se determinó con el kit TruCount (BD Biosciences, San Jose, CA) de acuerdo a las instrucciones del manufactor y se utilizó un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA).

4.7 Análisis estadístico

Para el análisis de nuestros datos se consideró el uso de pruebas estadísticas no paramétricas. Se utilizó la prueba *U* de Mann-Whitney para comparar el porcentaje

de las células positivas o la expresión de las proteínas descritas previamente (MGIF) en los dos grupos de estudio (VIH- y VIH+). Se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman para determinar si existen asociaciones entre los parámetros determinados (CVp y conteo de LT CD4+). Los valores de p menores a 0.05 fueron considerados significativos.

Tabla 2. Características demográficas y clínicas de los individuos VIH- y HIV+.

Clave del paciente	Edad/Género	Conteo de LT CD4	Carga Viral en plasma (CVp)	Log ₁₀ CV	Ensayos realizados
G065	31/M	1,267	N/A	N/A	<i>a, b</i>
G066	35/M	970	N/A	N/A	<i>a, b</i>
G067	29/M	1,371	N/A	N/A	<i>a, b</i>
G068	26/M	2,387	N/A	N/A	<i>a, b</i>
G070	29/F	2,788	N/A	N/A	<i>a, b</i>
G031	34/M	425	213,173	5.33	<i>a, b</i>
G034	34/M	442	241,080	5.38	<i>a</i>
G060	31/M	721	101,276	4.83	<i>a, b</i>
G009	40/M	596	7,730	3.89	<i>a, b</i>
G007	50/M	501	25,659	4.41	<i>a, b</i>
G011	25/M	597	65,730	4.82	<i>a, b</i>
G014	41/F	333	93,236	4.95	<i>a, b</i>
G016	28/M	406	61,586	4.72	<i>a, b</i>
G023	23/M	538	9,511	3.98	<i>a, b</i>
G029	25/M	841	71,621	4.86	<i>a</i>
G032	20/M	258	35,847	4.55	<i>a, b</i>
G047	28/M	423	58,481	4.77	<i>a, b</i>
G037	35/M	1,190	3,180	3.5	<i>a, b</i>
G050	22/M	852	29,277	4.77	<i>a, b</i>
G020	32/M	285	322,863	5.51	<i>a, b</i>
G042	38/M	113	133,861	5.13	<i>a</i>
G041	30/M	196	222,134	5.35	<i>a</i>
G043	26/M	312	2'577,701	6.41	<i>a, b</i>
G062	42/M	171	376,458	5.58	<i>a, b</i>
G069	26/M	4	178,610	5.25	<i>a, b</i>
G106	43/M	320	338,049	5.53	<i>c</i>
G186	29/M	316	113,669	5.06	<i>c</i>
G198	35/M	676	25,612	4.41	<i>c</i>
G209	29/M	342	526,777	5.72	<i>c</i>
G212	26/M	402	29,620	4.47	<i>c</i>
G214	28/M	386	10,742	4.03	<i>c</i>
G220	62/M	321	448,163	5.66	<i>c</i>
G234	24/M	716	322,442	5.51	<i>c</i>
G241	40/F	279	111,854	5.05	<i>c</i>
G242	20/M	634	93,841	4.97	<i>c</i>
G260	23/M	1070	109,082	5.04	<i>c</i>
G283	32/M	445	1,996,027	6.3	<i>c</i>
G215	25/M	658	4,676	3.67	<i>c</i>
G218	28/M	267	18,111	4.26	<i>c</i>
G219	28/M	802	6,507	3.81	<i>c</i>
G275	30/M	348	186,638	5.27	<i>c</i>

N/A: No aplica.

a. Inmunofenotipo de proteínas co-estimuladoras.

b. Inmunofenotipo de proteínas co-inhibidoras.

c. Producción de citocinas.

5. Resultados

5.1 Frecuencia de células dendríticas en sangre periférica y nódulos linfáticos de personas infectadas por VIH

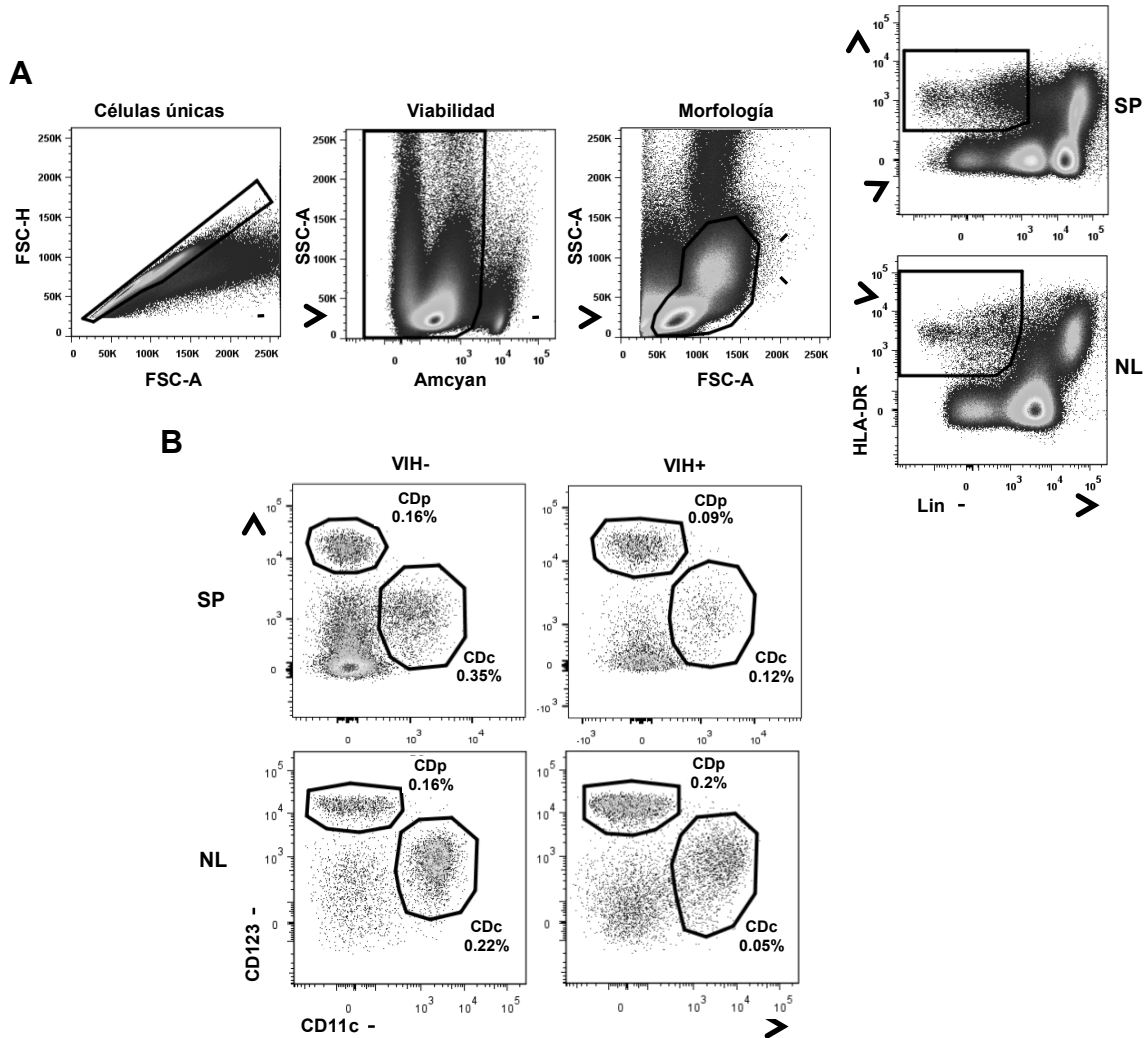


Figura 5. Estrategia de análisis de células dendríticas. **A.** Los cúmulos o células dobles se excluyeron tomando en cuenta el tamaño (FSC-H vs FSC-A, células únicas), seguido de la eliminación de células muertas (SSC-A vs AmCyan, viabilidad) y el reconocimiento de los linfocitos por parámetros de granularidad y tamaño (SSC-A vs FSC-A). Las células dendríticas se identificaron como HLA-DR⁺ y LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD20⁻, y CD56⁻). El panel superior muestra las CD de SP y el panel inferior muestra las CD de NL. **B.** Las CDc se identificaron como CD11c⁺ y las CDp como CD123⁺. Las gráficas superiores representan las CD de SP de personas VIH- y VIH+, mientras que las inferiores representan las CD de NL de personas VIH- y VIH+. La frecuencia de las CDc y CDp se obtuvo a partir de las células vivas.

Para determinar la frecuencia de las CDc y CDp en SP y NL, se realizó el análisis de ambas poblaciones por citometría de flujo multiparamétrica. Los

cúmulos de células se excluyeron del análisis por tamaño (FSC-H vs FSC-A, células únicas), seguido de la eliminación de las células muertas (SSC-A vs AmCyan, viabilidad) y se analizaron las células con morfología de linfocitos y monocitos (SSC-A vs FSC-A). Las células dendríticas se identificaron como HLA-DR⁺ y LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD20⁻ y CD56⁻) (figura 5A). Las CDc se identificaron como CD11c⁺ y las CDp como CD123⁺ (figura 5B). La frecuencia de las CDc y CDp se obtuvo a partir de las células vivas.

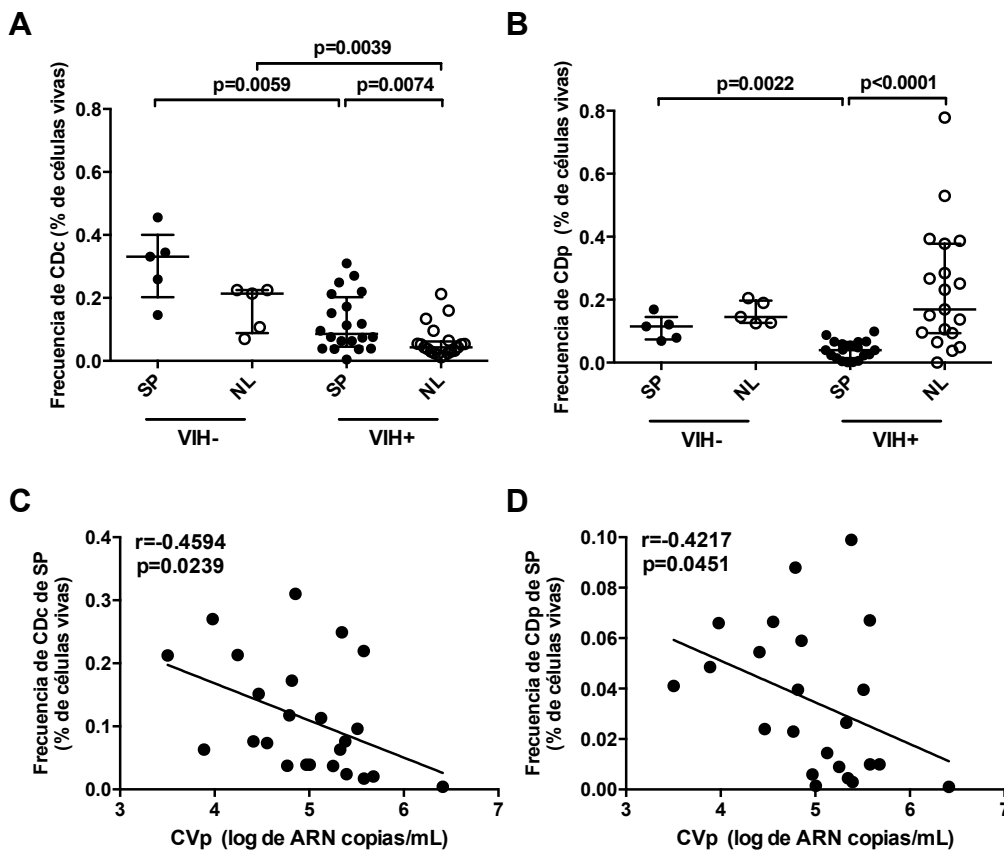


Figura 6. Frecuencia de células dendríticas. **A.** Frecuencia de CDc de SP y NL de personas VIH- y personas con VIH+. **B.** Frecuencia de CDp en SP y NL de personas VIH- y VIH+. **C.** Correlación de la frecuencia de CDc en SP con la CVp de personas VIH+. **D.** Correlación de la frecuencia de CDp de SP con la CVp de personas VIH+. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica U de Mann Whitney para comparar ambos grupos de estudio o compartimentos celulares. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para las asociaciones entre la frecuencia de CD y la CVp. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

De acuerdo a reportes previos, en este trabajo también observamos que la frecuencia de CDc en SP de personas con VIH disminuyó significativamente comparado con el grupo control (VIH-) ($p=0.0059$, figura 6A), dicha disminución correlacionó negativamente con la carga viral en plasma (CVp) ($r=-0.4594$ y $p=0.0239$, figura 6C). De igual manera, la frecuencia de CDc en NL de personas con VIH disminuyó significativamente comparado con la frecuencia en NL del grupo control ($p=0.0039$, figura 6A). Además, observamos que en el grupo de personas VIH+, la frecuencia de CDc en NL fue significativamente menor que en SP ($p=0.0074$, figura 6A). Por otro lado, la frecuencia de CDp en SP de personas VIH+ disminuyó significativamente comparado con personas VIH- ($p=0.0022$, figura 6B), esta disminución también correlacionó negativamente con la carga viral en plasma ($r=-0.4217$ y $p=0.0451$, figura 6D). Interesantemente, la frecuencia de CDp incrementa significativamente en el NL de personas VIH+, con respecto a la frecuencia en SP ($p<0.0001$, figura 6B).

Para conocer si la disminución en la frecuencia de las CDc y CDp en SP de personas con VIH podría deberse a la muerte celular de las CD, se evaluó la frecuencia de las células apoptóticas por medio de la detección de Anexina V. La anexina V se une a la fosfatidil serina que se transloca del lado interno de la membrana hacia el lado externo al inicio del proceso apoptótico y sirve como señal de fagocitosis para los macrófagos (Williamson et al., 2001, Schutters et al., 2013, Shounan et al., 1998, Krahling et al., 1999). En nuestros resultados, se observó que la frecuencia tanto de las CDc como de CDp Anexina V+ de SP de personas VIH- y VIH+ fue similar (figura 7A y 7B).

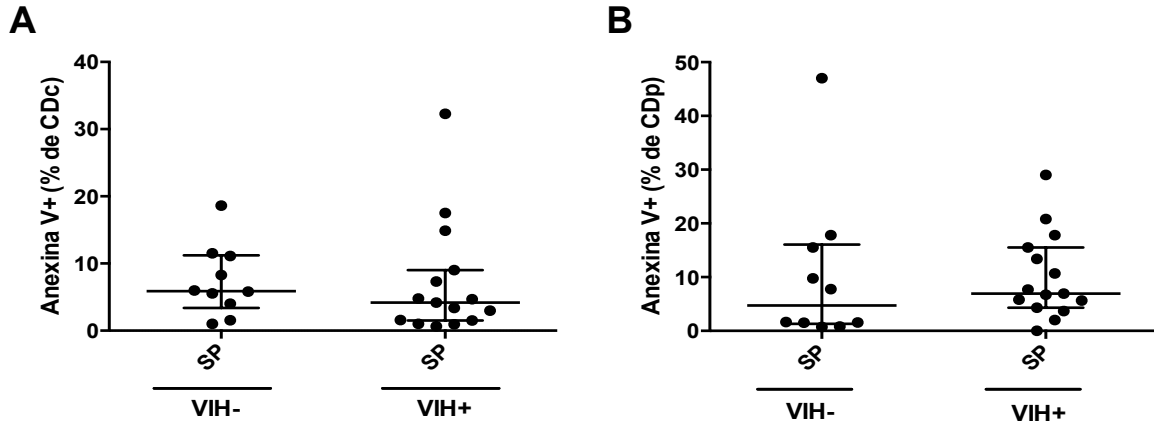


Figura 7. Frecuencia de células dendríticas Annexina V+. **A.** Frecuencia de CDc Annexina V+ de SP de personas VIH- y VIH+. **B.** Frecuencia de CDp Annexina V+ de SP de personas VIH- y VIH+. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar ambos grupos de estudio. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

5.2 Análisis fenotípico de células dendríticas convencionales

Para determinar el fenotipo de las CDc en SP y NL, se realizó el análisis de la expresión de proteínas co-estimuladoras y co-inhibidoras por citometría de flujo. En la figura 8, observamos los histogramas representativos de la expresión de los marcadores de activación CD40 y CD83, así como de las proteínas co-estimuladoras, CD80 y CD86 en las CDc de personas VIH- y VIH+ (figura 8A). En este estudio, se observó un incremento significativo en la frecuencia de células CD40+, CD83+ y CD80+ en el NL comparado con SP en ambos grupos de estudio ($p=0.0079$ para el grupo VIH- y $p < 0.0001$ para el grupo VIH+, figura 8B, C y D). Más aún, se observó un aumento significativo en la frecuencia de las CDc CD40+ y CD80+ de SP de personas VIH+, comparado con personas VIH- ($p=0.0415$ y $p=0.0039$ respectivamente; figura 8B y 8D). Sin embargo, no se encontró diferencia significativa en la frecuencia de las CDc CD86+ de SP o NL en ambos grupos de estudio (figura 8E).

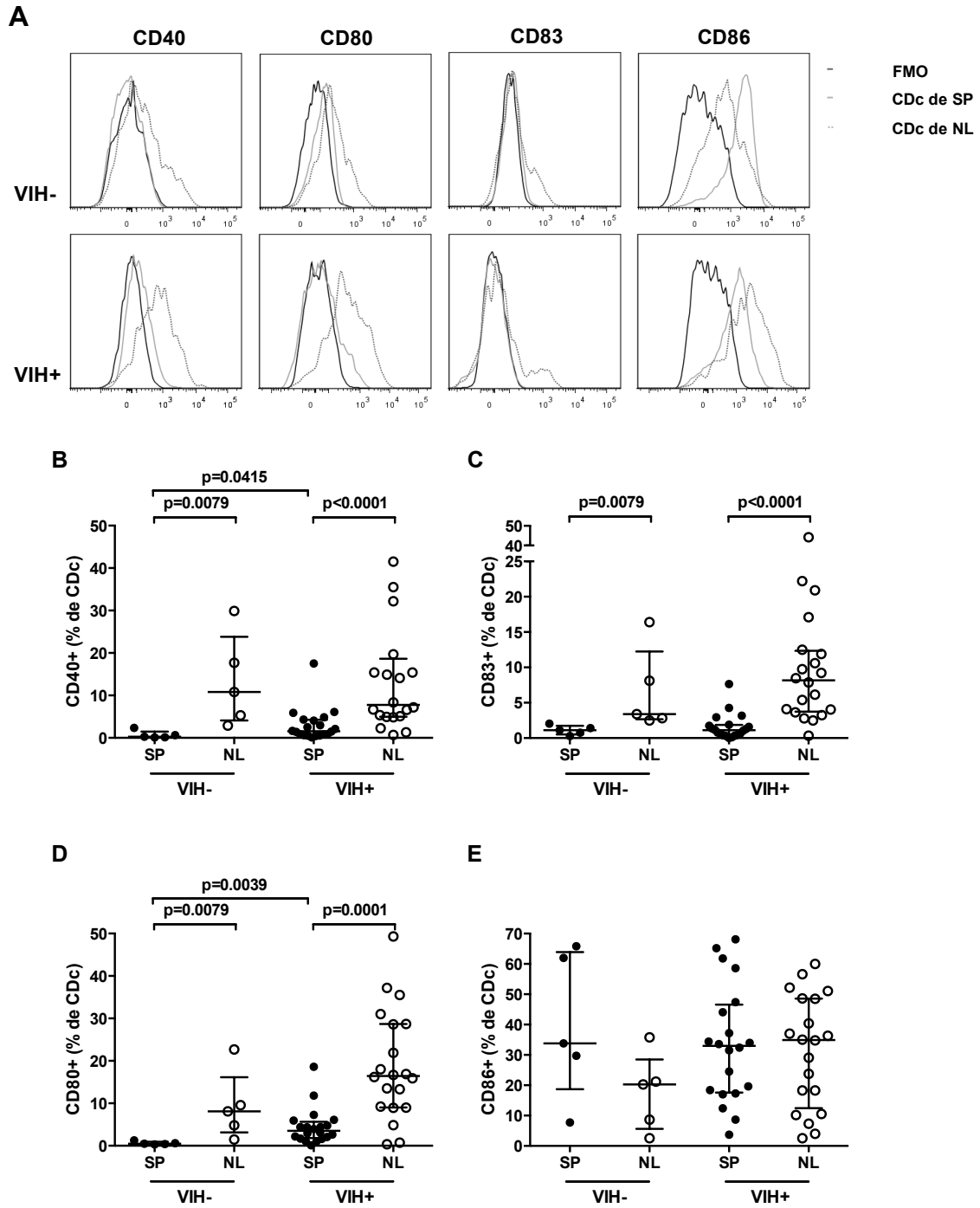


Figura 8. Expresión de marcadores de activación y co-estimulación en CDc de SP y NL. **A.** Histogramas representativos de la expresión de las proteínas de activación y co-estimulación (FMO control: línea negra, CDc de SP: línea gris y CDc de NL: línea punteada). **B.** Frecuencia de las CDc CD40+ de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **C.** Frecuencia de las CDc CD83+ de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **D.** Frecuencia de las CDc CD80+ de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **E.** Frecuencia de las CDc CD86+ de SP y NL de personas VIH- y VIH+. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar las CDc de SP y NL. Se consideró $p < 0.05$ como significativo. FMO: Fluorescence minus one.

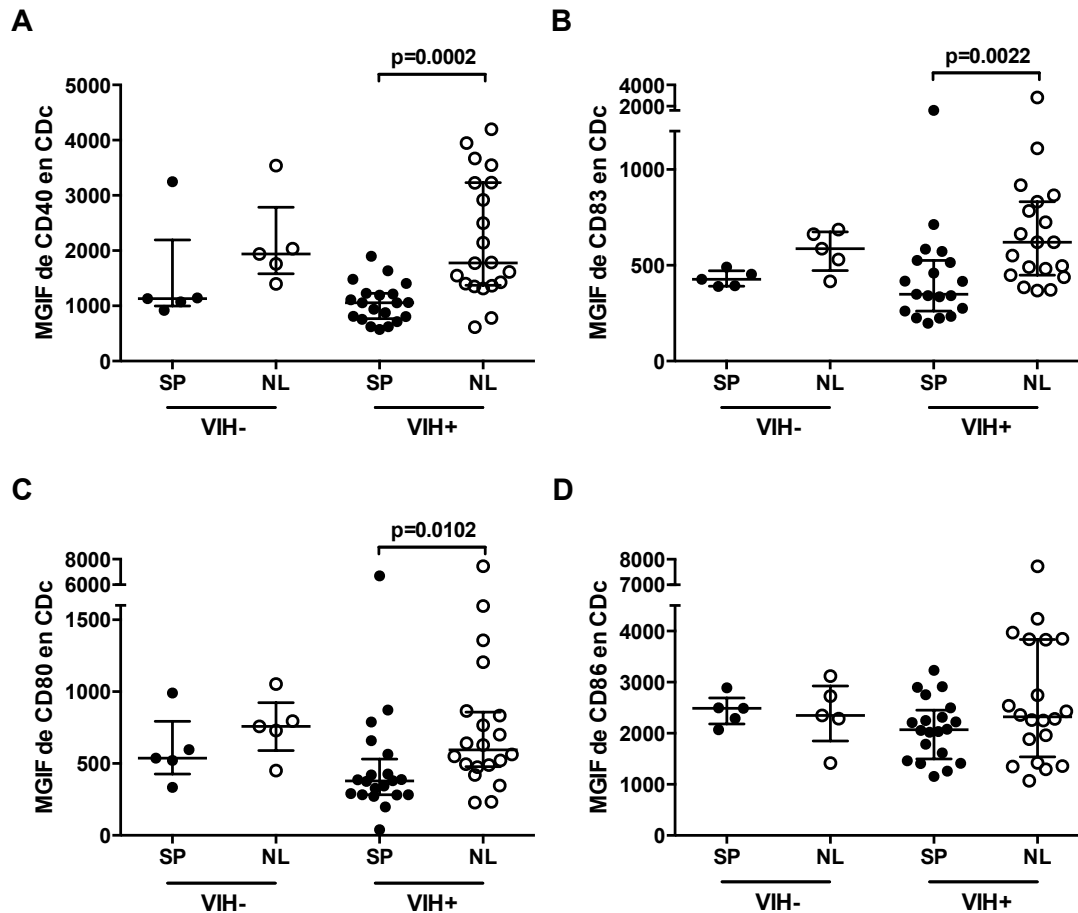


Figura 9. Expresión de marcadores de activación y co-estimulación en CDc de SP y NL. **A.** Expresión de CD40 en CDc de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **B.** Expresión de CD83 en CDc de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **C.** Expresión de CD80 en las CDc de SP y NL de personas VIH- y VIH+. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar las CDc de SP y NL. Se consideró $p < 0.05$ como significativo. MGIF: media geométrica de la intensidad de fluorescencia.

El análisis de la expresión (MGIF) de las proteínas de activación CD40 y CD83, así como de las proteínas co-estimuladoras CD80 y CD86 en las CDc de personas VIH- y VIH+ mostró que, la expresión de CD40, CD83 y CD80 aumentó significativamente únicamente en el NL con respecto a SP en el grupo de personas con VIH ($p=0.0002$, $p=0.0022$ y $p=0.0102$ respectivamente; figura 9A, 9B y 9C). No se observó diferencia significativa en la expresión de CD86 en CDc de SP o NL en ambos grupos de estudio (figura 9E).

En este estudio también se determinó la expresión de proteínas co-inhibidoras. En la figura 10, se muestra la expresión de las proteínas co-inhibidoras PD-1 y PD-L1 en las CDc de NL de personas VIH- y VIH+ (histogramas representativos, figura 10A). Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en la frecuencia y ni en la expresión de PD-1 en las CDc de NL de ambos grupos de estudio (figura 10A y 10B). Interesantemente, se encontró una correlación positiva de la expresión de PD-1+ en las cDC de NL y la CVp de personas con VIH ($r=0.6206$, $p=0.0103$; figura 10C). Al determinar la expresión de PD-L1, se observó que la frecuencia de CDc PD-L1+ fue similar en SP y NL de personas sin VIH, mientras que, en el grupo de personas VIH+ se observó un incremento significativo en la frecuencia de CDc PD-L1+ en el NL con respecto a SP ($p<0.0001$, figura 10D). Más aún, la frecuencia de CDc PD-L1+ incrementó significativamente en el NL de personas VIH+ comparado con el NL de individuos sin VIH ($p=0.0231$, figura 10D). Además, observamos que la expresión (MGIF) de PD-L1 fue significativamente mayor en las cDC de NL con respecto a las de SP en ambos grupos de estudio ($p=0.0159$ y $p=0.0002$; figura 10E).

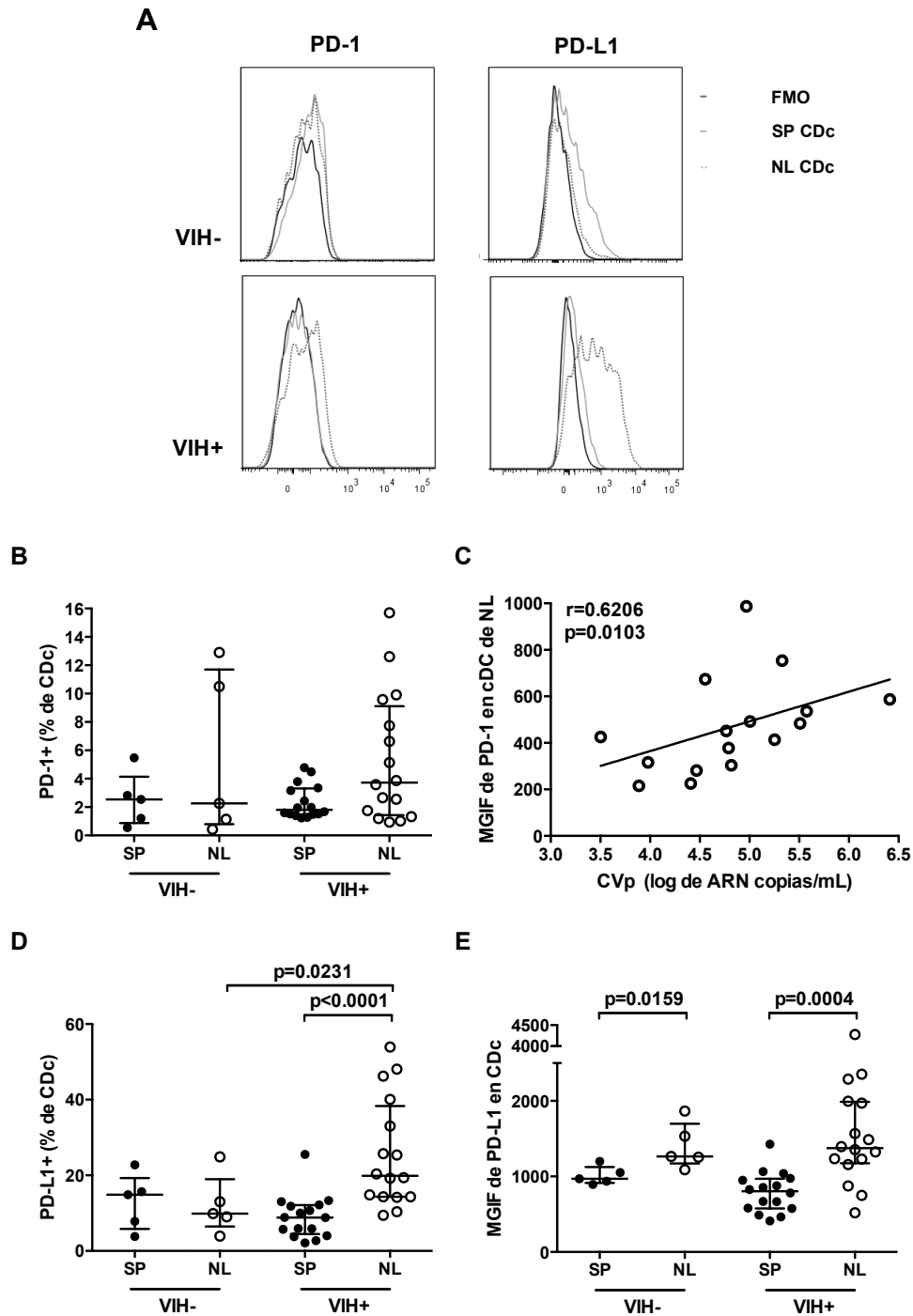


Figura 10. Expresión de proteínas co-inhibidoras en CDc de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **A.** Histogramas representativos de la expresión de PD-1 y PD-L1 en las CDc de SP y NL de personas VIH- y VIH+ (FMO control: línea negra, CDc de SP: línea gris y CDc de NL: línea punteada). **B.** Frecuencia de CDc PD-1+ de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **C.** Correlación positiva de la expresión de PD-1 en cDC de NL con la carga viral de personas VIH+. **D.** Frecuencia de CDc PD-L1+ en SP y NL de personas VIH- y VIH+. **E.** Expresión (MGIF) de PD-L1 en CDc de SP y NL de personas VIH- y VIH+. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica U de Mann Whitney para comparar las CDc de SP y NL de ambos grupos. Se consideró $p<0.05$ como significativo. FMO: Fluorescence minus one; MGIF: media geométrica de la intensidad de fluorescencia.

5.3 Asociaciones con la carga viral en plasma y PD-L1 en células dendríticas convencionales

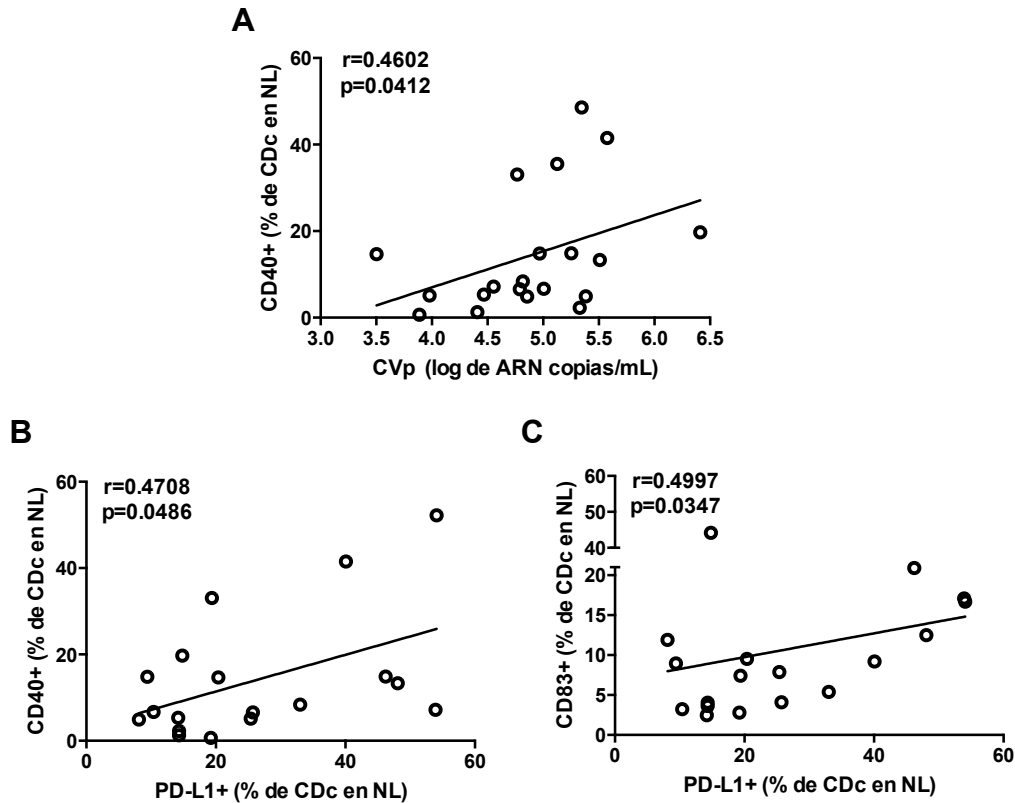


Figura 11. Correlación con la carga viral en plasma o con CDc PD-L1+ en personas VIH+. **A.** Correlación entre la frecuencia de CDc CD40+ y la carga viral en plasma de personas VIH+. **B.** Correlación entre la frecuencia de CDc CD40+ y CDc PD-L1+ de NL de personas con VIH. **C.** Correlación entre la frecuencia de CDc CD83+ y CDc PD-L1+ de NL de personas con VIH. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideró $p < 0.05$ como significativo.

Para determinar asociaciones entre la activación de las CD y la carga viral en plasma, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para datos no paramétricos. En el grupo de personas con VIH+, se observó que la frecuencia de las CDc que expresan CD40 en el NL correlacionó positivamente con la CVp y con la frecuencia de CDc PD-L1+ en el NL ($r=0.4602$, $p=0.0412$; $r=0.4708$, $p=0,0486$; figura 11A y 11B, respectivamente). Además, la frecuencia de las CDc CD83+ en

el NL correlacionó positivamente con la frecuencia de CDc PD-L1+ en el NL de personas VIH+ ($r=0.4997$, $p=0.0347$; figura 11C).

5.4 Análisis fenotípico de células dendríticas plasmacitoides

Para determinar el fenotipo de las CDp en la SP, se realizó el análisis de la expresión de marcadores de activación, proteínas co-estimuladoras y co-inhibidoras por citometría de flujo. En la figura 12, se muestra la expresión (MGIF) de las proteínas de activación CD40 y CD83 y la frecuencia (%) de células positivas a estas proteínas en las CDp de SP de personas VIH- y VIH+. En este análisis fenotípico, se observó un incremento significativo en la frecuencia de CDp que expresan CD40 en el NL de personas VIH+ con respecto a SP ($p=0.0143$, figura 12A). Sin embargo, la expresión de CD40 en las CDp tanto de SP como de NL fue significativamente menor en el grupo de personas con VIH+ comparado con el grupo VIH- ($p=0.0389$ respectivamente, figura 12B). Además, observamos que la frecuencia de CDp CD83+ y su expresión en éstas células fue mayor en el NL de personas VIH+ con respecto a la SP ($p=0.0275$ y $p=0.0226$, respectivamente; figura 12C y 12D).

En la figura 13, se graficó la expresión (MGIF) de las proteínas co-estimuladoras CD80 y CD86 y la frecuencia (%) de CDp positivas a estas proteínas de SP y NL de personas VIH- y VIH+. En este análisis, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia de CDp CD80+ o CD86+ al comparar ambos compartimentos (SP y NL) o grupos de estudio (VIH- y VIH+) (figura 13A y 13C). De igual manera, la expresión de CD80 fue similar entre ambos compartimentos (SP y NL) en ambos grupos de estudio (VIH- y VIH+) (figura 13B).

Únicamente la expresión de CD86 aumentó significativamente en las CDp de NL de personas VIH+ con respecto a los individuos VIH- ($p=0.0296$, figura 13D).

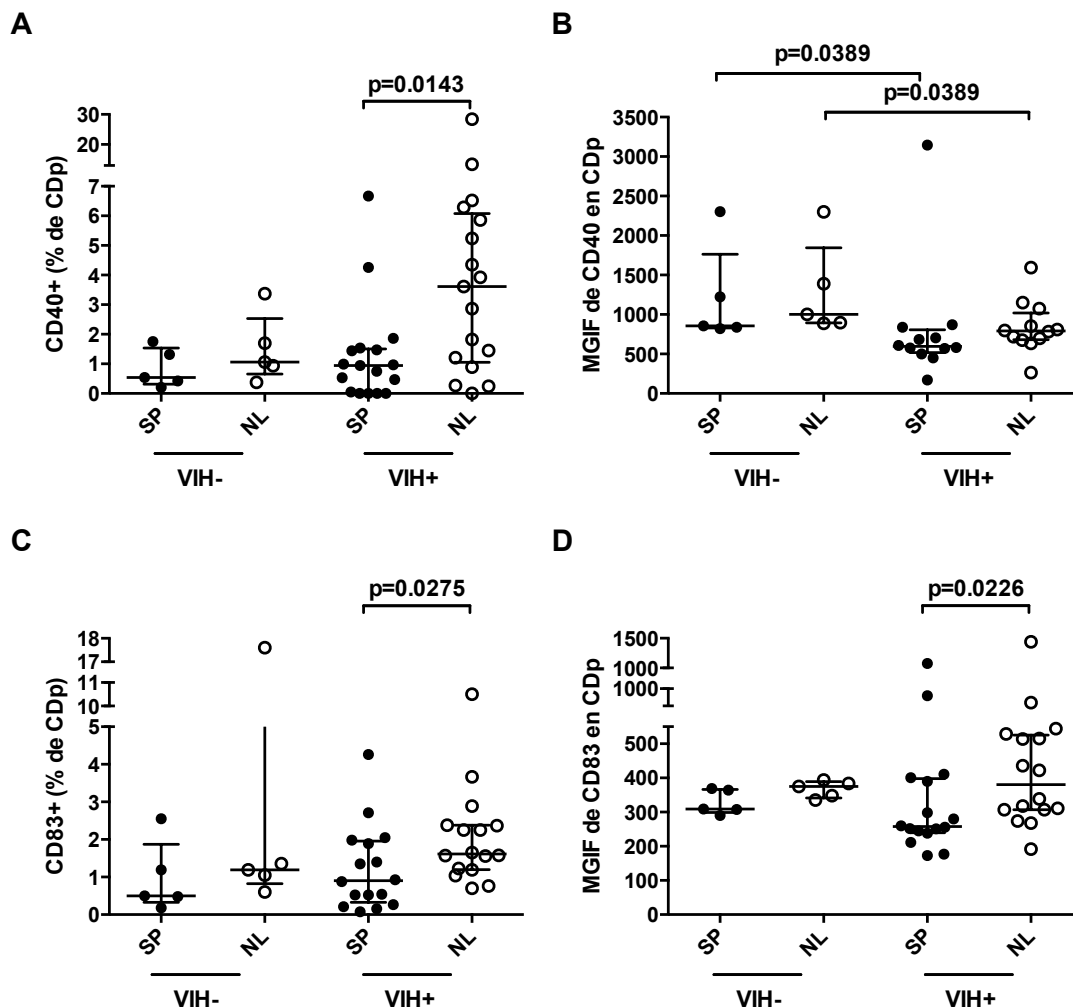


Figura 12. Marcadores de activación en las CDp de SP y NL de personas VIH- y VIH+. A. Frecuencia de CDp CD40+ de SP y NL de personas VIH- y VIH+. B. Nivel de expresión de CD40 en CDp de SP y NL de personas VIH- y VIH+. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar ambos compartimentos o grupos de estudio. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

En este estudio, se determinó de igual manera la expresión de PD-1 y PD-L1 en las CDp de SP y NL de personas VIH- y VIH+. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia o expresión de PD-1 y PD-L1 en las CDp de personas VIH+ con respecto a las CDp de personas VIH- (datos no mostrados).

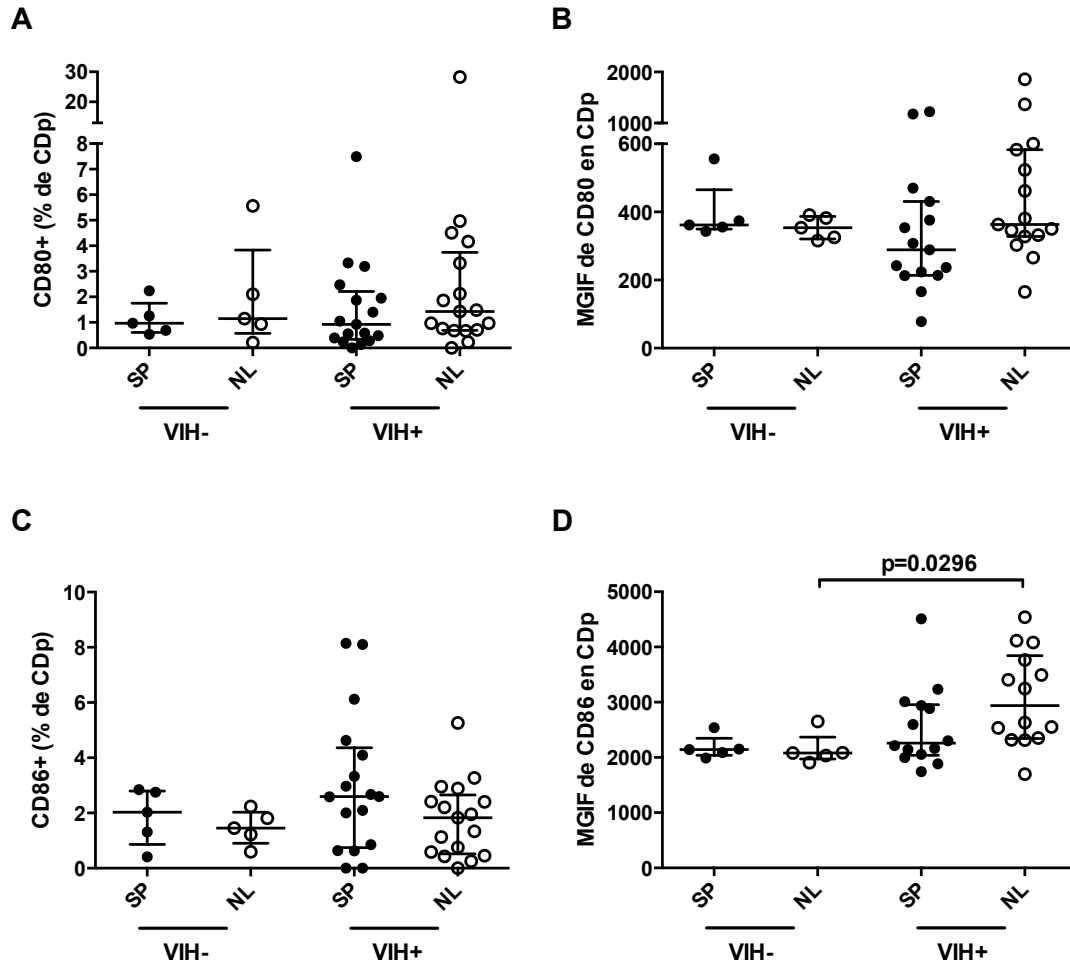


Figura 13. Proteínas co-estimuladoras en las CDp SP y NL de personas VIH- y VIH+. **A.** Frecuencia de CDp CD80+ en SP y NL de personas VIH- y VIH+. **B.** Expresión de CD80 en CDp de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **C.** Frecuencia de CDp CD86+ de SP y NL de personas VIH- y VIH+. **D.** Expresión de CD86 en CDp de SP y NL de personas VIH- y VIH+. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar ambos compartimentos o grupos de estudio. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa. MGIF, media geométrica de la intensidad de fluorescencia.

5.5 Asociaciones con la carga viral en células dendríticas plasmacitoides

Para determinar asociaciones entre la activación de las CDp y la carga viral en plasma, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Se observó que la frecuencia de las CDp que expresan CD40 o CD83 en el NL correlacionó positivamente con la carga viral en plasma, en el grupo de personas con VIH+ ($r=0.5459$, $p=0.0191$; $r=0.4729$, $p=0.0475$; figura 14A y 14B).

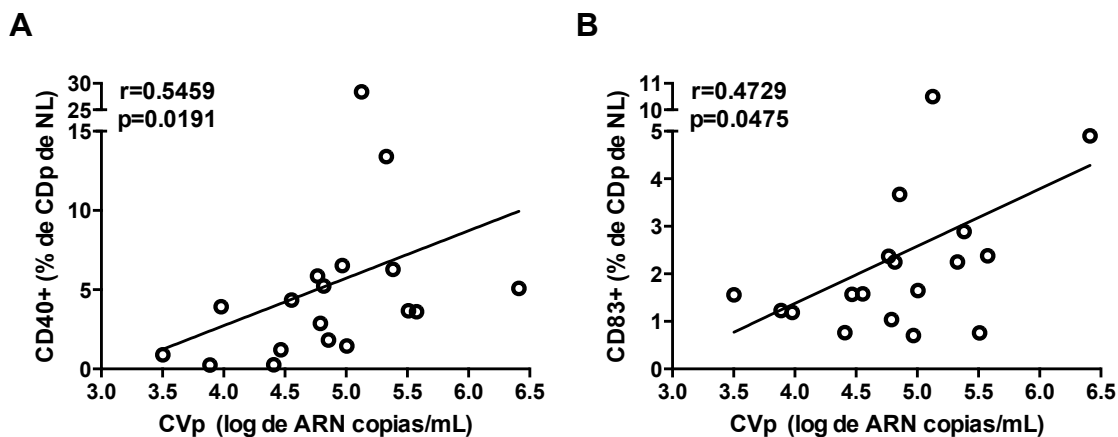


Figura 14. Correlación de la carga viral con proteínas de activación en CDp de personas VIH+. **A.** Correlación entre la frecuencia de CDp CD40+ y la CVp de personas VIH+. **B.** Correlación entre la frecuencia de CDp CD83+ y la CVp de personas VIH+. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideró $p < 0.05$ como significativo.

5.6 Análisis funcional de células dendríticas convencionales: producción de citocinas

Para determinar la funcionalidad de las CDC de personas con VIH, se determinó por citometría de flujo la producción de las citocinas TNF- α , IFN- α e IL-12 intracelularmente después de estimular las células con ligandos de TLR. En la figura 15, se muestra un ejemplo representativo de la gráfica de puntos obtenida del análisis en el programa FlowJo. En cada gráfica de puntos, el recuadro de la derecha delimita el porcentaje de la población de CDC que produjo intracelularmente las citocinas IL-12 o TNF- α .

Los resultados de nuestro análisis de funcionalidad mostraron que la frecuencia de CDC IL-12+ o TNF- α + de SP y NL de personas con VIH incrementó después de ser estimuladas con distintos ligandos de TLR (ssRNA40 para TLR8, LPS para TLR4, o LPS+CpG para TLR4 y TLR9) (figura 15, 16A y 16B). También se observó que la frecuencia de CDC IFN- α + fue muy baja después de estimular

TLR-7 con ssRNA40 o TLR-4 con LPS. (figura 16C). Al comparar las CDc de SP y NL, se observó que la frecuencia de CDc IL-12+ (figura 16A) o TNF- α + (figura 16B) fue similar en ambos compartimentos con cualquier condición de estímulo.

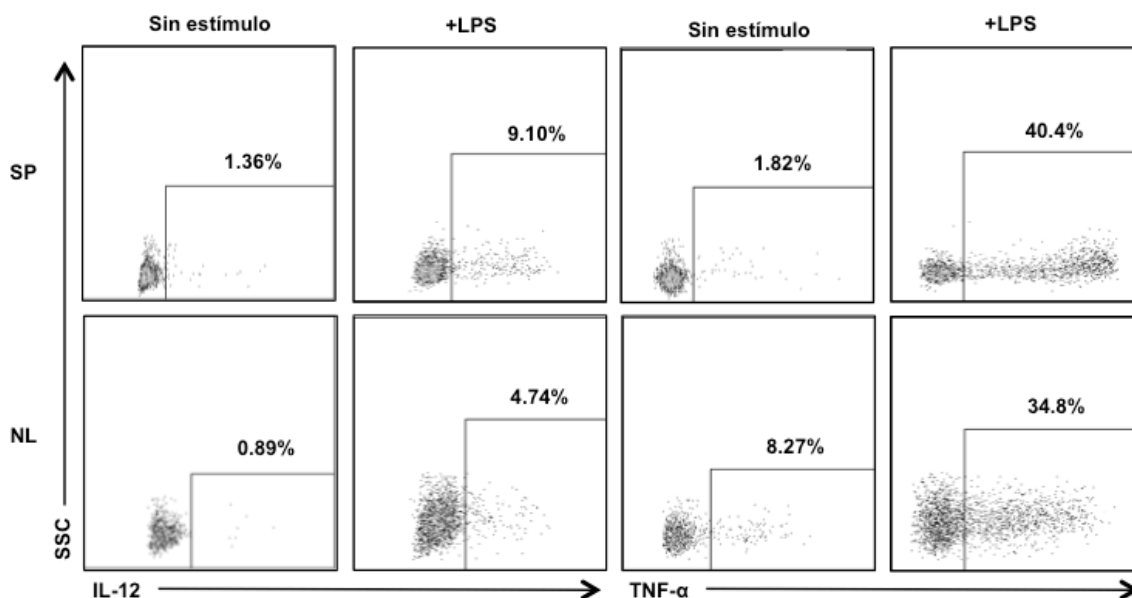


Figura 15. Ejemplo representativo de la frecuencia de CDc IL-12+ o TNF- α + de SP y NL de personas VIH+. Los recuadros superiores muestran gráficas de puntos que representan la frecuencia de las CDc IL-12+ o TNF- α + de SP de personas VIH+ en condiciones sin estímulo y después de ser estimuladas con un ligando del TLR4 (LPS 1 μ g/mL). Los recuadros inferiores muestran las gráficas de puntos que representan la frecuencia de las CDc IL-12+ o TNF- α + de NL de personas VIH+ en condiciones sin estímulo y después de ser estimuladas con LPS (1 μ g/mL). En el eje de las Y: SSC indica la granularidad de las células.

Para determinar diferencias en la respuesta de las CDc de SP y NL de personas con VIH, se compararon estadísticamente ambos compartimentos. Interesantemente, en la condición sin estímulo se observó un incremento significativo en el porcentaje de CDc TNF- α + en el NL con respecto de la SP de personas con VIH ($p < 0.0001$, figura 16A). La frecuencia de CDc IFN- α + fue significativamente mayor en el NL únicamente después de estimular las células con dos ligandos de TLR simultáneamente, LPS+CpG (TLR-4 y -9) ($p = 0.0088$, figura 16C). Importantly, se observó que la frecuencia de CDc TNF- α + fue

mayor que la frecuencia de CDc IL-12+ después de ser estimuladas con los ligandos de TLR mencionados (figura 16A y 16B).

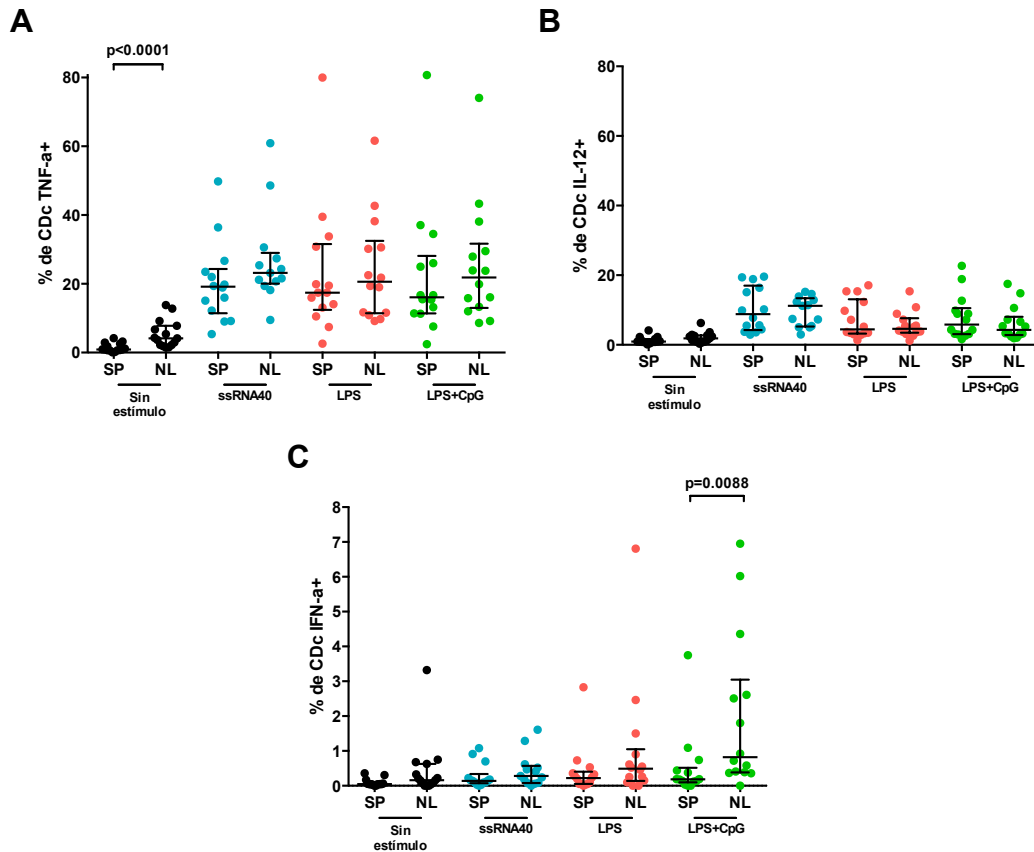


Figura 16. Comparación de la frecuencia de CDc TNF- α +, IL-12+ e IFN- α + entre SP y NL de personas con VIH estimuladas con ligandos de TLR. A. Frecuencia de CDc TNF- α + de SP y NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS o la combinación de LPS+CpG. **B.** Frecuencia de CDc IL-12+ de SP y NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS o la combinación de LPS+CpG. **C.** Frecuencia de CDc IFN- α + de SP y NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS o la combinación de LPS+CpG. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica U de Mann Whitney para comparar ambos compartimentos. Se consideró una p<0.05 como significativa.

Al comparar la producción de citocinas en las CDc de SP de la condición control (sin estímulo) entre los diversos estímulos, se observó que la frecuencia de CDc TNF- α + de SP, incrementó significativamente después de estimular el TLR-8

con ssRNA40, el TLR-4 con LPS o TLR-4 y -9 con LPS+CpG ($p < 0.0001$ respectivamente, figura 17A).

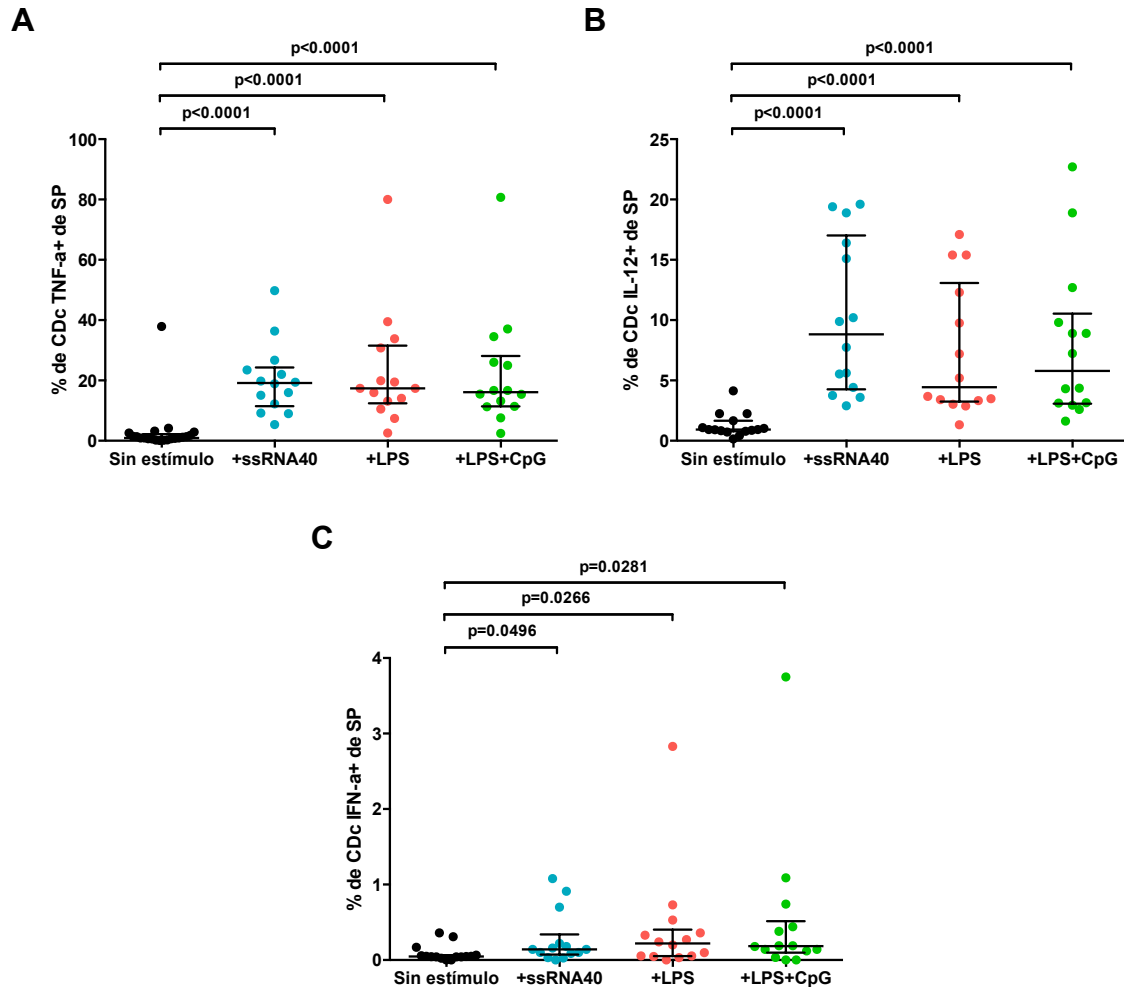


Figura 17. Frecuencia de CDc TNF- α +, IL-12+ e IFN- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ligandos de TLR. A. Frecuencia de CDc TNF- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS o la combinación de LPS+CpG. **B.** Frecuencia de CDc IL-12+ de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS o la combinación de LPS+CpG. **C.** Frecuencia de CDc IFN- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS o la combinación de LPS+CpG. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar el control (sin estímulo) con cada condición estimulada. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

De igual manera, la frecuencia de CDc IL-12+ de SP, incrementó significativamente después de estimular con ssRNA40, LPS o LPS+CpG ($p < 0.0001$ respectivamente, figura 17B). Aunque la frecuencia de CDc IFN- α + de

SP fue muy baja, se observó que ésta aumentó significativamente al estimular con ssRNA40, LPS o LPS+CpG ($p=0.0496$, $p=0.0266$, $p=0.0281$, respectivamente; figura 17C).

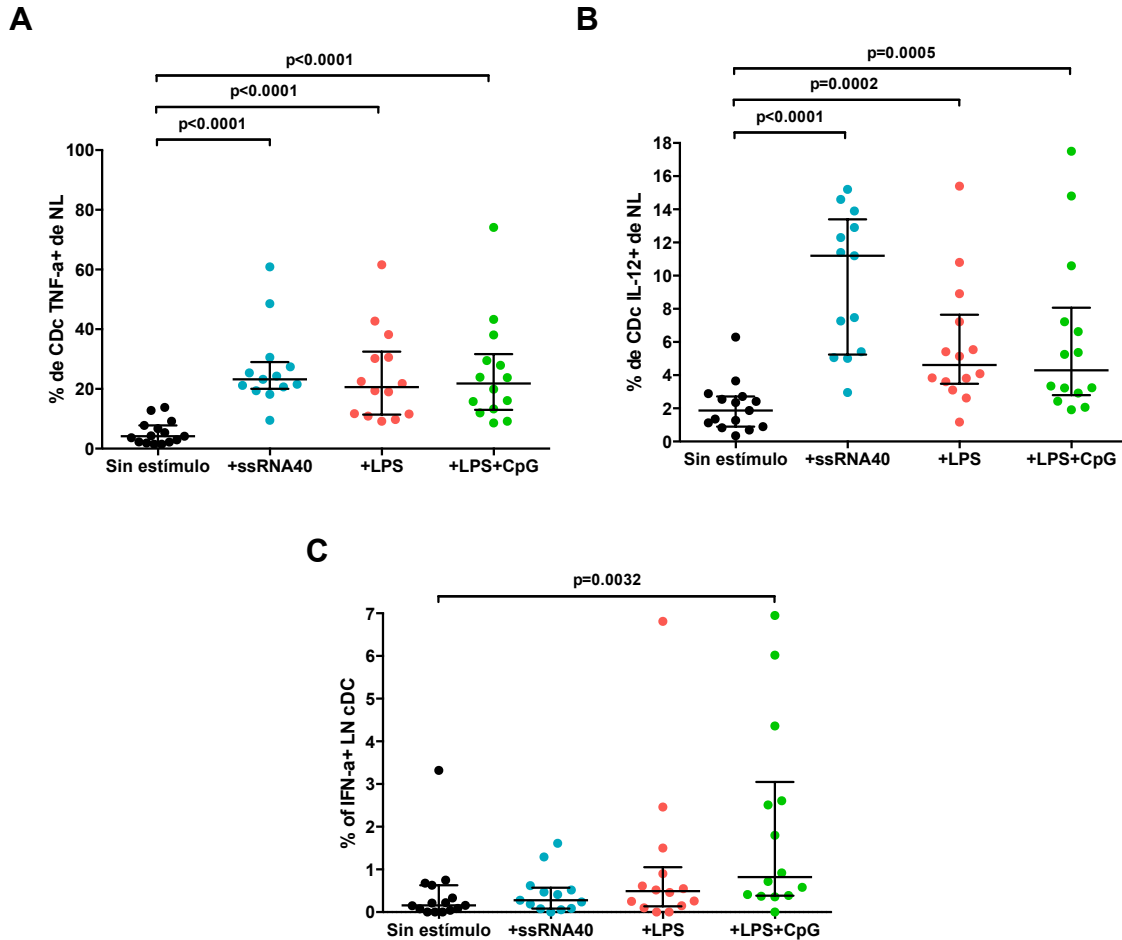


Figura 18. Frecuencia de CDc TNF- α +, IL-12+ e IFN- α + de NL de personas con VIH estimuladas con ligandos de TLR. A. Frecuencia de CDc TNF- α + de NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS, CpG o la combinación de LPS+CpG. **B.** Frecuencia de CDc IL-12+ de NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, LPS, CpG o la combinación de LPS+CpG. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar el control (sin estímulo) con cada condición estimulada. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

Al comparar la producción de citocinas en las CDc de NL de la condición control (sin estímulo) con los diversos estímulos, se encontró que la frecuencia de CDc TNF- α + de SP, incrementó significativamente después de la estimulación con

ssRNA40, LPS o LPS+CpG ($p < 0.0001$ respectivamente, figura 18A). Además, la frecuencia de CDc IL-12⁺ de NL, incrementó significativamente después de estimular con ssRNA40, LPS o LPS+CpG ($p < 0.0001$, $p = 0.0002$ y $p = 0.0005$, respectivamente; figura 18B). A diferencia de las CDc de SP, la frecuencia de CDc IFN- α ⁺ del NL aumentó significativamente solo después de estimular simultáneamente el TLR-4 y -9 (LPS+CpG) ($p = 0.0032$, figura 18C).

5.7 Asociaciones con la carga viral y producción de citocinas en células dendríticas convencionales

Para determinar si el incremento en la producción de citocinas se asocia con la CVp y, por tanto, con la funcionalidad de las CDc estimuladas, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman para datos no paramétricos. Se observó una correlación positiva entre la frecuencia de las CDc TNF- α ⁺ o CDc IL-12⁺ de SP después de ser estimuladas con ssRNA40 con la CVp en el grupo de personas con VIH⁺ ($r = 0.7802$, $p = 0.0015$; $r = 0.6615$, $p = 0.0121$; figura 19A y 19B). Más aún, se observó una correlación positiva entre la frecuencia de las CDc IL-12⁺ del NL estimuladas con ssRNA40 con la CVp ($r = 0.5089$, $p = 0.0340$; figura 19C).

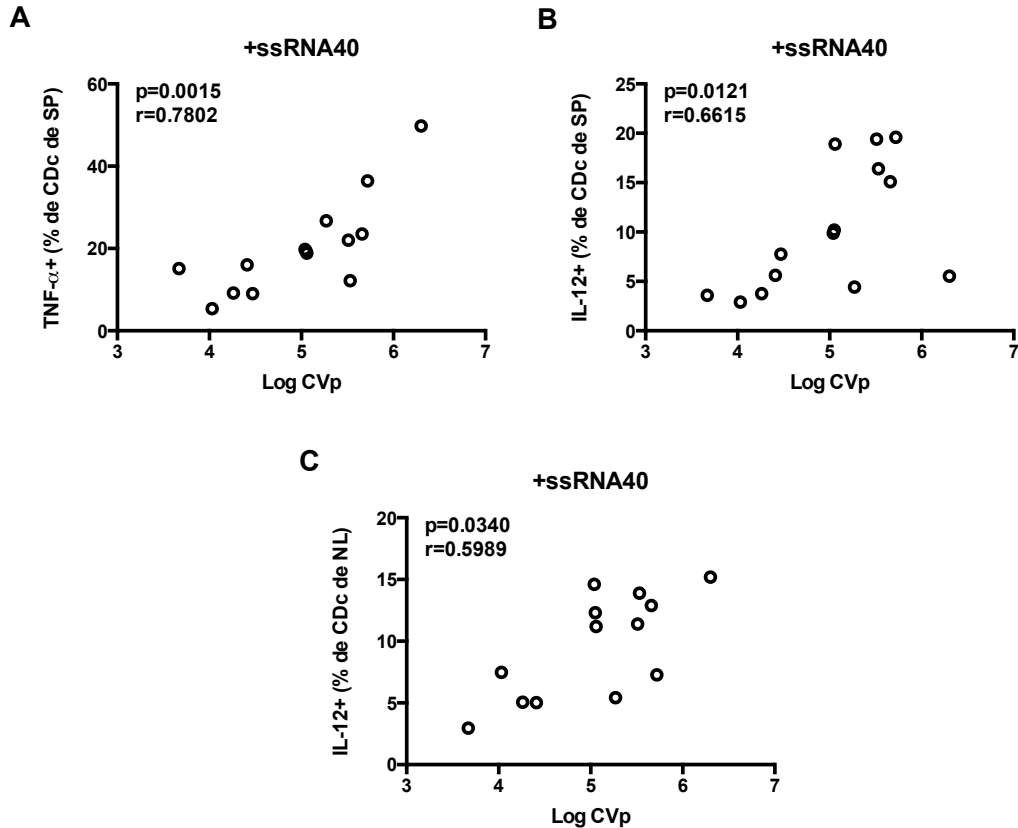


Figura 19. Correlación de la carga viral con la producción de citocinas en las CDc de personas VIH+ después de estimular el TLR-8 con ssRNA40. A. Correlación entre la frecuencia de CDc TNF- α + de SP y la CVp de personas VIH+. **B.** Correlación entre la frecuencia de CDc IL-12+ de SP y la CVp de personas VIH+. **C.** Correlación entre la frecuencia de CDc IL-12+ de NL y la CVp de personas VIH+. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideró $p < 0.05$ como significativo.

5.8 Análisis funcional de células dendríticas plasmacitoides: producción de citocinas

En la figura 20, se muestra un ejemplo representativo de la gráfica de puntos obtenida del análisis en FlowJo. En cada gráfica de puntos, el recuadro de la derecha delimita las CDp que produjeron citocinas (IFN- α y TNF- α) después de estimular el TLR-9 con CpG. En nuestros resultados, se observó que las CDp de SP y NL de personas con VIH fueron capaces de producir IFN- α , IL-12 y TNF- α

después de ser estimuladas con ligandos de TLR (ssRNA40 para TLR-7, CpG para TLR-9 o LPS+CpG para TLR-4 y -9).

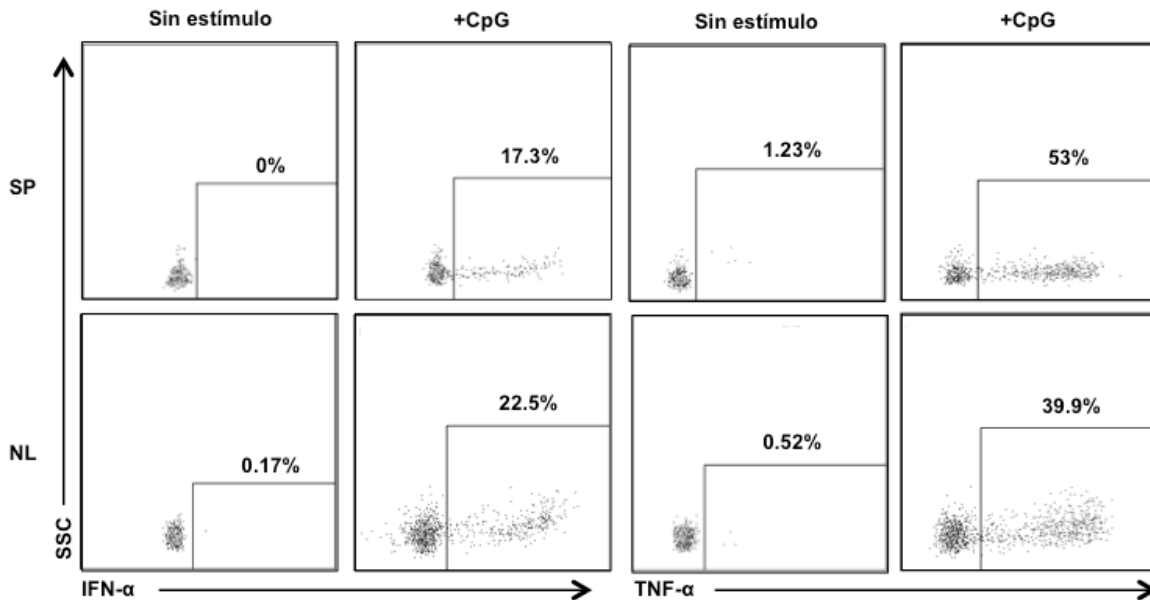


Figura 20. Ejemplo representativo de la frecuencia de CDp IFN- α + o TNF- α + de SP y NL de personas VIH+. Los recuadros superiores muestran gráficas de puntos que representan la frecuencia de las CDp IFN- α + o TNF- α + de SP de personas VIH+ en condiciones sin estimular y después de ser estimuladas con un ligando del TLR9 (CpG 3 μ g/mL). Los recuadros inferiores muestran las gráficas de puntos que representan la frecuencia de las CDp IFN- α + o TNF- α + del NL de personas VIH+ en condiciones sin estimular y después de ser estimuladas con CpG (3 μ g/mL). En el eje de las Y: SSC indica la granularidad de las células.

Interesantemente, en la condición sin estímulo, la frecuencia de las CDp IFN- α + del NL fue mayor que la de SP ($p=0.0122$, figura 21C). La frecuencia de CDp TNF- α +, IL-12+ e IFN- α + del NL fue mayor que la frecuencia CDp de SP después de ser estimuladas con CpG ($p=0.0541$, $p=0.0495$, $p=0.0122$ para TNF- α -, IL-12 e IFN- α -, respectivamente, figura 21A, 21B y 21C). Además, la frecuencia de CDp TNF- α + de NL también fue significativamente mayor que la de SP después de ser estimuladas con LPS+CpG ($p=0.0236$, figura 21A). Similar a lo observado en las CDc, la frecuencia de las CDp TNF- α + fue mayor que la frecuencia

observada de CDp IFN- α + o CDp IL-12+ después de ser estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG (figura 21A, 21B y 21C).

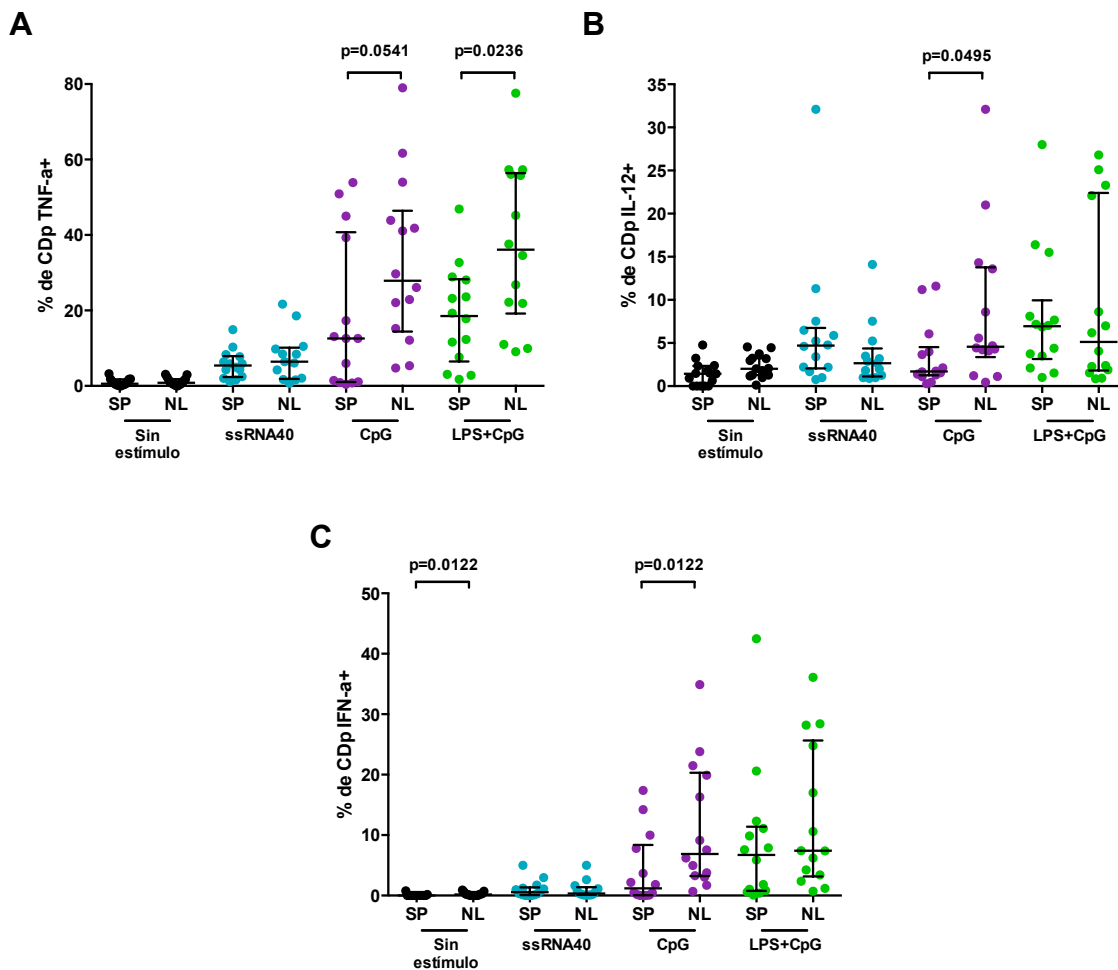


Figura 21. Frecuencia de CDp TNF- α +, IL-12+ e IFN- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ligandos de TLR. A. Frecuencia de CDp TNF- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. **B.** Frecuencia de CDp IL-12+ de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. **C.** Frecuencia de CDp IFN- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica U de Mann Whitney para comparar el control (sin estímulo) con cada condición estimulada. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

Para determinar la respuesta o producción de citocinas de las CDp de SP de personas con VIH después de estimularlas con diferentes ligandos de TLR, se comparó la condición control (sin estímulo) con los diversos estímulos. Se observó que la frecuencia de CDp TNF- α + de SP, incrementó significativamente después

de estimular las células con ssRNA40, CpG o LPS+CpG ($p < 0.0001$, $p = 0.0008$, $p < 0.0001$, para TNF, IL12, etc, respectivamente; figura 22A). Por otro lado, la frecuencia de CDp IL-12+ aumentó significativamente con el estímulo de ssRNA40 ($p = 0.0009$) o con la combinación de LPS+CpG ($p < 0.0001$, figura 22B), pero no con CpG solo.

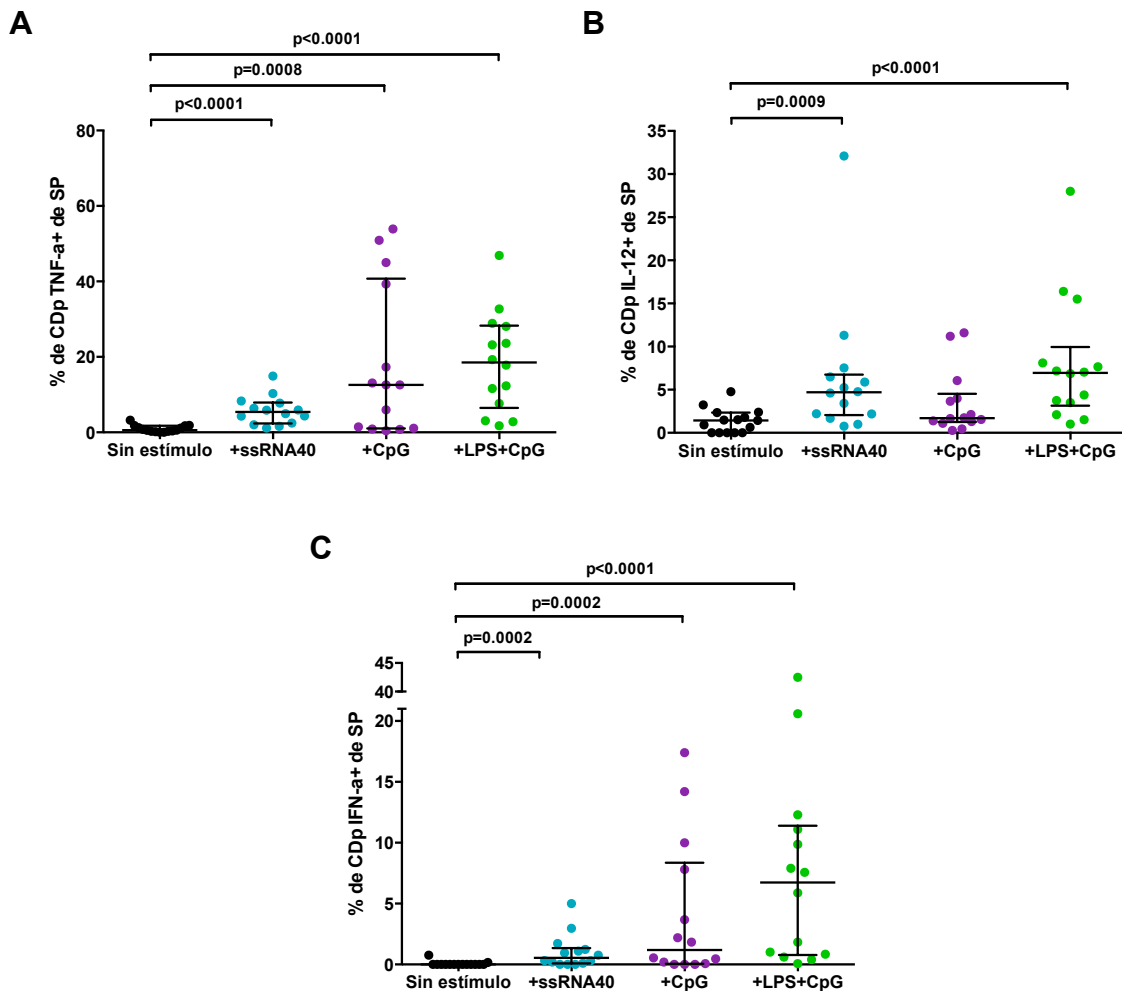


Figura 22. Frecuencia de CDp TNF- α +, IL-12+ e IFN- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ligandos de TLR. A. Frecuencia de CDp TNF- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. **B.** Frecuencia de CDp IL-12+ de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. **C.** Frecuencia de CDp IFN- α + de SP de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar el control (sin estímulo) con cada condición estimulada. Se consideró una $p < 0.05$ como significativa.

Similar a lo observado con la producción de TNF- α , la frecuencia de CDp IFN- α + de SP, incrementó significativamente después de estimular con ssRNA40, CpG o LPS+CpG ($p=0.0002$, $p=0.0002$, $p<0.0001$, respectivamente; figura 22C). Aunque las CDp no expresan TLR-4, el cual reconoce al LPS, la frecuencia de CDp IL-12+ de SP aumenta significativamente al estimular con LPS+CpG, pero no únicamente con CpG (figura 22B).

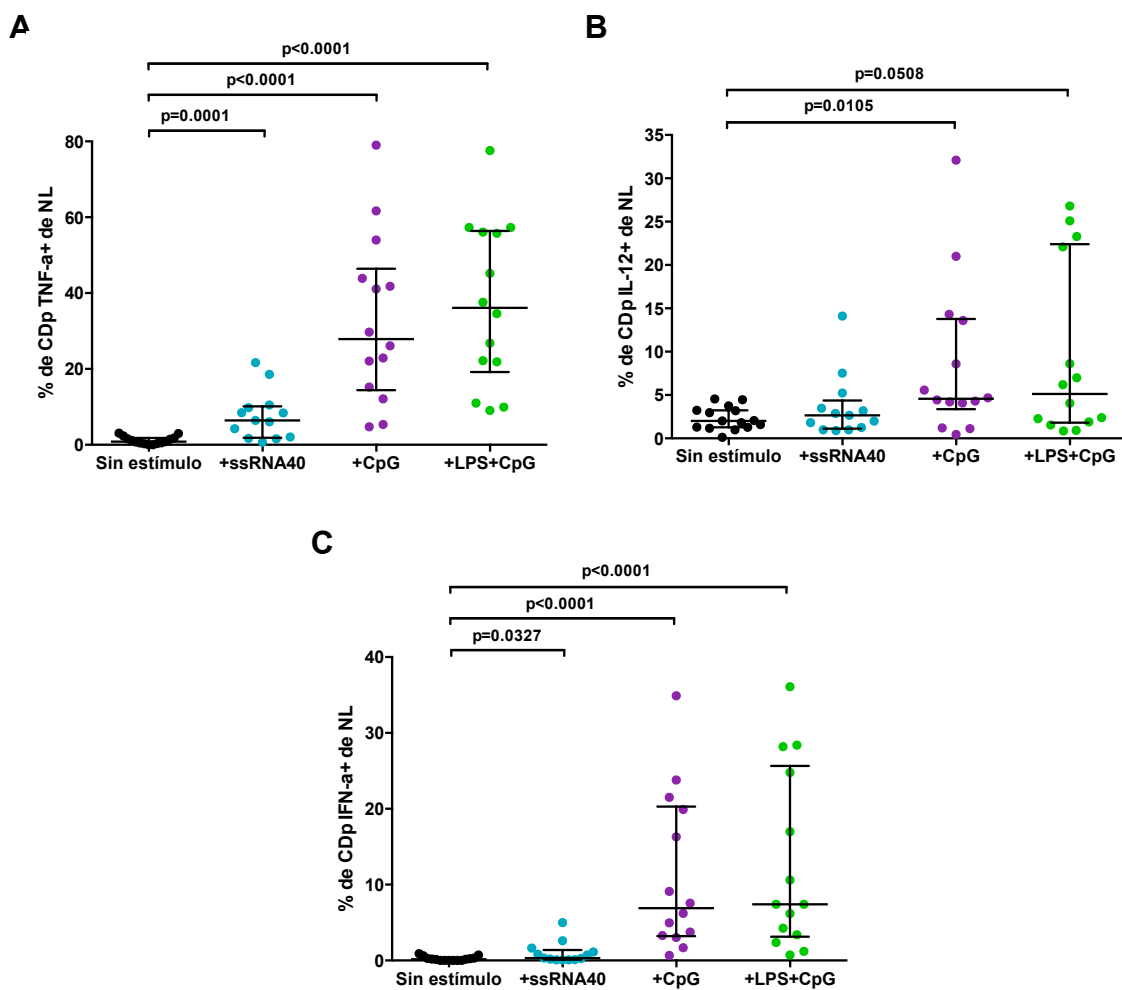


Figura 23. Frecuencia de CDp TNF- α +, IL-12+ e IFN- α + de NL de personas con VIH estimuladas con ligandos de TLR. A. Frecuencia de CDp TNF- α + de NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. **B.** Frecuencia de CDp IL-12+ de NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. **C.** Frecuencia de CDp IFN- α + de NL de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, CpG o LPS+CpG. Se aplicó la prueba estadística no paramétrica *U* de Mann Whitney para comparar el control (sin estímulo) con cada condición estimulada. Se consideró una $p<0.05$ como significativa.

Similarmente a lo observado en las CDp de SP, podemos observar que la frecuencia de CDp TNF- α + de NL incrementó significativamente después de estimular las células con ssRNA40, CpG o LPS+CpG ($p=0.0001$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, respectivamente; figura 23A). Por otro lado, la frecuencia de CDp IL-12+ del NL aumentó significativamente solo con el estímulo de CpG ($p=0.0105$, figura 23B). Similar a lo observado con la producción de TNF- α , la frecuencia de CDp IFN- α + de NL, incrementa significativamente después de estimular con ssRNA40, CpG o LPS+CpG ($p=0.0327$, $p<0.0001$, $p<0.0001$, respectivamente; figura 23C).

5.9 Asociaciones con la carga viral y producción de citocinas en células dendríticas plasmacitoides

Para determinar asociaciones entre la la carga viral en plasma y la funcionalidad de las CDp, se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. En el grupo de personas con VIH+, se observó una correlación positiva entre la frecuencia de las CDc TNF- α +, IL-12+ o IFN- α + de NL después de ser estimuladas con CpG con la CVp ($r=0.5429$, $p=0.0479$ para TNF- α ; $r=0.5912$, $p=0.0288$ para IL12; $r=0.5385$ $p=0.0500$ para IFN- α ; figura 24A, 24B y 24C, respectivamente).

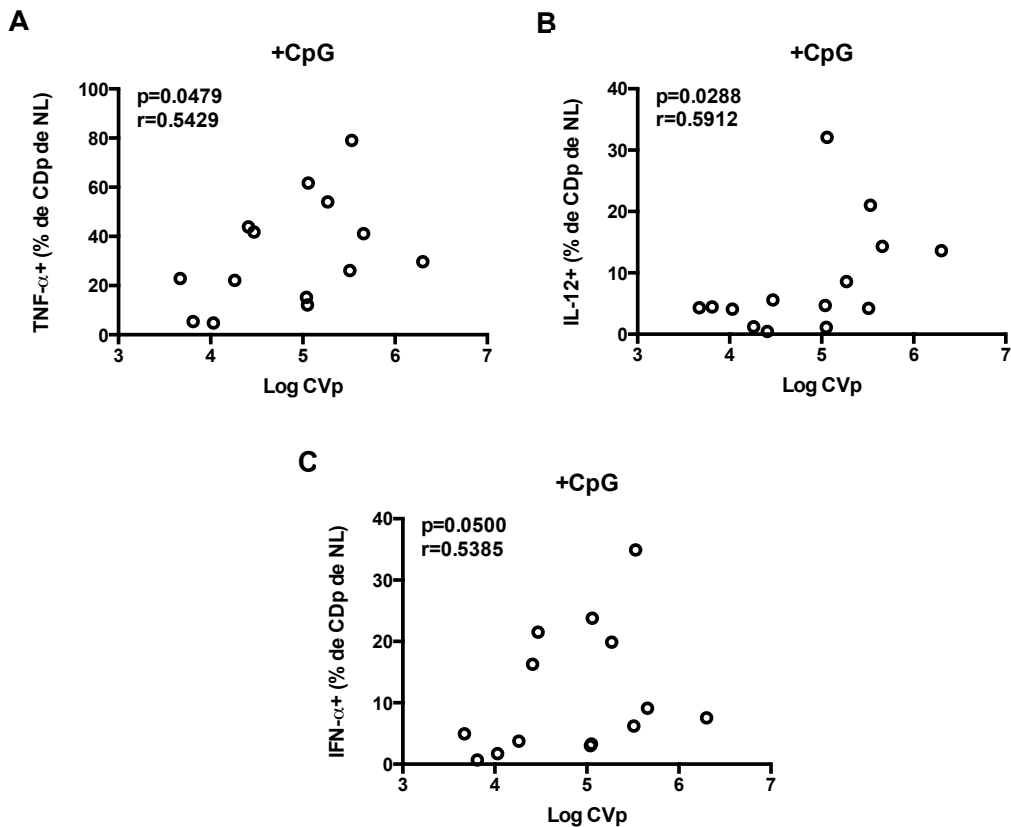


Figura 24. Correlación de la carga viral con la producción de citocinas en las CDp de personas VIH+ después de ser estimuladas con CpG. A. Correlación entre la frecuencia de CDp TNF- α + de NL y la CVp de personas VIH+. **B.** Correlación entre la frecuencia de CDp IL-12+ de NL y la CVp de personas VIH+. **C.** Correlación entre la frecuencia de CDp IFN- α + de NL y la CVp de personas VIH+. Se calculó el coeficiente de correlación de Spearman. Se consideró $p < 0.05$ como significativo.

5.10 Polifuncionalidad de las células dendríticas convencionales

La polifuncionalidad de una célula puede definirse como la capacidad de expresar o producir una o más proteínas o citocinas simultáneamente, lo cual probablemente le confiere a dicha célula ejercer una o varias funciones al mismo tiempo. Para evaluar la capacidad polifuncional de las CD se utilizó el programa SPICE, el cual describe gráficamente la capacidad de las CD de producir varias citocinas. El programa SPICE utiliza datos booleanos que se obtienen del análisis

de las células en el programa de análisis Flowjo. Los datos booleanos representan la frecuencia de aquellas poblaciones de CD que producen una o más de una citocina simultáneamente, en todas las combinaciones posibles (Roederer et al., 2011).

En la figura 25, se muestra la comparación entre las poblaciones de CDc de SP y NL de personas con VIH que produjeron una o varias citocinas después de estimular el TLR8 con ssRNA40, el TLR-4 con LPS o TLR-4 y -9 con LPS+CpG.

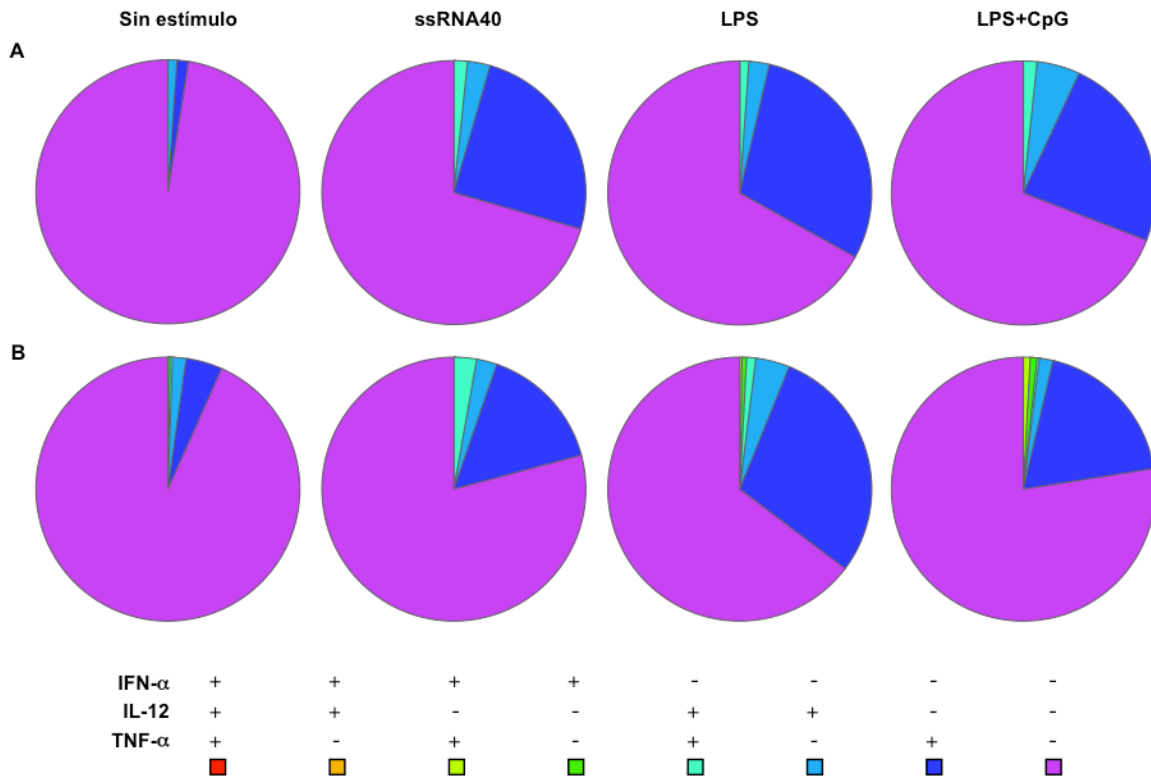


Figura 25. Polifuncionalidad de las CDc de SP y NL de personas con VIH. A. Gráficas de pastel que representan las poblaciones de células dendríticas de SP de personas VIH+ que producen una o varias citocinas sin estímulo, al ser estimuladas con ssRNA40 para TLR-8, LPS para TLR-4 o LPS+CpG para TLR-4 y -9. B. Gráficas de pastel que representan las poblaciones de células dendríticas de NL de personas VIH+ que producen una o varias citocinas sin estímulo, al ser estimuladas con ssRNA40 para TLR-8, LPS para TLR-4 o LPS+CpG para TLR-4 y -9.

Al comparar las CDc de SP y NL con el análisis polifuncional, podemos describir que la frecuencia de las diferentes combinaciones de citocinas o poblaciones de CDc es similar en cada condición (figura 25A y 25B). Además, se observó que las poblaciones de CDc de SP y NL sin estímulo fueron mayoritariamente células que no producen ninguna de las citocinas determinadas, aunque si existen CDc TNF- α + o CDc IL-12+ en muy baja frecuencia (figura 25A y 25B). Con respecto al control (sin estímulo), una vez estimuladas con los ligandos de TLR, tanto las CDc de SP como de NL, en su mayoría no produjeron ninguna de las citocinas determinadas, pero se observó una mayor frecuencia de CDc que produjeron una sola citocina, CDc TNF- α + o IL-12+, al igual que dos citocinas simultáneamente, CDc TNF- α + IL-12+ (figura 25A y 25B). Además, se observó una mayor respuesta en las CDc estimuladas con LPS (TLR-4) (figura 25A y 25B) con respecto de ssRNA40 (TLR-8) o LPS+CpG (TLR-4 y -9).

En la figura 26, se muestra otra forma de representar la polifuncionalidad de las CDc, se observaron las frecuencias de CDc de SP (figura 26A) y NL (figura 26B) de las distintas combinaciones de citocinas o poblaciones de CDc y la similitud de ambos compartimentos en la respuesta antes los estímulos de TLR utilizados. Las poblaciones de CDc de SP y NL fueron mayoritariamente células que no produjeron ninguna de las citocinas estudiadas (TNF- α - IL-12- IFN- α -) aunque sí hay pero en menor frecuencia, CDc que producen una sola citocina, TNF- α + o IL-12+ (figura 26A y 26B). La frecuencia de CDc positivas para dos o más citocinas es prácticamente nula, por tanto podríamos sugerir que la polifuncionalidad de las CDc de SP y NL es escasa.

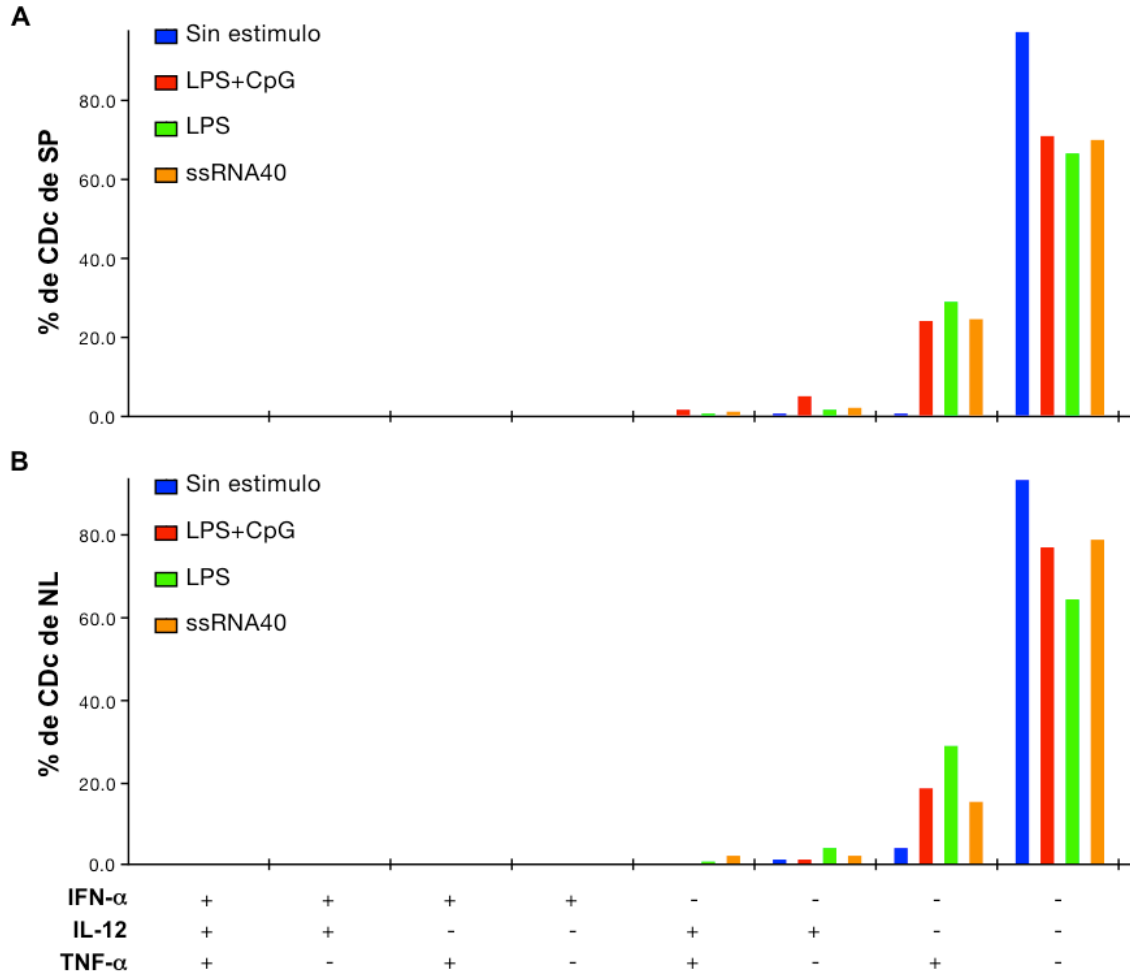


Figura 26. Porcentaje de CDc de SP y NL de personas con VIH que producen una, dos o tres citocinas después de la activación de TLR. A. Porcentaje de CDc de SP de personas con VIH que representa las poblaciones que producen ninguna, una, dos o tres citocinas sin estímulo y al ser estimuladas con LPS+CpG (TLR-4 y -9), LPS (TLR-4) o ssRNA40 (TLR-8). **B.** Porcentaje de CDc de SP de personas con VIH que representa las poblaciones que producen ninguna, una, dos o tres citocinas sin estímulo y al ser estimuladas con LPS+CpG (TLR-4 y -9), LPS (TLR-4) o ssRNA40 (TLR-8).

5.11 Polifuncionalidad de las células dendríticas plasmacitoides

Como se explicó anteriormente, en este estudio, la polifuncionalidad de una célula se definió como la capacidad producir una o más citocinas simultáneamente.

En la figura 27, se muestra la comparación entre las CDp de SP y NL de personas con VIH que producen una, dos ó tres citocinas después de ser estimuladas con ssRNA40 (para TLR-7), CpG (para TLR-9) o LPS+CpG (para TLR-4 y -9). De manera descriptiva, se observó que la combinación de citocinas o poblaciones de CDp de SP y NL en condiciones sin estímulo, fueron mayoritariamente células que no producen ninguna de las citocinas estudiadas (TNF- α , IFN- α e IL-12) (figura 27A y 27B). Una vez estimuladas con los ligandos de TLR mencionados, las CDp de SP produjeron principalmente una sola citocina, CDp TNF- α +, IL-12+ o IFN- α + (figura 27A).

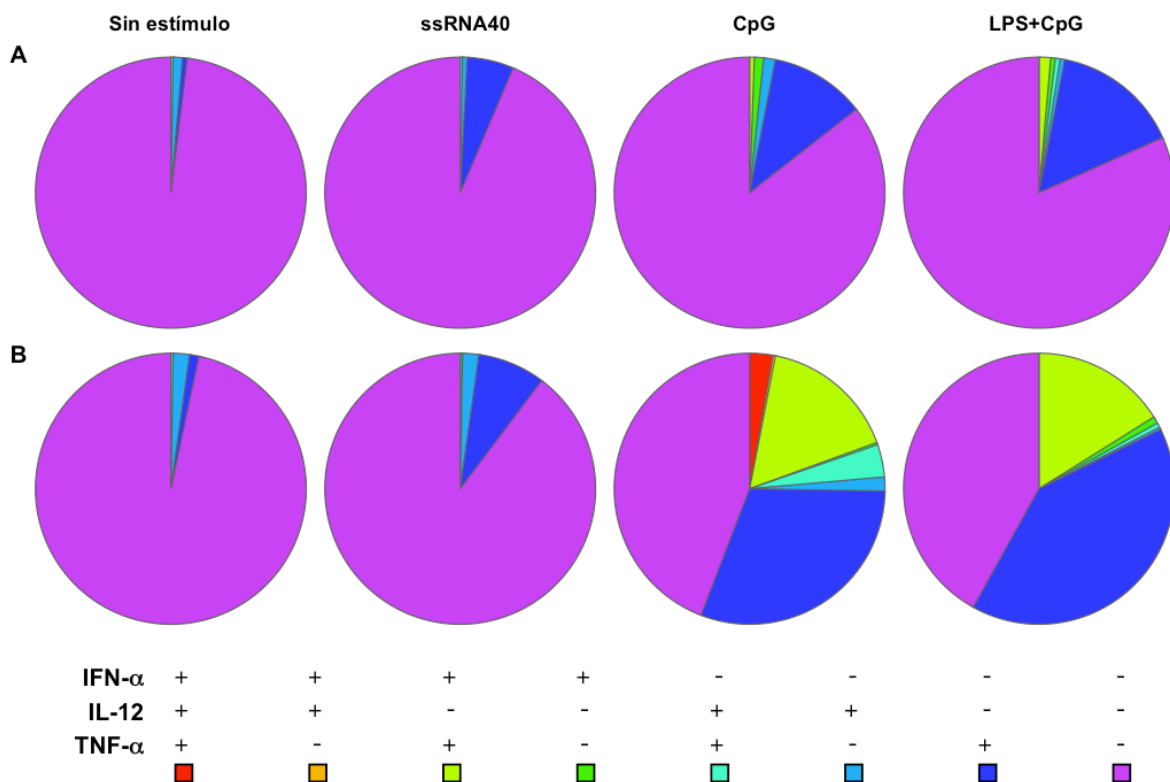


Figura 27. Polifuncionalidad de las CDp de SP y NL de personas con VIH. A. Gráficas de pastel que representan las poblaciones de células dendríticas de SP de personas VIH+ que producen una o varias citocinas sin estímulo y al ser estimuladas con ssRNA40 para TLR-7, CpG para TLR-9 o LPS+CpG para TLR-4 y -9. **B.** Gráficas de pastel que representan las poblaciones de CDp de SP de personas VIH+ que producen una o varias citocinas sin estímulo y al ser estimuladas con ssRNA40 para TLR-7, CpG para TLR-9 o LPS+CpG para TLR-4 y -9.

Interesantemente, podemos observar que las CDp de NL son más polifuncionales que las CDp de SP al ser estimuladas con el CpG, ligando de TLR-7, ya que se observaron poblaciones de CDp que producen dos o tres citocinas al mismo tiempo, CDp TNF- α + IL-12+, CDp TNF- α + IFN- α + y CDp TNF- α + IL-12+ IFN- α + (figura 27A y 27B). Además, la frecuencia de CDp TNF- α + del NL aumentó considerablemente (figura 27B). Al estimular las CDp de NL con dos ligandos simultáneamente LPS+CpG, ya no se observó la población de CDp TNF- α + IL-12+, o la población triple positiva observadas con el estímulo de CpG (figura 27B). Interesantemente, la polifuncionalidad de las CDp de personas con VIH estimuladas con ssRNA40, es similar en SP y NL (figura 27A y 27B), aunque la frecuencia de CDp TNF- α + o CDp IL-12+ es mayor en NL.

En la figura 28, se muestra una forma distinta de representar la polifuncionalidad de las CDp, se graficaron las frecuencias de las distintas combinaciones de citocinas o poblaciones de CDp y se observó una diferencia entre las CDp de SP (figura 28A) y NL (figura 28B) en respuesta a los distintos ligandos de TLR. Las poblaciones de CDp de SP y NL fueron mayoritariamente células que no produjeron ninguna de las citocinas determinadas (TNF- α - IL-12- IFN- α -) aunque en el NL disminuye la frecuencia de éstas con los estímulos de CpG (TLR-9) o LPS+CpG (TLR-4 y -9) (figura 28A y 28B). También se observaron CDp TNF- α + o CDp IL-12+ de SP (figura 28A) aunque en menor frecuencia que en el NL (figura 28B) después de estimular el TLR-7 con ssRNA40, el TLR-9 con CpG o el TLR-4 y -9 con LPS+CpG. Importantemente, la frecuencia de CDp que produjeron dos citocinas (TNF- α + IFN- α +) se observó solo en las CDp del NL

estimuladas con CpG (TLR-9) o LPS+CpG (TLR-4 y -9) (figura 28B). Interesantemente, la frecuencia de CDp TNF α + IL12+ o triples positivas (TNF- α + IL-12 IFN- α +) aunque es muy baja, se observó solamente en las CDp del NL estimuladas con CpG, pero no se observaron en la condición de doble estímulo LPS+CpG (figura 28B). Estos resultados sugieren, que la respuesta de las CDp es distinta dependiendo del estímulo utilizado y que la polifuncionalidad de las CDp del NL es mayor a la de SP.

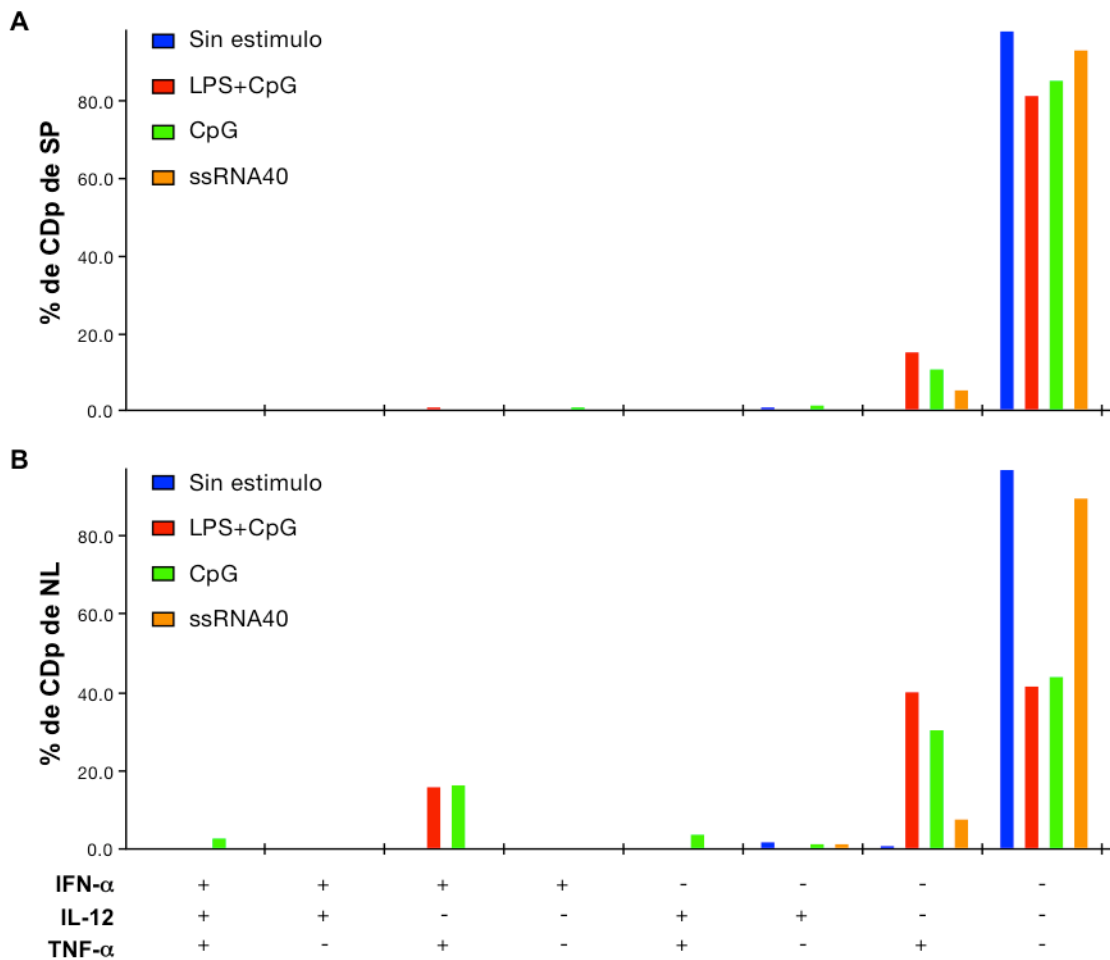


Figura 28. Porcentaje de CDp de SP y NL de personas con VIH que proucen una, dos, tres citocinas. A. Porcentaje de CDp de SP de personas con VIH que representa las poblaciones que producen ninguna, una, dos o tres citocinas sin estímulo y al ser estimuladas con LPS+CpG (TLR-4 y -9), LPS (TLR-4) o ssRNA40 (TLR-7). **B.** Porcentaje de CDp de SP de personas con VIH que representa las poblaciones que producen ninguna, una, dos o tres citocinas sin estímulo y al ser estimuladas con LPS+CpG (TLR-4 y -9), LPS (TLR-4) o ssRNA40 (TLR-7).

6. Discusión de resultados

El NL representa el sitio anatómico en el cual las respuestas de las células T y B son inducidas y reguladas (Buettner and Bode, 2012). Importantemente, hay eventos críticos durante la infección por VIH que ocurren en el NL (van Grevenynghe et al., 2008). El compartimento de tejido linfático es el sitio anatómico donde el VIH es producido y almacenado, incluso después de iniciar TAR (Embretson et al., 1993, Haase, 1999, Pantaleo et al., 1991, Pantaleo et al., 1993). Además, es el sitio anatómico donde se han encontrado algunas correlaciones de protección contra el VIS en modelos PNH (Teleshova et al., 2013, Wijewardana et al., 2009, Wonderlich and Barratt-Boyes, 2012), lo que sugiere que hay eventos esenciales que ocurren en el NL para una respuesta efectiva contra el VIH. De manera importante, en la infección por VIH, se han estudiado principalmente las CD de SP ya que es un compartimento de fácil acceso comparado con el NL. Ya que la presentación de antígeno se lleva a cabo en el NL, el estudio de las CD en el NL de personas con VIH es de vital importancia. En el contexto de la infección por VIH/VIS, la mayoría de estudios de CD se ha enfocado al describir la respuesta de las CDp contra el VIH/VIS en sangre y otros tejidos (Barblu et al., 2012, Brown et al., 2009, Cella et al., 1999, Herbeuval et al., 2012, Killian et al., 2006, Li et al., 2014, Malleret et al., 2008, O'Brien et al., 2013, Wijewardana et al., 2009), y poco se conoce acerca de las CDc y su función durante la infección por VIH (Dillon et al., 2008, Fontaine et al., 2009, Biancotto et al., 2007). En el presente estudio, se observó que la frecuencia de las CDp de SP de personas VIH+ disminuyó significativamente y correlacionó negativamente con

la carga viral (figura 6). Una propuesta interesante que podría explicar la disminución de las CDp de SP de personas con VIH podría ser la conversión de éstas células a CDc, fenómeno que se ha observado en ratones durante infecciones virales (Liou et al., 2008). Sin embargo, no observamos un mayor número de CDc en SP (figura 6). La muerte de las CDp también podría explicar la disminución de estas células en personas con VIH, sin embargo en este trabajo no se observó un incremento en la frecuencia de CDp Anexina V+ que nos sugiriera la muerte apoptótica como causa de la disminución (figura 7). Interesantemente, en nuestro estudio observamos que la frecuencia de CDp en el NL de personas con VIH incrementó (figura 6), lo cual podría sugerirnos que las CDp de la SP se redistribuyen hacia el NL ante la infección por el VIH y explicaría su disminución en SP. La acumulación de las CDp en el NL también se ha observado en modelos PNH infectados por el VIS (Brown et al., 2009, Malleret et al., 2008) y en NL de personas VIH+ (Dillon et al., 2008, Lehmann et al., 2010). Más aún, se ha demostrado que la expresión de los receptores involucrados en la migración hacia el tejido linfoide, tales como CCR7 y CD62L, incrementa en las CDp de personas con VIH (Lehmann et al., 2010). El reclutamiento de las CDp de SP hacia los NL durante la infección crónica por VIH podría ser perjudicial ya que se ha demostrado que las CDp producen cantidades elevadas de IFN- α y expresan TRAIL (receptor TNF), y ésta producción a su vez está relacionada con la pérdida de LT CD4+ (Barblu et al., 2012). Como ya se mencionó anteriormente, las CDp han sido estudiadas extensivamente en el contexto de la infección por VIH y poco se conoce con respecto a las CDc. En nuestro estudio, también se observó que la

frecuencia de CDc de SP de personas con VIH disminuyó significativamente y correlacionó negativamente con la carga viral (figura 6), pero no observamos un incremento en el NL que sugiera su redistribución a éste sitio anatómico. La disminución que observamos en la frecuencia de las CDc de SP de personas VIH+, al igual que la correlación negativa con la carga viral, ya se ha reportado previamente por otros grupos de investigación (Barron et al., 2003, Jiao et al., 2014, Sabado et al., 2010). En modelos PNH infectados por VIS, se ha sugerido que la disminución de CDc está relacionada con un aumento en la apoptosis o debido a la redistribución hacia los NL (Wijewardana et al., 2013). Posiblemente, la disminución en la frecuencia de CDc de SP observada en este trabajo podría deberse a un aumento en la muerte celular inducida por el propio virus. Aunque es poco probable que la infección por el VIH contribuya al incremento en la muerte de las CDc *per se*, ya que la replicación viral es restringida en éstas células (Bloch et al., 2014). Además, en nuestro estudio no se observó un incremento en la frecuencia de CDc de SP Anexina V+ que nos indique la muerte de estas células, al momento en el que se realizó el ensayo (figura 7). En nuestro estudio también observamos que la frecuencia de CDc de NL de personas VIH+ disminuyó significativamente (figura 6), similar a lo observado por Biancotto y colaboradores en NL de personas con VIH en etapa crónica (Biancotto et al., 2007). Se ha descrito que las CDc de NL de PNH infectados por VIS, mueren por apoptosis a través de la interacción CD95/CD95L (Wijewardana et al., 2010). Las CDp son las productoras principales de IFN- α durante las infecciones virales (Siegal et al., 1999), pero también pueden producir otras citocinas inflamatorias como el TNF- α .

(Gibson et al., 2002, Saidi et al., 2016, Ogata et al., 2013). Ya que encontramos que las CDp se acumulan en el NL de personas VIH+ (figura 6), es posible que la disminución observada de CDc en el NL se deba a que las cantidades elevadas de IFN- α o TNF- α secretado por las CDp en respuesta al VIH, pues se ha reportado que el IFN- α altera la diferenciación de las CDc (Kodama et al., 2010) y el TNF- α puede activar vías de señalización apoptóticas (Kumar et al., 2013). No descartamos la idea de que las CDc se redistribuyan hacia el NL de personas con VIH, ya que se ha reportado que la habilidad migratoria de las CDc no está afectada (Dillon et al., 2008). La disminución de las CDc en el NL podría tener consecuencias funcionales (Jiao et al., 2014), tales como afectar la presentación de antígeno, promover la deficiencia en la activación de LT, aunque se requieren experimentos para dilucidarlo.

Debido a que la interacción entre las CD y los LT ocurre principalmente en el NL (Buettner and Bode, 2012, Banchereau et al., 2000, Banchereau and Steinman, 1998), nos dispusimos a describir las características fenotípicas de las CD del NL comparadas con las CD de SP. El resultado de la activación de un LT depende en parte de las señales que provee la CD a través de las proteínas co-estimuladoras y co-inhibidoras (Steinman, 2003). Las proteínas CD40 y CD83 expresadas en la superficie de las CD se consideran marcadores de activación, ya que su expresión se regula positivamente una vez que la CD recibió señales de maduración al entrar en contacto con patógenos (O'Sullivan and Thomas, 2003, Prechtel and Steinkasserer, 2007). Como era de esperarse, se observó un incremento en la frecuencia de CDc de SP de personas VIH+ que expresan los

marcadores de activación CD40 y CD80 (figura 8). Además, observamos que la frecuencia de CDc de NL que expresan CD40, CD80 y CD83 fue similar en individuos VIH+ comparado con personas VIH- (figura 8). Únicamente en el grupo de individuos VIH+, la expresión de estas proteínas en las CDc de NL aumentó significativamente comparado con SP (figura 9). Dicho incremento en la expresión de proteínas de activación y co-estimulación podría ser consecuencia de la presencia del VIH o citocinas pro-inflamatorias, ya que se ha reportado previamente un incremento en la producción de IFN- α , IL-1 β e IL-12 en el NL de personas con VIH (Biancotto et al., 2007, Lehmann et al., 2010). Estos resultados nos podrían indicar que las CDc de NL de personas con VIH son capaces de activarse ya sea por la presencia del virus o de otros factores inflamatorios. Además, el incremento observado en la expresión de CD40, CD80 y CD83 en las CDc podría ser un mecanismo compensatorio debido al número reducido de estas células en el NL de personas con VIH, aunque no existe hasta la fecha evidencia que lo demuestre. En nuestro estudio no observamos diferencias significativas en la frecuencia o expresión de CD86 en las CDc de SP o NL de ambos grupos de estudio por lo que es importante mencionar que el nivel de expresión de CD86 en las CDc es elevado y se expresa de manera constitutiva (Ni and O'Neill, 1997). Mientras que algunos autores reportan que las CDc del NL de tienen un fenotipo inmaduro en personas infectadas por VIH, es decir, aumentan la expresión solo de proteínas de activación pero no de co-estimulación, (Dillon et al., 2008, Lore et al., 2002, Alter et al., 2010), nuestros resultados sugieren que durante la infección por VIH, las CDc pueden expresar proteínas de activación y co-estimulación en el NL.

Además de la señal de co-estimulación, la regulación de la activación del LT también depende de las señales de co-inhibición. En este trabajo se determinó la expresión de las proteínas co-inhibidoras PD-1 y PD-L1, ya que el balance de las señales co-estimuladoras y co-inhibidoras influye en el resultado final de la activación del LT. La proteína PD-1 se expresa principalmente en LT activados y se ha reportado su sobreexpresión en LT de individuos VIH+, VHC+ y VHB+ (Porichis and Kaufmann, 2012, Raziorrouh et al., 2014, Saha et al., 2013, Xiao et al., 2015). Hasta ahora, se desconocía la expresión de PD-1 y PD-L1 en las CDc de NL humanos, dato relevante debido al uso terapéutico de anticuerpos que bloquean la interacción de PD-1/PD-L1 para el tratamiento de diversas patologías como el cáncer (Okazaki and Honjo, 2007). Interesantemente, en nuestro estudio se observó una correlación positiva de las CDc PD-1+ del NL con la carga viral en plasma (figura 10). La proteína PD-1 podría ser transferida de la membrana del LT a la CDc durante la sinapsis inmunológica, mediante un proceso conocido como trogocitosis (Dhainaut and Moser, 2014). Por lo tanto, la expresión de PD-1 encontrada en las CDc del NL podría estar reflejando la interacción que ocurre entre el LT y la CDc en el NL de individuos VIH+. Además, el proceso de intercambio de proteínas entre células podría ser un mecanismo de regulación de la activación de ambas células durante la sinapsis inmunológica (Dhainaut and Moser, 2014). Existe un reporte en el que se ha observado la expresión de PD-1 en las CD después de ser estimuladas con productos bacterianos, y cuya función consiste en la autoregulación de la secreción de citocinas (Yao et al., 2009), así como también de la sobrevivencia de las CD (Park et al., 2014). Además, recientemente se reportó que la expresión de PD-1 en las CD suprime la función

efectora de los LT CD8+ (Lim et al., 2016). Por lo tanto, la expresión de PD-1 en las CD de NL de personas VIH+ podría tener un impacto negativo en la respuesta innata por parte de las CD, al disminuir su sobrevivencia, regular su producción de citocinas y suprimir la función de los LT CD8+, aunque esto no se ha demostrado durante la infección por VIH.

La sobreexpresión de PD-L1 en las CD se ha observado en SP de personas VIH+ (Wang et al., 2008, Cavaleiro et al., 2013) y en individuos VHC+ (Fouad et al., 2013, Shen et al., 2010) y se ha asociado con la progresión de la infección (Trabattoni et al., 2003, Butte et al., 2007). En nuestro estudio, demostramos por primera vez un incremento en la frecuencia de CDc PD-L1+ en el NL de individuos VIH+ (figura 10). Nuestros resultados concuerdan con lo observado en los NL de macacos rhesus infectados por el VIS, en los cuales se observó un mayor número de CDc que expresan PD-L1 (Xu, et al., 2010). El incremento en el número de CDc PD-L1+ en el NL de individuos VIH+ podría ser resultado de la interacción de CD40 con su ligando CD40L en los LT, ya que se ha reportado que la interacción de CD40-CD40L induce la expresión de PD-L1 en las CDc durante el proceso de maduración (Hubo et al., 2013). Más aún, la correlación positiva entre la frecuencia de CDc CD83+ o CD40+ con las CDc PD-L1+ (figura 11) podría ser consecuencia directa del VIH, ya que se ha reportado que la interacción de la proteína Tat del VIH con las CDDM induce la expresión de CD83 y PD-L1 en estas células (Planes et al., 2014). Así mismo, se ha reportado que los ligandos del TLR-7/8 derivados del VIH inducen la sobreexpresión de PD-L1 a en las CDc y CDp (Meier et al., 2008). Además de las CDc, también se ha observado que los

neutrófilos de personas con VIH sobreexpresan PD-L1 y pueden suprimir la función de los LT (Bowers et al., 2014). Una vez que la proteína PD-1 expresada en el LT se une a PD-L1 en la CDc, la activación del LT se regula negativamente en el NL (Reis e Sousa, 2006). Por lo tanto, el incremento en la frecuencia de CDc PD-L1+ podría contribuir a la patogénesis de la infección por VIH, suprimiendo la respuesta inmune específica contra el virus y promoviendo la progresión de la infección. La proteína PD-L1 en conjunto con IL-10 promueve el fenotipo exhausto o disfuncional de los LT CD8+ durante las infecciones virales crónicas (Brooks et al., 2008). Además, la función o propiedad inmunogénica de las CD podrían cambiar a tolerogénica mediante la interacción y señalización de PD-L1/PD-1 en el LT (Kim et al., 2011).

Interesantemente, podrían también existir diferencias en el perfil de maduración entre las CDc y las CDp durante la infección por VIH. Por ejemplo, las CDp de NL de simios infectados con VIS son fenotípicamente inmaduras, es decir solo expresan CD40, mientras que las CDc son maduras ya que expresan CD40, CD80, CD83 y CD86 (Brown et al., 2007). En otro estudio, se observó que las CDc de simios mostraron un mayor grado de maduración que las CDp (Jacquelin et al., 2014) y son activadas rápidamente después de la infección por VIS, y las CDc de SP incrementan la expresión de CD80 y CD86 a las 2 semanas de infección (Wijewardana et al., 2010). En nuestro estudio, observamos que la frecuencia de CDp que expresan CD40 o CD83 fue mayor en el NL de personas con VIH comparado con la frecuencia encontrada en SP (figura 12). También encontramos que el fenotipo entre las CDc y las CDp del NL fue diferente, las CDc expresaron

CD40, CD80, CD83 y CD86, mientras que las CDp expresaron CD83 y CD86. Las diferencias observadas en la activación de las CDc y CDp podrían deberse a la diferencia en la expresión de los diversos receptores que reconocen patrones moleculares de patógenos. Las dos subpoblaciones de CD se distinguen por la expresión de receptores TLR, por ejemplo, las CDc expresan TLR-1, -2, -3, -4, -5, -6, -8 y -10 y las CDp expresan TLR-7 y -9 (Jarrossay et al., 2001, Kadowaki et al., 2001). Entonces, el incremento en la expresión de proteínas de activación podría deberse a la presencia de productos bacterianos en personas VIH+, que activarían a las CD a través de distintos TLR (Brenchley et al., 2006). Además, la unión de CD40 con su ligando (CD40L) promueve la sobrevivencia de las CD, la liberación de citocinas y la expresión de moléculas co-estimuladoras (Elgueta et al., 2009). Interesantemente, observamos que la expresión de CD40 disminuyó en las CDp de SP y NL de personas VIH+ comparado con individuos VIH- (figura 8), lo cual podría ser un mecanismo de autoregulación para la CDp y disminuir la secreción de citocinas, sin embargo no se ha estudiado dicha posibilidad. La correlación encontrada de la frecuencia de CDp que expresan CD40 o CD83 con la carga viral (figura 14), nos sugiere que el incremento de CDp CD40+ o CD83+ en el NL podría estar relacionado a la inflamación inducida por los niveles elevados de viriones en personas con VIH (Pantaleo et al., 1993), ya que las CDp tienen la capacidad de reconocer el ARN del VIH a través del TLR-7 y esta señal a su vez promover la expresión de marcadores de activación (Beignon et al., 2005).

La tercera señal que promueve la activación de los LT en el NL es la producción de citocinas por parte de la CD, que además, nos puede indicar la funcionalidad de estas células (Kalinski, 2009). Existen pocos reportes acerca del

fenotipo y funcionalidad de las CD del NL durante la infección por VIH (Alter et al., 2010, Dillon et al., 2008, Lehmann et al., 2010). Dada la dificultad para obtener muestras de NL de humanos, recientemente se ha estudiado la producción de citocinas en CD de NL de simios infectados por VIS (Kader et al., 2013, Wijewardana et al., 2014, Bruel et al., 2014). En nuestro estudio, se determinó intracelularmente la producción de citocinas inflamatorias tales como TNF- α , IFN- α e IL-12 en las CDc y CDp de SP y NL de personas con VIH. Interesantemente, en condiciones basales (sin haber agregado un estímulo) la frecuencia de CDc TNF- α + del NL fue mayor que la de SP, lo cual sugeriría un grado de activación mayor de las CDc en el NL que en SP (figura 16), lo cual podría ser consecuencia de las cantidades elevadas de virus y el microambiente inflamatorio del NL. Contrario a lo que esperábamos, la frecuencia de CDc TNF- α + fue mayor que la de CDc IL-12+ en los individuos con VIH (figura 16). Previamente en nuestro grupo de investigación, se reportó un mayor porcentaje de CDc TNF- α + de personas VIH+ en respuesta al LPS comparado con el porcentaje de individuos que controlan la replicación del virus de manera natural: la frecuencia de las CDc TNF- α + correlacionó positivamente con la CVp (Camacho-Sandoval et al., 2014). Recientemente se ha propuesto que el TNF- α podría ser una citocina asociada a la progresión de la infección (Kumar et al., 2013). Además, otro grupo de estudio reportó que la proteína Tat del VIH induce la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos y CDDM (Ben Haij et al., 2015). Por otro lado, y como ya se había observado en CDc de SP previamente (Lore et al., 2003), nuestro estudio mostró que la frecuencia de CDc IFN- α + es muy baja, comparada con la frecuencia de CDc TNF- α + o CDc IL-12+ (figura 16) independientemente

del estímulo. Nuestros resultados concuerdan con lo que se reportó recientemente: el VIH bloquea la inducción de IFN en células mieloides como las CD y macrófagos (Harman et al., 2015). Más aún, al comparar las CDc de SP y NL, observamos que la frecuencia de CDc IFN- α + es mayor en el NL únicamente después de ser estimuladas con LPS+CpG (figura 16), aunque el CpG no es reconocido directamente por las CDc ya que no expresa TLR-9 (Kadowaki et al., 2001), probablemente la diferencia observada sea consecuencia de la activación indirecta de la CDc por otras citocinas producidas en el medio de cultivo. Por ejemplo el IFN- α que es producido por las CDp en presencia de CpG.

Interesantemente, nuestros resultados demuestran que las CDc de SP fueron capaces de producir TNF- α , IFN- α e IL-12 al estimularlas con los ligandos de TLR utilizados, ssRNA40, LPS o la combinación de LSP+CpG (figura 17), lo que nos indica que las CDc de personas con VIH aún pueden responder ante diversos estímulos *ex vivo*. Estos resultados concuerdan con lo que recientemente se reportó: las CD pueden activarse y secretar citocinas como TNF- α e IL-12 después de estimularlas *in vitro* con agonistas de TLR-2 y -4 (Giraldo et al., 2015). Similarmente, observamos que las CDc del NL fueron capaces de producir TNF- α e IL-12 después de la estimulación con ssRNA40, LPS o LSP+CpG (figura 18), aunque por ejemplo en simios, durante la infección crónica por el VIS, se ha observado que la producción de IL-12 por las CDc de NL se suprime (Wonderlich et al., 2015). A pesar de los reportes controversiales acerca del fenotipo y funcionalidad de las CD del NL durante la infección por VIH (Alter et al., 2010, Dillon et al., 2008, Lehmann et al., 2010), nuestros resultados sugieren que las

CDc son capaces de expresar proteínas co-estimuladoras y de producir IL-12 y TNF- α una vez que se estimulan algunos TLR. Además, en nuestros resultados, se observó que la producción de TNF- α e IL12 en las CDc estimuladas con ssRNA40 correlacionó positivamente con la CVp (figura 19). Esto podría ser consecuencia de un incremento en la expresión del TLR-8 en personas con VIH, similar al incremento observado en la expresión del TLR-2 y -4 en CDc de personas con VIH (Hernandez et al., 2012), sin embargo la expresión del TLR-8 no se ha determinado hasta el momento en CDc de individuos con VIH. Además, la correlación observada nos indicaría que las CDc podrían estar participando en la activación inmune crónica al secretar citocinas inflamatorias y promover la progresión de la enfermedad (Chang et al., 2012).

Por otro lado, se observó que las CDp de NL parecen estar más activadas que las CDp de SP, ya que se encontró un incremento en la frecuencia de CDp IFN- α + una vez estimuladas con CpG (figura 21). Esto podría ser resultado de la presencia de altas concentraciones del VIH en el NL de personas infectadas (Pantaleo et al., 1991). Aunque, en dos estudios se observó que las CDp de SP de personas VIH+, producen menos IFN- α después de estimularlas con ligandos de TLR-7 (Martinson et al., 2007, Chang et al., 2012), otro grupo de estudio reportó que las CDp de SP expresan niveles elevados de IFN- α (Lehmann et al., 2008). De manera importante, nuestros resultados demuestran que las CDp de SP fueron capaces de producir TNF- α , IL-12 e IFN- α después de ser estimuladas con ssRNA40 (para TLR-7), CpG (para TLR-9) o LSP+CpG (para TLR-4 y -9) (figura 22), lo que nos muestra que las CDp de personas VIH+ sí son capaces de

responder ante diversos agonistas de TLR. Similarmente, se observó que las CDp del NL fueron capaces de producir TNF- α , IL-12 e IFN- α al ser estimuladas con ssRNA40, CpG o LSP+CpG (figura 19). En NL de humanos, se ha demostrado que las CDp se acumulan en éste sitio anatómico y secretan IFN- α (Lehmann et al., 2010). Sin embargo en modelos de PNH, durante la infección crónica por el VIS, se ha reportado que la producción de IFN- α se reduce dramáticamente en las CDp del NL después de estimularlas con ligandos de TLR7/8, mientras que la producción de IL-12 no se ve afectada (Wonderlich et al., 2015). Importantemente, en nuestros resultados se observó que la producción de TNF- α , IFN- α e IL12 en las CDp del NL estimuladas con CpG correlacionó positivamente con la CVp (figura 24). En la infección por VIH, tanto las CDc como las CDp producen mayoritariamente TNF- α , en lugar de las citocinas IL-12 o IFN- α , lo que nos indica que las CDc y CDp podrían estar participando en la activación inmune crónica y promover la progresión de la enfermedad al secretar grandes cantidades de TNF- α , ya que se ha observado que bloquear la producción de IFN- α en simios infectados por VIS no disminuye la activación inmune (Kader et al., 2013).

En años recientes, nuevas técnicas de análisis nos han permitido estudiar las CD y su función de una forma más amplia, así como estudiar otros tipos de células. Por ejemplo, el análisis polifuncional de una célula puede evaluar la capacidad de expresar o producir una, dos o más proteínas o citocinas simultáneamente, lo cual le confiere a dicha célula ejercer cierta función. Recientemente, el análisis polifuncional de los LT CD8+ durante la infección por VIH ha sido de gran interés, ya que es posible determinar si éstas células pueden

secretar granzima, perforina, citocinas o expresar receptores simultáneamente (Buggert et al., 2014, Lelic et al., 2012). Por ejemplo, los LT CD8+ exhaustos (Blackburn et al., 2009) se caracterizan por una disminución en su polifuncionalidad y dicha reducción en la función podría contribuir con la progresión hacia SIDA (Demers et al., 2013). Dada la importante evidencia acerca de la polifuncionalidad de las células, pensamos que tanto las CDc como las CDp podrían tener también la capacidad producir más de una citocina al mismo tiempo, sin embargo la polifuncionalidad de las CD no había sido estudiada en otros reportes. En el presente trabajo, se observó que las poblaciones de CDc de SP y NL en condiciones sin estímulo, fueron mayoritariamente células que no produjeron ninguna de las citocinas determinadas en nuestro estudio (TNF- α , IFN- α e IL-12) (figura 25), y que las CDc de NL muestran un mayor grado de activación que las de SP, lo cual podría deberse a que las CDc del NL previamente al estímulo *ex vivo* han estado en contacto con diversos factores virales e inmunológicos que podrían estarlas activando. Una vez estimuladas con los ligandos de TLR, tanto las CDc de SP como de NL, producen principalmente una sola citocina, es decir, observamos CDc TNF- α + o IL-12+ (figura 25). De forma importante, cabe mencionar que principalmente se observó la población de CDc TNF- α +, citocina que podría estar contribuyendo a la activación inespecífica de los LT y por tanto su infección por el VIH en el NL de personas infectadas (Biswas et al., 2001). Además, al comparar las CDc de SP y NL, se pudo observar que las poblaciones fueron similares, en cuanto a las citocinas producidas con las distintas condiciones de estímulo. Por tanto, podemos sugerir que la polifuncionalidad de las CDc de SP y NL es escasa, al menos en las condiciones y citocinas

determinadas en este estudio. Sin embargo, se requiere el estudio de la polifuncionalidad de las CDc de SP y NL de personas VIH- para determinar si la polifuncionalidad de las CDc disminuye debido a la infección por VIH.

Similar a lo observado en las CDc, las poblaciones de CDp de SP y NL en condiciones sin estímulo, fueron mayoritariamente células que no produjeron ninguna de las citocinas determinadas en nuestro estudio (TNF- α , IFN- α e IL-12) (figura 27). Una vez estimuladas, las CDp de SP produjeron principalmente una sola citocina, CDp TNF- α +, IL-12+ o IFN- α + (figura 27). Interesantemente, se observó que las CDp de NL fueron más polifuncionales que las CDp de SP al estimular el TLR-9 con CpG, ya que se observaron poblaciones de CDp que produjeron hasta dos o tres citocinas, por ejemplo, CDp IL-12+ TNF- α + o CDp IFN- α + TNF- α + (figura 28). Además, observamos que la población de CDp TNF- α + aumentó considerablemente en el NL con respecto a SP (figura 27). El incremento en la frecuencia de CDp TNF- α + podría tener repercusiones en la activación crónica observada en personas con VIH (Estes, 2013, Brenchley et al., 2006). Se requieren estudios posteriores acerca de la respuesta de las CDp de de personas VIH- ante diversos estímulos, para determinar si los resultados observados en este trabajo son consecuencia única de la presencia del VIH o su patogénesis.

7. CONCLUSIONES

En conjunto, nuestros resultados demuestran que las CD de NL de individuos VIH+ muestran un fenotipo activado y pueden contribuir al microambiente inflamatorio del NL afectando la activación de los LT. Por un lado las CDp de individuos VIH+ producen IFN- α y TNF- α y por otro lado las CDc producen IL-12 y TNF- α al ser estimuladas, pero también aumentan la expresión de PD-L1. Estos hallazgos no solo ayudan en entender el papel de las CD en la infección por VIH sino que pueden tener un impacto importante en el uso de anticuerpos bloqueadores contra PD-1 o PD-L1 como terapia alternativa para rescatar a los LT exhaustos (Dai et al., 2012), así como también, en el uso de inhibidores de TNF- α como terapia para disminuir la activación crónica en personas con VIH (Kumar et al., 2013). Además, los resultados presentados en este trabajo podrían tener implicaciones en el uso de otras terapias inmunológicas basadas en CD, ya que estudiamos las CD del NL, sitio anatómico dónde ocurre la presentación de antígeno.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ADEMA, G. J., HARTGERS, F., VERSTRATEN, R., DE VRIES, E., MARLAND, G., MENON, S., FOSTER, J., XU, Y., NOOYEN, P., MCCLANAHAN, T., BACON, K. B. & FIGDOR, C. G. 1997. A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature*, 387, 713-7.
- AHLERS, J. D. & BELYAKOV, I. M. 2009. Strategies for optimizing targeting and delivery of mucosal HIV vaccines. *Eur J Immunol*, 39, 2657-69.
- ALTER, G., KAVANAGH, D., RIHN, S., LUTEIJN, R., BROOKS, D., OLDSTONE, M., VAN LUNZEN, J. & ALTFELD, M. 2010. IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection. *J Clin Invest*, 120, 1905-13.
- AYINDE, D., BRUEL, T., CARDINAUD, S., PORROT, F., PRADO, J. G., MORIS, A. & SCHWARTZ, O. 2015. SAMHD1 Limits HIV-1 Antigen Presentation by Monocyte-Derived Dendritic Cells. *J Virol*, 89, 6994-7006.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- BANCHEREAU, J., KLECHEVSKY, E., SCHMITT, N., MORITA, R., PALUCKA, K. & UENO, H. 2009. Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines. *Ann N Y Acad Sci*, 1174, 24-32.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BARBLU, L., MACHMACH, K., GRAS, C., DELFRAISSY, J. F., BOUFASSA, F., LEAL, M., RUIZ-MATEOS, E., LAMBOTTE, O., HERBEUVAL, J. P. & GROUP, A. E. H. C. S. 2012. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) from HIV controllers produce interferon-alpha and differentiate into functional killer pDCs under HIV activation. *J Infect Dis*, 206, 790-801.
- BARRON, M. A., BLYVEIS, N., PALMER, B. E., MAWHINNEY, S. & WILSON, C. C. 2003. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis*, 187, 26-37.
- BEIGNON, A. S., MCKENNA, K., SKOBERNE, M., MANCHES, O., DASILVA, I., KAVANAGH, D. G., LARSSON, M., GORELICK, R. J., LIFSON, J. D. & BHARDWAJ, N. 2005. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J Clin Invest*, 115, 3265-75.
- BEN HAIJ, N., PLANES, R., LEGHMARI, K., SERRERO, M., DELOBEL, P., IZOPET, J., BENMOHAMED, L. & BAHRAOUI, E. 2015. HIV-1 Tat Protein Induces Production of Proinflammatory Cytokines by Human Dendritic Cells and Monocytes/Macrophages through Engagement of TLR4-MD2-CD14 Complex and Activation of NF-kappaB Pathway. *PLoS One*, 10, e0129425.
- BIANCOTTO, A., GRIVEL, J. C., IGLEHART, S. J., VANPOUILLE, C., LISCO, A., SIEG, S. F., DEBERNARDO, R., GARATE, K., RODRIGUEZ, B., MARGOLIS, L. B. & LEDERMAN, M. M. 2007. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood*, 109, 4272-9.
- BISWAS, P., MANTELLI, B., DELFANTI, F., COTA, M., VALLANTI, G., DE FILIPPI, C., MENGOZZI, M., VICENZI, E., LAZZARIN, A. & POLI, G. 2001. Tumor necrosis factor-alpha drives HIV-1 replication in U937 cell clones and upregulates CXCR4. *Cytokine*, 13, 55-59.
- BLACKBURN, S. D., SHIN, H., HAINING, W. N., ZOU, T., WORKMAN, C. J., POLLEY, A., BETTS, M. R., FREEMAN, G. J., VIGNALI, D. A. & WHERRY, E. J. 2009. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol*, 10, 29-37.

- BLANCHET, F., MORIS, A., MITCHELL, J. P. & PIGUET, V. 2011. A look at HIV journey: from dendritic cells to infection spread in CD4(+) T cells. *Curr Opin HIV AIDS*, 6, 391-7.
- BLOCH, N., O'BRIEN, M., NORTON, T. D., POLSKY, S. B., BHARDWAJ, N. & LANDAU, N. R. 2014. HIV type 1 infection of plasmacytoid and myeloid dendritic cells is restricted by high levels of SAMHD1 and cannot be counteracted by Vpx. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 30, 195-203.
- BOASSO, A., HERBEUVAL, J. P., HARDY, A. W., ANDERSON, S. A., DOLAN, M. J., FUCHS, D. & SHEARER, G. M. 2007. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 109, 3351-9.
- BOASSO, A., VACCARI, M., NILSSON, J., SHEARER, G. M., ANDERSSON, J., CECCHINATO, V., CHOUGNET, C. & FRANCHINI, G. 2006. Do regulatory T-cells play a role in AIDS pathogenesis? *AIDS Rev*, 8, 141-7.
- BOSINGER, S. E., SODORA, D. L. & SILVESTRI, G. 2011. Generalized immune activation and innate immune responses in simian immunodeficiency virus infection. *Curr Opin HIV AIDS*, 6, 411-8.
- BOWERS, N. L., HELTON, E. S., HUIJBREGTS, R. P., GOEPFERT, P. A., HEATH, S. L. & HEL, Z. 2014. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog*, 10, e1003993.
- BRAUN, D. L., NEMETH, J. & GUNTARD, H. F. 2014. [Don't miss the primary HIV-infection]. *Ther Umsch*, 71, 469-74.
- BRENCHLEY, J. M., PRICE, D. A., SCHACKER, T. W., ASHER, T. E., SILVESTRI, G., RAO, S., KAZAZ, Z., BORNSTEIN, E., LAMBOTTE, O., ALTMANN, D., BLAZAR, B. R., RODRIGUEZ, B., TEIXEIRA-JOHNSON, L., LANDAY, A., MARTIN, J. N., HECHT, F. M., PICKER, L. J., LEDERMAN, M. M., DEEKS, S. G. & DOUEK, D. C. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, 12, 1365-71.
- BRENCHLEY, J. M., SCHACKER, T. W., RUFF, L. E., PRICE, D. A., TAYLOR, J. H., BEILMAN, G. J., NGUYEN, P. L., KHORUTS, A., LARSON, M., HAASE, A. T. & DOUEK, D. C. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 200, 749-59.
- BROOKS, D. G., HA, S. J., ELSAESSER, H., SHARPE, A. H., FREEMAN, G. J. & OLDSTONE, M. B. 2008. IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20428-33.
- BROWN, K. N., TRICHEL, A. & BARRATT-BOYES, S. M. 2007. Parallel loss of myeloid and plasmacytoid dendritic cells from blood and lymphoid tissue in simian AIDS. *J Immunol*, 178, 6958-67.
- BROWN, K. N., WIJEWARDANA, V., LIU, X. & BARRATT-BOYES, S. M. 2009. Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog*, 5, e1000413.
- BRUEL, T., DUPUY, S., DEMOULINS, T., ROGEZ-KREUZ, C., DUTRIEUX, J., CORNEAU, A., COSMA, A., CHEYNIER, R., DEREUDDRE-BOSQUET, N., LE GRAND, R. & VASLIN, B. 2014. Plasmacytoid dendritic cell dynamics tune interferon- α production in SIV-infected cynomolgus macaques. *PLoS Pathog*, 10, e1003915.
- BUETTNER, M. & BODE, U. 2012. Lymph node dissection--understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin Exp Immunol*, 169, 205-12.
- BUGGERT, M., TAURIANEN, J., YAMAMOTO, T., FREDERIKSEN, J., IVARSSON, M. A., MICHAELSSON, J., LUND, O., HEJDEMAN, B., JANSSON, M., SONNERBORG, A., KOUP, R. A., BETTS, M. R. & KARLSSON, A. C. 2014. T-bet and Eomes are differentially linked to the exhausted phenotype of CD8+ T cells in HIV infection. *PLoS Pathog*, 10, e1004251.
- BUISSON, S., BENLAHRECH, A., GAZZARD, B., GOTCH, F., KELLEHER, P. & PATTERSON, S. 2009. Monocyte-derived dendritic cells from HIV type 1-infected individuals show reduced

- ability to stimulate T cells and have altered production of interleukin (IL)-12 and IL-10. *J Infect Dis*, 199, 1862-71.
- BURLEIGH, L., LOZACH, P. Y., SCHIFFER, C., STAROPOLI, I., PEZO, V., PORROT, F., CANQUE, B., VIRELIZIER, J. L., ARENZANA-SEISDEDOS, F. & AMARA, A. 2006. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J Virol*, 80, 2949-57.
- BUTTE, M. J., KEIR, M. E., PHAMDUY, T. B., SHARPE, A. H. & FREEMAN, G. J. 2007. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27, 111-22.
- CAMACHO-SANDOVAL, R., DEL RIO ESTRADA, P. M., RIVERO-ARRIETA, A., REYES-TERAN, G. & BONIFAZ, L. C. 2014. Differential partial activation phenotype and production of tumour necrosis factor-alpha by conventional dendritic cells in response to lipopolysaccharide in HIV+ viraemic subjects and HIV+ controllers. *Clin Exp Immunol*, 178, 489-503.
- CAVALEIRO, R., TENDEIRO, R., FOXALL, R. B., SOARES, R. S., BAPTISTA, A. P., GOMES, P., VALADAS, E., VICTORINO, R. M. & SOUSA, A. E. 2013. Monocyte and myeloid dendritic cell activation occurs throughout HIV type 2 infection, an attenuated form of HIV disease. *J Infect Dis*, 207, 1730-42.
- CELLA, M., JARROSSAY, D., FACCHETTI, F., ALEBARDI, O., NAKAJIMA, H., LANZAVECCHIA, A. & COLONNA, M. 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med*, 5, 919-23.
- CHANG, J. J., LACAS, A., LINDSAY, R. J., DOYLE, E. H., AXTEN, K. L., PEREYRA, F., ROSENBERG, E. S., WALKER, B. D., ALLEN, T. M. & ALTFELD, M. 2012. Differential regulation of toll-like receptor pathways in acute and chronic HIV-1 infection. *AIDS*, 26, 533-41.
- COLEMAN, C. M., SPEARMAN, P. & WU, L. 2011. Tetherin does not significantly restrict dendritic cell-mediated HIV-1 transmission and its expression is upregulated by newly synthesized HIV-1 Nef. *Retrovirology*, 8, 26.
- COLONNA, M., TRINCHIERI, G. & LIU, Y. J. 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, 5, 1219-26.
- COUPER, K. N., BLOUNT, D. G. & RILEY, E. M. 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180, 5771-7.
- D'ETTORRE, G., PAIARDINI, M., CECCARELLI, G., SILVESTRI, G. & VULLO, V. 2011. HIV-associated immune activation: from bench to bedside. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 27, 355-64.
- DAI, B., XIAO, L., BRYSON, P. D., FANG, J. & WANG, P. 2012. PD-1/PD-L1 blockade can enhance HIV-1 Gag-specific T cell immunity elicited by dendritic cell-directed lentiviral vaccines. *Mol Ther*, 20, 1800-9.
- DALOD, M., SALAZAR-MATHER, T. P., MALMGAARD, L., LEWIS, C., ASSELIN-PATUREL, C., BRIERE, F., TRINCHIERI, G. & BIRON, C. A. 2002. Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med*, 195, 517-28.
- DAVAR, D., WILSON, M., PRUCKNER, C. & KIRKWOOD, J. M. 2015. PD-1 Blockade in Advanced Melanoma in Patients with Hepatitis C and/or HIV. *Case Rep Oncol Med*, 2015, 737389.
- DAVIS, M. M. & BJORKMAN, P. J. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334, 395-402.
- DEMERS, K. R., REUTER, M. A. & BETTS, M. R. 2013. CD8(+) T-cell effector function and transcriptional regulation during HIV pathogenesis. *Immunol Rev*, 254, 190-206.
- DHAINAUT, M. & MOSER, M. 2014. Regulation of immune reactivity by intercellular transfer. *Front Immunol*, 5, 112.

- DIEBOLD, S. S., MONTOYA, M., UNGER, H., ALEXOPOULOU, L., ROY, P., HASWELL, L. E., AL-SHAMKHANI, A., FLAVELL, R., BORROW, P. & REIS E SOUSA, C. 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature*, 424, 324-8.
- DILLON, S. M., ROBERTSON, K. B., PAN, S. C., MAWHINNEY, S., MEDITZ, A. L., FOLKVORD, J. M., CONNICK, E., MCCARTER, M. D. & WILSON, C. C. 2008. Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 48, 1-12.
- DONG, C., JANAS, A. M., WANG, J. H., OLSON, W. J. & WU, L. 2007. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 replication in immature and mature dendritic cells reveals dissociable cis- and trans-infection. *J Virol*, 81, 11352-62.
- DZIOONEK, A., FUCHS, A., SCHMIDT, P., CREMER, S., ZYSK, M., MILTENYI, S., BUCK, D. W. & SCHMITZ, J. 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 165, 6037-46.
- ELGUETA, R., BENSON, M. J., DE VRIES, V. C., WASIUK, A., GUO, Y. & NOELLE, R. J. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, 229, 152-72.
- EMBRETSON, J., ZUPANCIC, M., RIBAS, J. L., BURKE, A., RACZ, P., TENNER-RACZ, K. & HAASE, A. T. 1993. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*, 362, 359-62.
- ESTES, J., BAKER, J. V., BRENCHLEY, J. M., KHORUTS, A., BARTHOLD, J. L., BANTLE, A., REILLY, C. S., BEILMAN, G. J., GEORGE, M. E., DOUEK, D. C., HAASE, A. T. & SCHACKER, T. W. 2008. Collagen deposition limits immune reconstitution in the gut. *J Infect Dis*, 198, 456-64.
- ESTES, J. D. 2013. Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues. *Immunol Rev*, 254, 65-77.
- FAN, Z., HUANG, X. L., KALINSKI, P., YOUNG, S. & RINALDO, C. R., JR. 2007. Dendritic cell function during chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol*, 14, 1127-37.
- FANTUZZI, L., PURIFICATO, C., DONATO, K., BELARDELLI, F. & GESSANI, S. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol*, 78, 9763-72.
- FAVRE, D., MOLD, J., HUNT, P. W., KANWAR, B., LOKE, P., SEU, L., BARBOUR, J. D., LOWE, M. M., JAYAWARDENE, A., AWEEKKA, F., HUANG, Y., DOUEK, D. C., BRENCHLEY, J. M., MARTIN, J. N., HECHT, F. M., DEEKS, S. G. & MCCUNE, J. M. 2010. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med*, 2, 32ra36.
- FIFE, B. T., PAUKEN, K. E., EAGAR, T. N., OBU, T., WU, J., TANG, Q., AZUMA, M., KRUMMEL, M. F. & BLUESTONE, J. A. 2009. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol*, 10, 1185-92.
- FIORENTINI, S., RIBOLDI, E., FACCHETTI, F., AVOLIO, M., FABBRI, M., TOSTI, G., BECKER, P. D., GUZMAN, C. A., SOZZANI, S. & CARUSO, A. 2008. HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3867-72.
- FONTAINE, J., COUTLEE, F., TREMBLAY, C., ROUTY, J. P., POUDRIER, J., ROGER, M., MONTREAL PRIMARY, H. I. V. I. & LONG-TERM NONPROGRESSOR STUDY, G. 2009. HIV infection affects blood myeloid dendritic cells after successful therapy and despite nonprogressing clinical disease. *J Infect Dis*, 199, 1007-18.

- FOUAD, H., RAZIKY, M. S., AZIZ, R. A., SABRY, D., AZIZ, G. M., EWAIS, M. & SAYED, A. R. 2013. Dendritic cell co-stimulatory and co-inhibitory markers in chronic HCV: an Egyptian study. *World J Gastroenterol*, 19, 7711-8.
- GARCIA, F., CLIMENT, N., GUARDO, A. C., GIL, C., LEON, A., AUTRAN, B., LIFSON, J. D., MARTINEZ-PICADO, J., DALMAU, J., CLOTET, B., GATELL, J. M., PLANA, M., GALLART, T. & GROUP, D. M. O. S. 2013. A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication. *Sci Transl Med*, 5, 166ra2.
- GESSANI, S., CONTI, L., DEL CORNO, M. & BELARDELLI, F. 2014. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 6, 1696-723.
- GIBSON, S. J., LINDH, J. M., RITER, T. R., GLEASON, R. M., ROGERS, L. M., FULLER, A. E., OESTERICH, J. L., GORDEN, K. B., QIU, X., MCKANE, S. W., NOELLE, R. J., MILLER, R. L., KEDL, R. M., FITZGERALD-BOCARSLY, P., TOMAI, M. A. & VASILAKOS, J. P. 2002. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cell Immunol*, 218, 74-86.
- GIRALDO, D. M., HERNANDEZ, J. C. & URCUQUI INCHIMA, S. 2015. Impact of in vitro costimulation with TLR2, TLR4 and TLR9 agonists and HIV-1 on antigen-presenting cell activation. *Intervirology*, 58, 122-9.
- GONZALEZ, P. A., CARRENO, L. J., COOMBS, D., MORA, J. E., PALMIERI, E., GOLDSTEIN, B., NATHENSON, S. G. & KALERGIS, A. M. 2005. T cell receptor binding kinetics required for T cell activation depend on the density of cognate ligand on the antigen-presenting cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4824-9.
- GORRY, P. R. & ANCUTA, P. 2011. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep*, 8, 45-53.
- GOUGEON, M. L. & HERBEUVAL, J. P. 2012. IFN-alpha and TRAIL: a double edge sword in HIV-1 disease? *Exp Cell Res*, 318, 1260-8.
- GRAKOU, A., BROMLEY, S. K., SUMEN, C., DAVIS, M. M., SHAW, A. S., ALLEN, P. M. & DUSTIN, M. L. 2015. Pillars article: The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999. 285: 221-227. *J Immunol*, 194, 4066-72.
- GRANELLI-PIPERNO, A., GOLEBIOWSKA, A., TRUMPFHELLER, C., SIEGAL, F. P. & STEINMAN, R. M. 2004. HIV-1-infected monocyte-derived dendritic cells do not undergo maturation but can elicit IL-10 production and T cell regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7669-74.
- GROSSMAN, Z., MEIER-SCHELLERSHEIM, M., PAUL, W. E. & PICKER, L. J. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med*, 12, 289-95.
- GRUTTER, M. G. & LUBAN, J. 2012. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Curr Opin Virol*, 2, 142-50.
- HAASE, A. T. 1999. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol*, 17, 625-56.
- HARMAN, A. N., NASR, N., FEETHAM, A., GALOYAN, A., ALSHEHRI, A. A., RAMBUKWELLE, D., BOTTING, R. A., HIENER, B. M., DIEFENBACH, E., DIEFENBACH, R. J., KIM, M., MANSELL, A. & CUNNINGHAM, A. L. 2015. HIV Blocks Interferon Induction in Human Dendritic Cells and Macrophages by Dysregulation of TBK1. *J Virol*, 89, 6575-84.
- HERBEUVAL, J. P., BOASSO, A., GRIVEL, J. C., HARDY, A. W., ANDERSON, S. A., DOLAN, M. J., CHOUGNET, C., LIFSON, J. D. & SHEARER, G. M. 2005a. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood*, 105, 2458-64.
- HERBEUVAL, J. P., GRIVEL, J. C., BOASSO, A., HARDY, A. W., CHOUGNET, C., DOLAN, M. J., YAGITA, H., LIFSON, J. D. & SHEARER, G. M. 2005b. CD4+ T-cell death induced by

- infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*, 106, 3524-31.
- HERBEUVAL, J. P., SMITH, N. & THEZE, J. 2012. Characteristics of plasmacytoid dendritic cell and CD4+ T cell in HIV elite controllers. *Clin Dev Immunol*, 2012, 869505.
- HERNANDEZ, J. C., STEVENSON, M., LATZ, E. & URCUQUI-INCHIMA, S. 2012. HIV type 1 infection up-regulates TLR2 and TLR4 expression and function in vivo and in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 28, 1313-28.
- HUBO, M., TRINSCHEK, B., KRYCZANOWSKY, F., TUETTENBERG, A., STEINBRINK, K. & JONULEIT, H. 2013. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol*, 4, 82.
- ITO, T., YANG, M., WANG, Y. H., LANDE, R., GREGORIO, J., PERNG, O. A., QIN, X. F., LIU, Y. J. & GILLIET, M. 2007. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med*, 204, 105-15.
- IZQUIERDO-USEROS, N., LORIZATE, M., PUERTAS, M. C., RODRIGUEZ-PLATA, M. T., ZANGGER, N., ERIKSON, E., PINO, M., ERKIZIA, I., GLASS, B., CLOTET, B., KEPPLER, O. T., TELENTI, A., KRAUSSLICH, H. G. & MARTINEZ-PICADO, J. 2012. Siglec-1 is a novel dendritic cell receptor that mediates HIV-1 trans-infection through recognition of viral membrane gangliosides. *PLoS Biol*, 10, e1001448.
- JACQUELIN, B., PETITJEAN, G., KUNKEL, D., LIOVAT, A. S., JOCHEMS, S. P., ROGERS, K. A., PLOQUIN, M. J., MADEC, Y., BARRE-SINOUSI, F., DEREUDDRE-BOSQUET, N., LEBON, P., LE GRAND, R., VILLINGER, F. & MULLER-TRUTWIN, M. 2014. Innate immune responses and rapid control of inflammation in African green monkeys treated or not with interferon-alpha during primary SIVagm infection. *PLoS Pathog*, 10, e1004241.
- JAHRSORFER, B., VOLLMER, A., BLACKWELL, S. E., MAIER, J., SONTHEIMER, K., BEYER, T., MANDEL, B., LUNOV, O., TRON, K., NIENHAUS, G. U., SIMMET, T., DEBATIN, K. M., WEINER, G. J. & FABRICIUS, D. 2010. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood*, 115, 1156-65.
- JARROSSAY, D., NAPOLITANI, G., COLONNA, M., SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 31, 3388-93.
- JIAO, Y., SUN, X., HUANG, X., LI, W., ZHANG, T. & WU, H. 2014. Compare mDCs and pDCs between two distinct patients groups in acute HIV-1 infection. *AIDS Res Ther*, 11, 22.
- KADER, M., SMITH, A. P., GUIDUCCI, C., WONDERLICH, E. R., NORMOLLE, D., WATKINS, S. C., BARRAT, F. J. & BARRATT-BOYES, S. M. 2013. Blocking TLR7- and TLR9-mediated IFN-alpha production by plasmacytoid dendritic cells does not diminish immune activation in early SIV infection. *PLoS Pathog*, 9, e1003530.
- KADOWAKI, N., HO, S., ANTONENKO, S., MALEFYT, R. W., KASTELEIN, R. A., BAZAN, F. & LIU, Y. J. 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*, 194, 863-9.
- KALERGIS, A. M., BOUCHERON, N., DOUCEY, M. A., PALMIERI, E., GOYARTS, E. C., VEGH, Z., LUESCHER, I. F. & NATHENSON, S. G. 2001. Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat Immunol*, 2, 229-34.
- KALERGIS, A. M., FIERRO, A., FIGUEROA, C., GONZALEZ, P. & TOBAR, J. 2004. [Clinical applications of antigen-specific detection of T lymphocytes]. *Rev Med Chil*, 132, 371-80.
- KALINSKI, P. 2009. Dendritic cells in immunotherapy of established cancer: Roles of signals 1, 2, 3 and 4. *Curr Opin Investig Drugs*, 10, 526-35.

- KALINSKI, P., HILKENS, C. M., WIERENGA, E. A. & KAPSENBERG, M. L. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*, 20, 561-7.
- KEIR, M. E., FRANCISCO, L. M. & SHARPE, A. H. 2007. PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 19, 309-14.
- KIJEWSKI, S. D. & GUMMULURU, S. 2015. A mechanistic overview of dendritic cell-mediated HIV-1 trans infection: the story so far. *Future Virol*, 10, 257-269.
- KILLIAN, M. S., FUJIMURA, S. H., HECHT, F. M. & LEVY, J. A. 2006. Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment. *AIDS*, 20, 1247-52.
- KIM, Y. J., PARK, S. J. & BROXMEYER, H. E. 2011. Phagocytosis, a potential mechanism for myeloid-derived suppressor cell regulation of CD8+ T cell function mediated through programmed cell death-1 and programmed cell death-1 ligand interaction. *J Immunol*, 187, 2291-301.
- KODAMA, A., TANAKA, R., ZHANG, L. F., ADACHI, T., SAITO, M., ANSARI, A. A. & TANAKA, Y. 2010. Impairment of in vitro generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated human immunodeficiency virus-1: Involvement of type I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol*, 71, 541-50.
- KRAHLING, S., CALLAHAN, M. K., WILLIAMSON, P. & SCHLEGEL, R. A. 1999. Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Cell Death Differ*, 6, 183-9.
- KULPA, D. A., LAWANI, M., COOPER, A., PERETZ, Y., AHLERS, J. & SEKALY, R. P. 2013. PD-1 coinhibitory signals: the link between pathogenesis and protection. *Semin Immunol*, 25, 219-27.
- KUMAR, A., ABBAS, W. & HERBEIN, G. 2013. TNF and TNF receptor superfamily members in HIV infection: new cellular targets for therapy? *Mediators Inflamm*, 2013, 484378.
- LAFORGE, M., CAMPILLO-GIMENEZ, L., MONCEAUX, V., CUMONT, M. C., HURTREL, B., CORBEIL, J., ZAUNDERS, J., ELBIM, C. & ESTAQUIER, J. 2011. HIV/SIV infection primes monocytes and dendritic cells for apoptosis. *PLoS Pathog*, 7, e1002087.
- LANGENKAMP, A., MESSI, M., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*, 1, 311-6.
- LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2000. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol*, 12, 92-8.
- LECHMANN, M., BERCHTOLD, S., HAUBER, J. & STEINKASSERER, A. 2002. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol*, 23, 273-5.
- LEHMANN, C., HARPER, J. M., TAUBERT, D., HARTMANN, P., FATKENHEUER, G., JUNG, N., VAN LUNZEN, J., STELLBRINK, H. J., GALLO, R. C. & ROMERIO, F. 2008. Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 48, 522-30.
- LEHMANN, C., LAFFERTY, M., GARZINO-DEMO, A., JUNG, N., HARTMANN, P., FATKENHEUER, G., WOLF, J. S., VAN LUNZEN, J. & ROMERIO, F. 2010. Plasmacytoid dendritic cells accumulate and secrete interferon alpha in lymph nodes of HIV-1 patients. *PLoS One*, 5, e11110.
- LELIC, A., VERSCHOOR, C. P., VENTRESCA, M., PARSONS, R., EVELEGH, C., BOWDISH, D., BETTS, M. R., LOEB, M. B. & BRAMSON, J. L. 2012. The polyfunctionality of human memory CD8+ T cells elicited by acute and chronic virus infections is not influenced by age. *PLoS Pathog*, 8, e1003076.
- LENSCHOW, D. J., WALUNAS, T. L. & BLUESTONE, J. A. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14, 233-58.

- LI, H., EVANS, T. I., GILLIS, J., CONNOLE, M. & REEVES, R. K. 2014. Bone Marrow-imprinted Gut-homing of pDCs in Acute SIV Infection Results in Massive Accumulation of Hyperfunctional CD4+ pDCs in the Mucosae. *J Infect Dis*.
- LIM, T. S., CHEW, V., SIEOW, J. L., GOH, S., YEONG, J. P., SOON, A. L. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2016. PD-1 expression on dendritic cells suppresses CD8+ T cell function and antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 5, e1085146.
- LIU, L. Y., BLASIUS, A. L., WELCH, M. J., COLONNA, M., OLDSTONE, M. B. & ZUNIGA, E. I. 2008. In vivo conversion of BM plasmacytoid DC into CD11b+ conventional DC during virus infection. *Eur J Immunol*, 38, 3388-94.
- LORE, K., BETTS, M. R., BRECHLEY, J. M., KURUPPU, J., KHOJASTEH, S., PERFETTO, S., ROEDERER, M., SEDER, R. A. & KOUP, R. A. 2003. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*, 171, 4320-8.
- LORE, K., SONNERBORG, A., BROSTROM, C., GOH, L. E., PERRIN, L., MCDADE, H., STELLBRINK, H. J., GAZZARD, B., WEBER, R., NAPOLITANO, L. A., VAN KOOYK, Y. & ANDERSSON, J. 2002. Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS*, 16, 683-92.
- MALLERET, B., MANEGLIER, B., KARLSSON, I., LEBON, P., NASCIMBENI, M., PERIE, L., BROCHARD, P., DELACHE, B., CALVO, J., ANDRIEU, T., SPREUX-VAROUAUX, O., HOSMALIN, A., LE GRAND, R. & VASLIN, B. 2008. Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression. *Blood*, 112, 4598-608.
- MANCHES, O., FRLETA, D. & BHARDWAJ, N. 2014. Dendritic cells in progression and pathology of HIV infection. *Trends Immunol*, 35, 114-22.
- MANCHES, O., MUNN, D., FALLAHI, A., LIFSON, J., CHAPEROT, L., PLUMAS, J. & BHARDWAJ, N. 2008. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest*, 118, 3431-9.
- MARTINSON, J. A., ROMAN-GONZALEZ, A., TENORIO, A. R., MONTOYA, C. J., GICHINGA, C. N., RUGELES, M. T., TOMAI, M., KRIEG, A. M., GHANEKAR, S., BAUM, L. L. & LANDAY, A. L. 2007. Dendritic cells from HIV-1 infected individuals are less responsive to toll-like receptor (TLR) ligands. *Cell Immunol*, 250, 75-84.
- MCELRATH, M. J., STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. 1991. Latent HIV-1 infection in enriched populations of blood monocytes and T cells from seropositive patients. *J Clin Invest*, 87, 27-30.
- MEIER, A., BAGCHI, A., SIDHU, H. K., ALTER, G., SUSCOVICH, T. J., KAVANAGH, D. G., STREECK, H., BROCKMAN, M. A., LEGALL, S., HELLMAN, J. & ALTFELD, M. 2008. Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS*, 22, 655-8.
- MELLMAN, I. 2013. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*, 1, 145-9.
- MERAD, M. & MANZ, M. G. 2009. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 113, 3418-27.
- MILLER, E. A., SPADACCIA, M. R., O'BRIEN, M. P., ROLNITZKY, L., SABADO, R., MANCHES, O., FRLETA, D. & BHARDWAJ, N. 2012. Plasma factors during chronic HIV-1 infection impair IL-12 secretion by myeloid dendritic cells via a virus-independent pathway. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 61, 535-44.
- MIR, K. D., BOSINGER, S. E., GASPER, M., HO, O., ELSE, J. G., BRECHLEY, J. M., KELVIN, D. J., SILVESTRI, G., HU, S. L. & SODORA, D. L. 2012. Simian immunodeficiency virus-induced alterations in monocyte production of tumor necrosis factor alpha contribute to reduced immune activation in sooty mangabeys. *J Virol*, 86, 7605-15.

- MOURIES, J., MORON, G., SCHLECHT, G., ESCRIOU, N., DADAGLIO, G. & LECLERC, C. 2008. Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cells in vivo after TLR activation. *Blood*, 112, 3713-22.
- MUNN, D. H., SHARMA, M. D., HOU, D., BABAN, B., LEE, J. R., ANTONIA, S. J., MESSINA, J. L., CHANDLER, P., KONI, P. A. & MELLOR, A. L. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest*, 114, 280-90.
- NA, H., CHO, M. & CHUNG, Y. 2016. Regulation of Th2 Cell Immunity by Dendritic Cells. *Immune Netw*, 16, 1-12.
- NI, K. & O'NEILL, H. C. 1997. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol*, 75, 223-30.
- NILSSON, J., BOASSO, A., VELILLA, P. A., ZHANG, R., VACCARI, M., FRANCHINI, G., SHEARER, G. M., ANDERSSON, J. & CHOUGNET, C. 2006. HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS. *Blood*, 108, 3808-17.
- NURIEVA, R., THOMAS, S., NGUYEN, T., MARTIN-OROZCO, N., WANG, Y., KAJA, M. K., YU, X. Z. & DONG, C. 2006. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J*, 25, 2623-33.
- O'BRIEN, M., MANCHES, O. & BHARDWAJ, N. 2013. Plasmacytoid dendritic cells in HIV infection. *Adv Exp Med Biol*, 762, 71-107.
- O'DOHERTY, U., PENG, M., GEZELTER, S., SWIGGARD, W. J., BETJES, M., BHARDWAJ, N. & STEINMAN, R. M. 1994. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*, 82, 487-93.
- O'SULLIVAN, B. & THOMAS, R. 2003. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol*, 23, 83-107.
- OGATA, M., ITO, T., SHIMAMOTO, K., NAKANISHI, T., SATSUTANI, N., MIYAMOTO, R. & NOMURA, S. 2013. Plasmacytoid dendritic cells have a cytokine-producing capacity to enhance ICOS ligand-mediated IL-10 production during T-cell priming. *Int Immunol*, 25, 171-82.
- OKAZAKI, T. & HONJO, T. 2007. PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. *Int Immunol*, 19, 813-24.
- PANDREA, I., SODORA, D. L., SILVESTRI, G. & APETREI, C. 2008. Into the wild: simian immunodeficiency virus (SIV) infection in natural hosts. *Trends Immunol*, 29, 419-28.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., BUTINI, L., PIZZO, P. A., SCHNITTMAN, S. M., KOTLER, D. P. & FAUCI, A. S. 1991. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 9838-42.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., DEMAREST, J. F., COHEN, O. J., VACCAREZZA, M., GANTT, K., MURO-CACHO, C. & FAUCI, A. S. 1994. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev*, 140, 105-30.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C. & FAUCI, A. S. 1993. The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS*, 7 Suppl 1, S19-23.
- PARK, S. J., NAMKOONG, H., DOH, J., CHOI, J. C., YANG, B. G., PARK, Y. & CHUL SUNG, Y. 2014. Negative role of inducible PD-1 on survival of activated dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 95, 621-9.
- PION, M., GRANELLI-PIPERNO, A., MANGEAT, B., STALDER, R., CORREA, R., STEINMAN, R. M. & FIGUET, V. 2006. APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J Exp Med*, 203, 2887-93.
- PLANES, R., BENMOHAMED, L., LEGHMARI, K., DELOBEL, P., IZOPET, J. & BAHRAOUI, E. 2014. HIV-1 Tat Protein Induces PD-L1 (B7-H1) Expression on Dendritic Cells through

- Tumor Necrosis Factor Alpha- and Toll-Like Receptor 4-Mediated Mechanisms. *J Virol*, 88, 6672-89.
- PORCIELLO, N. & TUOSTO, L. 2016. CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 28, 11-9.
- PORICHIS, F. & KAUFMANN, D. E. 2012. Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Curr HIV/AIDS Rep*, 9, 81-90.
- PRECHTEL, A. T. & STEINKASSERER, A. 2007. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res*, 299, 59-69.
- RANDOLPH, G. J., OCHANDO, J. & PARTIDA-SANCHEZ, S. 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol*, 26, 293-316.
- RAZIORROUH, B., HEEG, M., KURKTSCHIEV, P., SCHRAUT, W., ZACHOVAL, R., WENDTNER, C., WACHTLER, M., SPANNAGL, M., DENK, G., ULSENHEIMER, A., BENGSCHE, B., PIRCHER, H., DIEPOLDER, H. M., GRUNER, N. H. & JUNG, M. C. 2014. Inhibitory phenotype of HBV-specific CD4+ T-cells is characterized by high PD-1 expression but absent coregulation of multiple inhibitory molecules. *PLoS One*, 9, e105703.
- REIS E SOUSA, C. 2006. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol*, 6, 476-83.
- ROBERTS, M., GOMPELS, M., PINCHING, A. J. & KNIGHT, S. C. 1994. Dendritic cells from HIV-1 infected individuals show reduced capacity to stimulate autologous T-cell proliferation. *Immunol Lett*, 43, 39-43.
- ROEDERER, M., NOZZI, J. L. & NASON, M. C. 2011. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry A*, 79, 167-74.
- SABADO, R. L., O'BRIEN, M., SUBEDI, A., QIN, L., HU, N., TAYLOR, E., DIBBEN, O., STACEY, A., FELLAY, J., SHIANNAN, K. V., SIEGAL, F., SHODELL, M., SHAH, K., LARSSON, M., LIFSON, J., NADAS, A., MARMOR, M., HUTT, R., MARGOLIS, D., GARMON, D., MARKOWITZ, M., VALENTINE, F., BORROW, P. & BHARDWAJ, N. 2010. Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection. *Blood*, 116, 3839-52.
- SACHDEVA, M., SHARMA, A. & ARORA, S. K. 2015. Functional Impairment of Myeloid Dendritic Cells during Advanced Stage of HIV-1 Infection: Role of Factors Regulating Cytokine Signaling. *PLoS One*, 10, e0140852.
- SAHA, B., CHOUDHARY, M. C. & SARIN, S. K. 2013. Expression of inhibitory markers is increased on effector memory T cells during hepatitis C virus/HIV coinfection as compared to hepatitis C virus or HIV monoinfection. *AIDS*, 27, 2191-200.
- SAIDI, H., BRAS, M., FORMAGLIO, P., MELKI, M. T., CHARBIT, B., HERBEUVAL, J. P. & GOUGEON, M. L. 2016. HMGB1 Is Involved in IFN-alpha Production and TRAIL Expression by HIV-1-Exposed Plasmacytoid Dendritic Cells: Impact of the Crosstalk with NK Cells. *PLoS Pathog*, 12, e1005407.
- SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev*, 177, 134-40.
- SATO, K. & FUJITA, S. 2007. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*, 56, 183-91.
- SCHACKER, T. W., NGUYEN, P. L., BEILMAN, G. J., WOLINSKY, S., LARSON, M., REILLY, C. & HAASE, A. T. 2002. Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J Clin Invest*, 110, 1133-9.
- SCHUTTERS, K., KUSTERS, D. H., CHATROU, M. L., MONTERO-MELENDZ, T., DONNERS, M., DECKERS, N. M., KRYSKO, D. V., VANDENABEELE, P., PERRETTI, M., SCHURGERS, L. J. & REUTELINGSPERGER, C. P. 2013. Cell surface-expressed phosphatidylserine as therapeutic target to enhance phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Death Differ*, 20, 49-56.

- SCHWARTZ, J. C., ZHANG, X., NATHENSON, S. G. & ALMO, S. C. 2002. Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol*, 3, 427-34.
- SHEN, T., CHEN, X., CHEN, Y., XU, Q., LU, F. & LIU, S. 2010. Increased PD-L1 expression and PD-L1/CD86 ratio on dendritic cells were associated with impaired dendritic cells function in HCV infection. *J Med Virol*, 82, 1152-9.
- SHOUNAN, Y., FENG, X. & O'CONNELL, P. J. 1998. Apoptosis detection by annexin V binding: a novel method for the quantitation of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 217, 61-70.
- SIEGAL, F. P., KADOWAKI, N., SHODELL, M., FITZGERALD-BOCARSLY, P. A., SHAH, K., HO, S., ANTONENKO, S. & LIU, Y. J. 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284, 1835-7.
- SMED-SORENSEN, A. & LORE, K. 2011. Dendritic cells at the interface of innate and adaptive immunity to HIV-1. *Curr Opin HIV AIDS*, 6, 405-10.
- SMED-SORENSEN, A., LORE, K., VASUDEVAN, J., LOUDER, M. K., ANDERSSON, J., MASCOLA, J. R., SPETZ, A. L. & KOUP, R. A. 2005. Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol*, 79, 8861-9.
- SMED-SORENSEN, A., LORE, K., WALTHER-JALLOW, L., ANDERSSON, J. & SPETZ, A. L. 2004. HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood*, 104, 2810-7.
- SODORA, D. L., ALLAN, J. S., APETREI, C., BRENCHLEY, J. M., DOUEK, D. C., ELSE, J. G., ESTES, J. D., HAHN, B. H., HIRSCH, V. M., KAUR, A., KIRCHHOFF, F., MULLER-TRUTWIN, M., PANDREA, I., SCHMITZ, J. E. & SILVESTRI, G. 2009. Toward an AIDS vaccine: lessons from natural simian immunodeficiency virus infections of African nonhuman primate hosts. *Nat Med*, 15, 861-5.
- SODORA, D. L. & SILVESTRI, G. 2008. Immune activation and AIDS pathogenesis. *AIDS*, 22, 439-46.
- STEINMAN, R. M. 2003. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS*, 111, 675-97.
- STEINMAN, R. M., HAWIGER, D. & NUSSENZWEIG, M. C. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 685-711.
- STETSON, D. B. & MEDZHITOV, R. 2006. Type I interferons in host defense. *Immunity*, 25, 373-81.
- SWIECKI, M. & COLONNA, M. 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol*, 15, 471-85.
- SWIECKI, M., WANG, Y., VERMI, W., GILFILLAN, S., SCHREIBER, R. D. & COLONNA, M. 2011. Type I interferon negatively controls plasmacytoid dendritic cell numbers in vivo. *J Exp Med*, 208, 2367-74.
- TELESHOVA, N., DERBY, N., MARTINELLI, E., PUGACH, P., CALENDIA, G. & ROBBIANI, M. 2013. Simian immunodeficiency virus interactions with macaque dendritic cells. *Adv Exp Med Biol*, 762, 155-81.
- TOUGH, D. F. 2012. Modulation of T-cell function by type I interferon. *Immunol Cell Biol*, 90, 492-7.
- TRABATTONI, D., SARESELLA, M., BIASIN, M., BOASSO, A., PIACENTINI, L., FERRANTE, P., DONG, H., MASERATI, R., SHEARER, G. M., CHEN, L. & CLERICI, M. 2003. B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression. *Blood*, 101, 2514-20.
- TURVILLE, S., WILKINSON, J., CAMERON, P., DABLE, J. & CUNNINGHAM, A. L. 2003. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J Leukoc Biol*, 74, 710-8.

- UENO, H., KLECHEVSKY, E., MORITA, R., ASPORD, C., CAO, T., MATSUI, T., DI PUCCHIO, T., CONNOLLY, J., FAY, J. W., PASCUAL, V., PALUCKA, A. K. & BANCHEREAU, J. 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev*, 219, 118-42.
- VAN GREVENYNGHE, J., HALWANI, R., CHOMONT, N., ANCUTA, P., PERETZ, Y., TANEL, A., PROCOPIO, F. A., SHI, Y., SAID, E. A., HADDAD, E. K. & SEKALY, R. P. 2008. Lymph node architecture collapse and consequent modulation of FOXO3a pathway on memory T- and B-cells during HIV infection. *Semin Immunol*, 20, 196-203.
- VAN KOOTEN, C. & BANCHEREAU, J. 2000. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*, 67, 2-17.
- VICENZI, E., LIO, P. & POLI, G. 2013. The puzzling role of CXCR4 in human immunodeficiency virus infection. *Theranostics*, 3, 18-25.
- VILLADANGOS, J. A. & YOUNG, L. 2008. Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells. *Immunity*, 29, 352-61.
- WANG, X., ZHANG, Z., ZHANG, S., FU, J., YAO, J., JIAO, Y., WU, H. & WANG, F. S. 2008. B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol*, 38, 3226-36.
- WIJEWARDANA, V., BOUWER, A. L., BROWN, K. N., LIU, X. & BARRATT-BOYES, S. M. 2014. Accumulation of functionally immature myeloid dendritic cells in lymph nodes of rhesus macaques with acute pathogenic simian immunodeficiency virus infection. *Immunology*, 143, 146-54.
- WIJEWARDANA, V., BROWN, K. N. & BARRATT-BOYES, S. M. 2009. Studies of plasmacytoid dendritic cell dynamics in simian immunodeficiency virus infection of nonhuman primates provide insights into HIV pathogenesis. *Curr HIV Res*, 7, 23-9.
- WIJEWARDANA, V., KRISTOFF, J., XU, C., MA, D., HARET-RICHTER, G., STOCK, J. L., POLICICCHIO, B. B., MOBLEY, A. D., NUSBAUM, R., AAMER, H., TRICHEL, A., RIBEIRO, R. M., APETREI, C. & PANDREA, I. 2013. Kinetics of myeloid dendritic cell trafficking and activation: impact on progressive, nonprogressive and controlled SIV infections. *PLoS Pathog*, 9, e1003600.
- WIJEWARDANA, V., SOLOFF, A. C., LIU, X., BROWN, K. N. & BARRATT-BOYES, S. M. 2010. Early myeloid dendritic cell dysregulation is predictive of disease progression in simian immunodeficiency virus infection. *PLoS Pathog*, 6, e1001235.
- WILLIAMSON, P., VAN DEN EIJNDE, S. & SCHLEGEL, R. A. 2001. Phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic cells. *Methods Cell Biol*, 66, 339-64.
- WONDERLICH, E. R. & BARRATT-BOYES, S. M. 2012. A dendrite in every pie: myeloid dendritic cells in HIV and SIV infection. *Virulence*, 3, 647-53.
- WONDERLICH, E. R., WU, W. C., NORMOLLE, D. P. & BARRATT-BOYES, S. M. 2015. Macrophages and Myeloid Dendritic Cells Lose T Cell-Stimulating Function in Simian Immunodeficiency Virus Infection Associated with Diminished IL-12 and IFN-alpha Production. *J Immunol*, 195, 3284-92.
- XIAO, W., JIANG, L. F., DENG, X. Z., ZHU, D. Y., PEI, J. P., XU, M. L., LI, B. J., WANG, C. J., ZHANG, J. H., ZHANG, Q., ZHOU, Z. X., DING, W. L., XU, X. D. & YUE, M. 2015. PD-1/PD-L1 signal pathway participates in HCV F protein-induced T cell dysfunction in chronic HCV infection. *Immunol Res*.
- YAO, S., WANG, S., ZHU, Y., LUO, L., ZHU, G., FLIES, S., XU, H., RUFF, W., BROADWATER, M., CHOI, I. H., TAMADA, K. & CHEN, L. 2009. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood*, 113, 5811-8.
- YONKERS, N. L., RODRIGUEZ, B., ASAAD, R., LEDERMAN, M. M. & ANTHONY, D. D. 2011. Systemic immune activation in HIV infection is associated with decreased MDC responsiveness to TLR ligand and inability to activate naive CD4 T-cells. *PLoS One*, 6, e23884.

- ZENG, M., HAASE, A. T. & SCHACKER, T. W. 2012. Lymphoid tissue structure and HIV-1 infection: life or death for T cells. *Trends Immunol*, 33, 306-14.
- ZENG, M., SMITH, A. J., WIETGREFE, S. W., SOUTHERN, P. J., SCHACKER, T. W., REILLY, C. S., ESTES, J. D., BURTON, G. F., SILVESTRI, G., LIFSON, J. D., CARLIS, J. V. & HAASE, A. T. 2011. Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J Clin Invest*, 121, 998-1008.
- ZHANG, L., CARRUTHERS, C. D., HE, T., HUANG, Y., CAO, Y., WANG, G., HAHN, B. & HO, D. D. 1997. HIV type 1 subtypes, coreceptor usage, and CCR5 polymorphism. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13, 1357-66.



Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Lymph nodes from HIV-infected individuals harbor mature dendritic cells and increased numbers of PD-L1+ conventional dendritic cells

Paloma Carranza, Perla M. Del Río Estrada*, Dafne Díaz Rivera, Yuria Ablanedo-Terrazas, Gustavo Reyes-Terán*

Departamento de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas", Calzada de Tlalpan # 4502, Colonia Sección XVI, C.P. 14080, Del. Tlalpan, México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 July 2015
Revised 20 May 2016
Accepted 21 May 2016
Available online xxx

Keywords:

Dendritic cells
Lymph nodes
Co-stimulation
HIV
PD-L1

ABSTRACT

The immune response induced by dendritic cells (DC) during the HIV infection has been of remarkable interest because of the therapeutic potential of DC for vaccine development. However, their beneficial or detrimental contribution in HIV infection remains unclear. The activation state of DC in lymph nodes (LN) is essential to induce T cell responses against HIV. In the present study, we characterized the immunophenotype and function of conventional (cDC) and plasmacytoid (pDC) dendritic cells from peripheral blood (PB) and LN of HIV⁺ individuals. We observed that the frequency of PB pDC was decreased and exhibited an immature phenotype; whereas in the LN, activated pDC accumulated (CD40⁺ and CD83⁺). In addition, the frequency of PB cDC from HIV⁺ individuals was decreased and exhibited an immature phenotype, whereas LN harbored activated and mature cDC (CD40⁺, CD83⁺, CD80⁺ and CD86⁺). However, an increased number of PD-L1⁺ cDC was also observed in the LN. Moreover, pDC and cDC were able to produce inflammatory cytokines (IFN- α , TNF- α and IL-12) after TLR stimulation. These findings suggest that LN cDC expressing PD-L1 from HIV⁺ individuals may negatively impact the generation of HIV-specific T cells and that DC might be contributing to tissue chronic immune activation.

© 2016 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Lymph nodes (LN) are anatomical sites where T and B cells are primed by antigen presenting cells (APC) such as dendritic cells (DC). This event is facilitated by the up-regulation of class II MHC proteins, co-stimulatory proteins, chemokine receptors, and by secretion of inflammatory cytokines in response to microbial components [1]. Dendritic cells are a heterogeneous group of cells that comprise several subtypes with distinct phenotypes and functional

properties according to their localization [2]. In humans, two different DC subsets have been identified in the blood: plasmacytoid DC (pDC) and conventional DC (cDC) [3]. Functionally, cDC are APC, whereas pDC produce high levels of type I IFN in response to viral infections [4,5]. Although these cells have been well described in the peripheral blood (PB), less is known about human DC populations in secondary lymphoid organs such as LN [6]. The activation of T lymphocytes in LN depends on the balance between co-stimulatory and co-inhibitory signals provided by completely mature DC. The CD40, CD83, CD80 and CD86 proteins provide co-stimulatory signals to the T cells (Tc), whereas the co-inhibitory protein PD-L1 negatively regulates the activation of the Tc after its ligation with its receptor PD-1 [1].

In the HIV context, most of the work on DC has focused on the study of PB DC from HIV-infected people due to the readily access to this compartment and the limitations to obtain lymphoid organs. During HIV infection, many cells, including DC, are altered in frequency and phenotype. Several studies have reported that the frequency of PB cDC and pDC are significantly decreased [7–9]. This

Abbreviations: cDC, conventional dendritic cells; pDC, plasmacytoid dendritic cells; LN, lymph nodes; PB, peripheral blood; Tc, T cells; pVL, plasma viral load; GMFI, geometric mean of fluorescence intensity; FMO, fluorescence minus one.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: paloma.carranza@cieni.org.mx (P. Carranza), perla.delrio@cieni.org.mx (P.M. Del Río Estrada), dafne.diaz.rivera@gmail.com (D. Díaz Rivera), yuria.ablanedo@cieni.org.mx (Y. Ablanedo-Terrazas), reyesteran@cieni.org.mx (G. Reyes-Terán).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.05.019>

0198-8859/© 2016 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

decrease correlates with high levels of plasma viral load (pVL) and with low levels of circulating CD4⁺ Tc [10,11]. Moreover, given the small number of circulating DC in PB, functional studies *in vitro* have relied on monocyte-derived DC (moDC) [12–15], demonstrating that the exposure of moDC to HIV gp120 protein induces abnormal maturation and functional alterations in these cells [13]. However, a recent study demonstrated that HIV-1 Tat protein induces the maturation of moDC as well as the overexpression of the co-inhibitory protein PD-L1 [15]. Also, this has been reported in other chronic viral infections such as HCV and HBV the presence of immature DC in PB [16,17], characterized by decreased expression of CD40, CD83, CD86 and increased PD-L1 [16].

Only few articles have reported the maturation state of DC in LN from HIV-infected individuals based only on the expression of co-stimulatory proteins. Although the results are controversial, it has been suggested that these cells are immature (characterized by the increased expression of CD40 but not CD80, CD83 and CD86) [8,14,18]. An immature DC might lead to tolerance or anergy instead of activation of Tc [19], thus contributing to the pathogenesis of HIV infection.

During the HIV infection, the LN become an important anatomical site of sustained virus production [20], exhibiting increased collagen deposition with consequent loss of the LN architecture [21]. This damage might affect important processes, such as antigen presentation and priming that are performed in this site. Understanding how LN DC are altered during HIV-1 infection is crucial for the development of new therapy strategies, including approaches to target DC with antigen to induce efficient adaptive immunity against HIV. Whether the phenotype observed in PB DC is similar in the LN during HIV infection is one of the purposes of this study. In the present study, we characterized the expression of co-stimulatory, co-inhibitory proteins and cytokine production in PB and LN DC of HIV⁺ individuals. The findings shown here may have an important impact in the use of DC to induce specific immune responses as well as the use of blockade antibodies against PD-1 and PD-L1 as an alternative therapy to rescue Tc from exhaustion [22].

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement

All ethical issues related to this project were evaluated and approved by the Institutional Bioethics and Science Committee of the National Institute of Respiratory Diseases in Mexico City. Peripheral blood and lymphoid tissue samples were obtained from HIV⁻ and HIV⁺ individuals after written consent was obtained.

2.2. Study subjects and samples

For DC characterization, we recruited 31 HIV⁺ individuals that were not receiving antiretroviral treatment and had no opportunistic infections by the time of sample collection. Peripheral blood samples were obtained from individuals with a median of plasma viral load (pVL) of 101,276 RNA copies/mL (3180–2,577,701 RNA copies/mL) and a median of CD4⁺ Tc count of 402 cells/ μ L of blood (4–1190 cells/ μ L) (Characteristics of each donor are shown in [Supplementary Table 1](#)). Blood samples and LN from HIV⁻ subjects were also obtained (n=5) with a median CD4⁺ Tc count of 1371 cells/ μ L of blood (970–2788 cells/ μ L). We obtained samples from individuals who had palpable LN in the cervical area and were biopsied for diagnostic purposes. None of the patients included in this study had opportunistic infections, and all were HBV and HCV negative. All LN biopsies were tested for the presence of fungi and bacteria by culture and for the presence of *Mycobacterium*

tuberculosis by GeneXpert; all positive LN biopsies were discarded from this study. Histopathology studies were performed to discard any neoplasia. Biopsy samples were placed in Hanks medium (Lonza, Walkersville, MD) and immediately transferred to the laboratory for further processing. Lymphoid tissue was cut in small pieces with a scalpel and incubated in Hanks medium with calcium, magnesium and collagenase D (400 units/mL, Roche, Basilea, Switzerland) at 37 °C for 20 min. The LN used for cytokine production assays were not incubated with collagenase. Then cells were dissociated using a 70- μ m mesh and a syringe embolus. The day of the LN biopsy, PB samples were also collected to determine pVL, CD4⁺ Tc count. Fresh PBMC were separated from PB by density gradient centrifugation using Ficoll-Hypaque (Accurate, Florida, USA). After cell separation, PBMC and LNMC were stained for flow cytometry analysis.

2.3. Phenotypic characterization of dendritic cells

To avoid unintentional maturation of DC due to culture exposure or alterations in cell protein expression due to freeze-thawed processes, cells were stained immediately after separation [23]. For DC characterization, freshly isolated PBMC or LNMC were washed twice with PBS (Lonza, Walkersville, MD) and incubated with amine-reactive dye (LIVE/DEAD fixable stain, Molecular Probes, Oregon, USA) for 10 min at 4 °C. Cells were then washed once with PBS and once with PBA (1% albumin and 1% sodium azide in PBS) and incubated with a mixture of biotin mAb against CD3 (clone UCHT1), CD14 (clone 61D3), CD20 (clone 2H7), and CD56 (clone CSSMB; all biotin antibodies from eBioscience, California, USA). After 20-min incubation, cells were washed twice with PBA and incubated for 30 min at 4 °C with streptavidin PE Texas Red (BD, San Jose, CA) and fluorochrome-conjugated antibodies: HLA-DR APCCy7 (clone L243, BD), CD11c AF700 (clone 3.9, eBioscience), CD123 PE (clone 7G3, BD), CD40 APC (clone 5C3, eBioscience), CD83 FITC (clone HB15e, eBioscience), CD80 V450 (clone L307.4, BD) and CD86 PECy5 (clone IT2.2, eBioscience). After incubation, cells were washed twice and fixed with 3% paraformaldehyde. A second panel was used to assess the expression of co-inhibitory proteins using the same mixture of biotin mAb followed by streptavidin PE Texas Red, HLA-DR AF700 (clone LN3, eBioscience), CD11c APC (clone B-ly6, BD), CD123 PECy5 (clone 9F5, BD), PD-1 PE (clone MIH4, BD), Annexin V, and PD-L1 PECy7 (clone MIH1, BD). Cells were acquired on a FACS ARIA (BD) and the analysis was performed with FlowJo software (version 7.6.5. TreeStar Inc., Oregon, USA). Fluorescence minus one (FMO) controls were included. The geometric mean of fluorescence intensity (GMFI) was calculated from the positive population.

2.4. Cytokine production by dendritic cells

For DC cytokine production, 3–5 million of freshly isolated PBMC or LNMC were placed in R10 (10% of fetal bovine serum, 1% of penicillin-streptomycin and 1% of glutamine) at 37 °C with different TLR ligands: LPS (1 μ g/mL) for TLR-4 or CpG (3 μ g/mL) for TLR-9. Also, a non-stimulated condition was considered. After 4 h of stimulation, brefeldin A (1 μ g/mL, BD) was added to the cells in culture to stop protein transport and capture the cytokines produced. Cells were incubated at 37 °C for a total of 18 h in R10 medium. For immunocytochemistry, cells were stained as reported previously [24]. Briefly, the cells were washed twice with PBS and incubated with amine-reactive dye for 10 min at RT followed by incubation with biotin mAbs and surface antibodies as described in Section 2.3 (HLA-DR BV785 clone L243, Biolegend; CD11c BV711 clone 3.9, Biolegend; CD123 PerCPCy5.5 clone 7G3, BD). For intracellular staining cells were treated with Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences). Intracellular cytokines were incubated

1 h at RT (IL-12 p40/p70 PE clone C11.5, BD; IFN- α AF647 clone 7N4-1, BD; and TNF- α AF700 clone MAb11, BD). Cells were fixed in formaldehyde 1% prior to analysis on the FORTRESSA cytometer (BD).

2.5. Determination of viral load and CD4⁺ Tc count

The plasma viral load (pVL) was quantified by automated real-time PCR using the m2000 system (Abbott Laboratories, Abbot Park, IL). The range of detection for the pVL was 40–10,000,000 copies/mL. The CD4⁺ Tc count was determined using a TruCount kit (BD Biosciences, San Jose, CA) and a FACSCanto II cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.6. Statistical analysis

Non-parametric statistics was considered for the analysis of our data. GraphPad Prism 5 software was used for statistical analysis. We used the Mann-Whitney *U* test to compare the percentage of positive cells or the expression of the proteins (GMFI) between the two groups of study (HIV⁻ and HIV⁺). Spearman's correlation coefficient was used to analyze associations. Wilcoxon rank sum test was used to compare unstimulated and stimulated cells. *P* values less than 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Accumulation of pDC and loss of cDC in the lymph node of HIV-infected individuals

To compare the frequency of DC in PB and LN, we analyzed single live cells, DC were identified as lineage negative (Lin⁻) and HLA-DR⁺ (Fig. 1A). The cDC were identified as CD11c⁺ cells, whereas pDC were defined as CD123⁺ cells (Fig. 1B). As previously reported [7–9], we found that the frequency of pDC in PB was decreased in the HIV⁺ group compared with the HIV⁻ group ($p = 0.0022$, Fig. 1C). In the HIV⁻ group, the frequency of pDC in PB is similar to the observed in LN; however in the HIV⁺ group, the frequency of pDC in the LN was significantly higher than in PB ($p < 0.0001$, Fig. 1C). On the other hand, the frequency of cDC in the PB of the HIV⁺ group was decreased relative to the HIV⁻ group ($p = 0.0059$, Fig. 1D). Interestingly, the frequency of LN cDC was lower in both groups of study when compared with PB, but this was only significant in the HIV⁺ group ($p = 0.0593$ and $p = 0.0074$ for HIV⁻ and HIV⁺ groups, respectively; Fig. 1D). Importantly, the frequency of LN cDC in the HIV⁺ group was decreased relative to the HIV⁻ group ($P = 0.0039$, Fig. 1D). Interestingly, we did not observe an increase in the frequency of pDC or cDC positive to annexin V from PB and LN (Supplementary Fig. 1).

3.2. Activated pDC in the lymph nodes from HIV-infected individuals correlates with plasma viral load

To characterize the maturation status of pDC, we next evaluated the expression of activation markers (CD40 and CD83), co-stimulatory proteins (CD80 and CD86), and co-inhibitory proteins (PD-1 and PD-L1) in PB and LN pDC from HIV⁻ and HIV⁺ groups. No significant difference was observed in percentage or expression of CD80, CD86, PD-1 or PD-L1 between PB and LN pDC in the study groups. We did not observe differences in the frequencies of CD83⁺ or CD40⁺ pDC between the PB and LN of the HIV⁻ group (Fig. 2A and B, respectively). While in the HIV⁺ group, the LN exhibited an increased frequency of pDC expressing CD83 and CD40 relative to PB ($p = 0.0275$ for CD83 and $p = 0.0143$ for CD40, Fig. 2A and B). Furthermore, we evaluated the GMFI from the

positive cells to determine the expression of CD83 and CD40. We observed, that the expression of CD83 was increased in LN pDC from HIV⁺ individuals compared with PB ($p = 0.0226$, Fig. 2C). In contrast, the GMFI of CD40 decreased significantly in PB and LN pDC of HIV⁺ individuals relative to HIV⁻ individuals ($p = 0.0389$, Fig. 2D). Interestingly, we observed a positive correlation between the percentage of CD83⁺ or CD40⁺ LN pDC and the pVL ($p = 0.0191$, $r = 0.5459$ for CD40 and $p = 0.0475$, $r = 0.4729$ for CD83, Fig. 2E and F). These results suggest that LN from HIV-infected individuals harbor pDC with an activated phenotype that correlate with pVL. It is possible that these cells can be activated by the virus, due to the higher VL found in the LN [25].

3.3. The lymph nodes of HIV-infected individuals harbor activated cDC

To determine the activation and maturation status of cDC in the PB and LN, we evaluated the expression of activation markers (CD40 and CD83) and co-stimulatory proteins (CD80 and CD86). As expected, we observed that freshly stained PB cDC in the HIV⁻ group expressed low levels of CD40, CD80 and CD83 but constitutively expressed CD86, a typical feature of immature cDC (Fig. 3A). The percentage of CD86⁺ cells as well as its expression in cDC did not differ between the PB and LN in either group, possibly due to its high constitutive expression on these cells (Fig. 3A). However, we observed an increased number of PB cDC expressing CD40 or CD80 in the HIV⁺ group relative to the HIV⁻ group ($p = 0.0415$ for CD40 and $p = 0.0039$ for CD80, Fig. 3B and C). In addition, we observed an increased number of CD40⁺, CD80⁺ or CD83⁺ cDC in the LN compared with PB; this increase was observed in both groups because this phenotype is characteristic of mature cDC, commonly observed in LN (Fig. 3B–D). However, the expression (GMFI) of CD40, CD80 and CD83 was significantly higher only in LN cDC of the HIV⁺ group ($p = 0.0002$ for CD40, $p = 0.0102$ for CD80 and $p = 0.0022$ for CD83; Supplementary Fig. 2A–C, respectively). Additionally, the number of CD40⁺ LN cDC correlated significantly with the pVL ($r = 0.4602$, $p = 0.0412$, Fig. 3E), suggesting that these cells can be activated in the LN of HIV⁺ individuals by the virus or other inflammatory factors associated with the presence of the virus. Even though cDC were decreased in the LN of HIV-infected individuals, the remaining cells might be able to receive survival signals through CD40 [26], as we did not observe any increase of apoptotic cDC, assessed by the detection of annexin V (Supplementary Fig. 1).

3.4. An increased number of lymph node cDC expressed PD-L1 in HIV-infected individuals

In addition to the co-stimulatory proteins, we assessed the expression of PD-1 and PD-L1 on cDC in the context of HIV infection. The co-inhibitory protein PD-1 is mainly expressed on activated T and B cells but is induced on splenic DC by various inflammatory stimuli [27]. We did not find significant differences in the percentage or the expression of PD-1 between PB and LN cDC from either study group (Fig. 4A and B). Despite the low frequency of PD-1⁺ cDC in the LN, we observed a positive correlation between the expression of PD-1 on these cells and the pVL ($r = 0.6206$, $p = 0.0103$, Fig. 4C). In addition, in both groups of study, we observed a significant increase in PD-L1 expression on LN cDC relative to PB ($p = 0.0159$ for the HIV⁻ group, $p = 0.0004$ for the HIV⁺ group, Fig. 4D). Moreover, the frequency of PD-L1⁺ cDC between PB and LN in the HIV⁻ group was similar, whereas in the HIV⁺ group a significant increase in the LN relative to PB was observed ($p < 0.0001$, Fig. 4E). In addition, the frequency of PD-L1⁺ cDC was higher in the LN from the HIV⁺ group compared with the HIV⁻ group ($p = 0.0231$, Fig. 4E). Also, we observed a positive correlation between the frequency of CD40⁺ or CD83⁺ cDC and

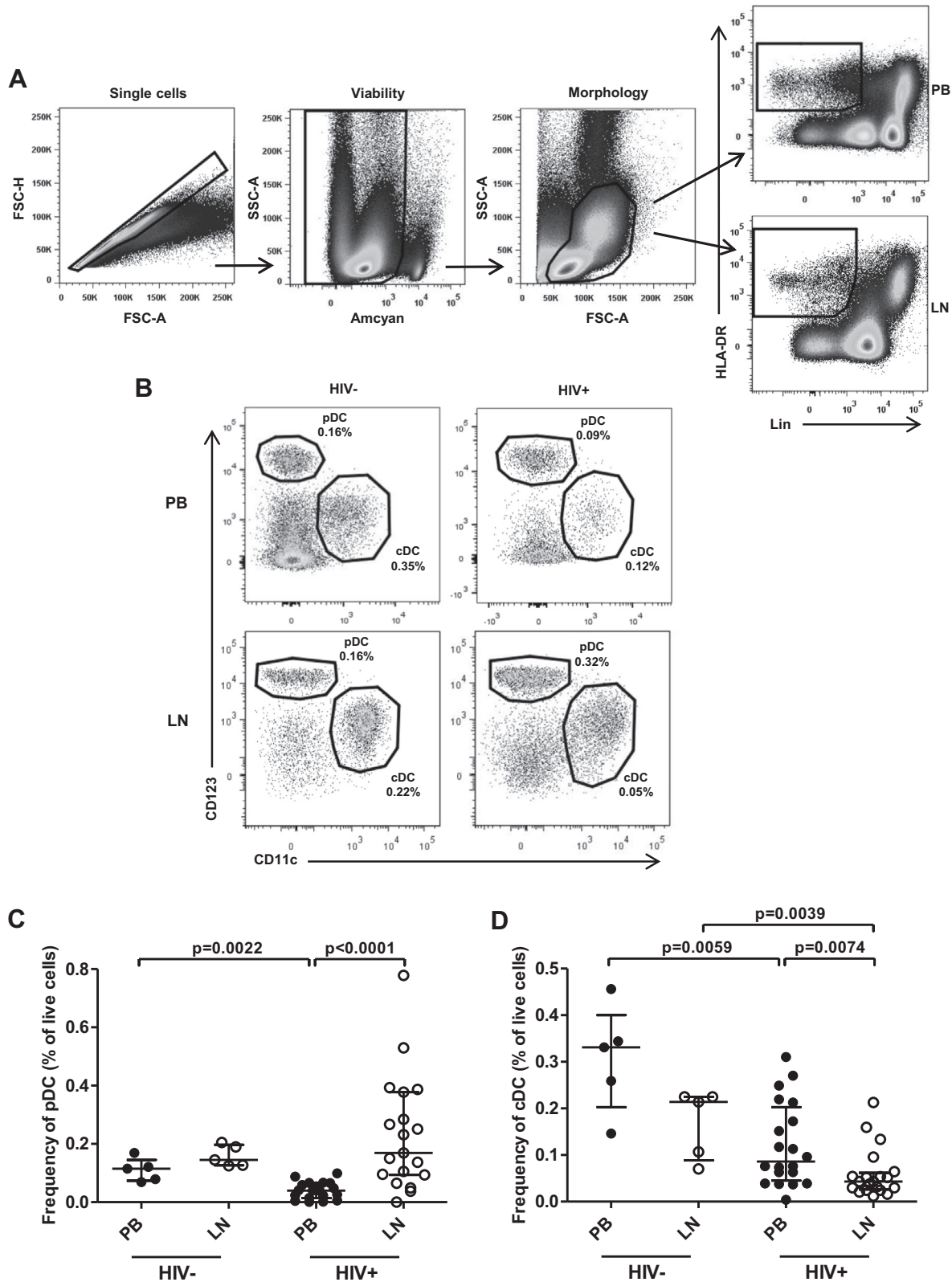


Fig. 1. Frequency of dendritic cells in the peripheral blood and lymph node. **A.** The gating strategy analysis is depicted. Doublets were excluded based on cell size (FSC-H vs FSC-A, single cells), followed by elimination of dead cells (SSC-A vs Amcyan, viability) and morphology (SSC-A vs FSC-A). Dendritic cells were recognized as HLA-DR⁺ and LIN⁻ (CD3⁻, CD14⁻, CD20⁻, and CD56⁻), the upper dot plot correspond to PB cells and the lower to LN cells. **B.** cDC were identified as CD11c⁺, and pDC were identified as CD123⁺. Percentages of cDC and pDC were obtained from the live cell gate. **C.** Frequency of peripheral blood and lymph node pDC from the HIV⁻ and HIV⁺ groups. **D.** Frequency of peripheral blood and lymph node cDC from HIV⁻ and HIV⁺ groups. Mann Whitney *U* test was used to assess differences between the study groups (HIV⁻ and HIV⁺) or sample compartments (PB and LN). A *p* value less than 0.05 was considered significant. NS = not significant, PB = peripheral blood, LN = lymph node.

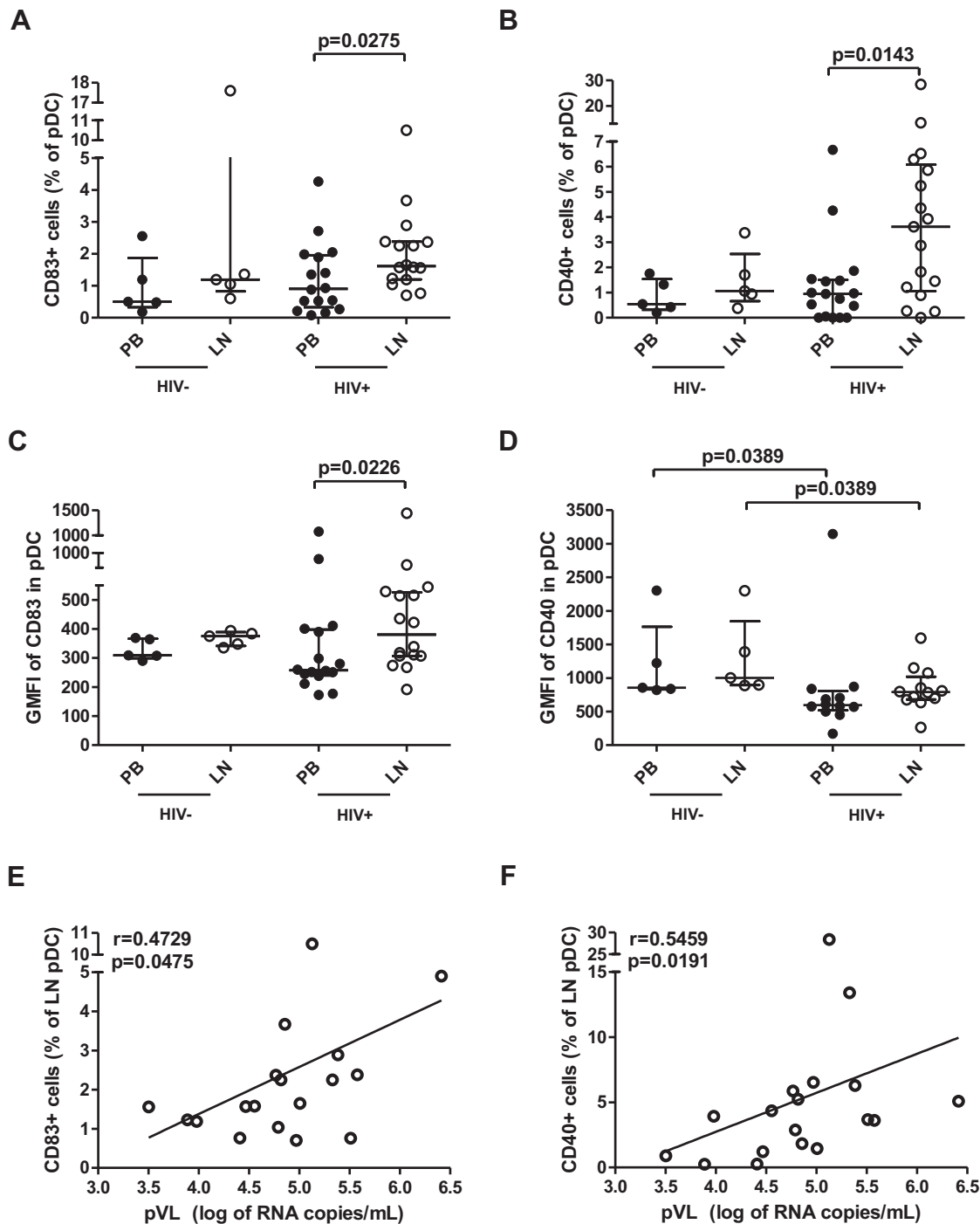


Fig. 2. Expression of CD83 and CD40 in pDC within freshly isolated peripheral blood and lymph nodes. **A.** Frequency of CD83⁺ pDC in the PB and LN from HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **B.** Frequency of CD40⁺ pDC in the PB and LN from HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **C.** Expression (GMFI) of CD83 in pDC from the PB and LN of HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **D.** Expression (GMFI) of CD40 in pDC from the PB and LN of HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **E.** Plasma viral load (pVL) positively correlated with the percentage of CD40⁺ pDC. **F.** Plasma viral load positively correlated with the percentage of CD83⁺ pDC. The frequency and geometric mean of fluorescence intensity (GMFI) was determined using a fluorescence minus one (FMO) control for each fluorescent antibody. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney *U* test for comparisons between groups or sample compartments and Spearman correlation test was used for correlations. A *p* value less than 0.05 was considered significant. PB = peripheral blood, LN = lymph node.

PD-L1⁺ cDC in the LN from the HIV⁺ group ($p = 0.0486$, $r = 0.4708$ for CD40, $p = 0.0347$, $r = 0.4997$ for CD83; Fig. 4F and G, respectively). Importantly, in our study we observed an increased number of PD-1⁺ naïve Tc in the LN of the HIV⁺ group compared with the HIV⁻ group ($p = 0.0200$ for CD4⁺ Tc, $p = 0.0061$ for CD8⁺ Tc; Supplementary Fig. 3A and B, respectively).

3.5. Dendritic cells from the lymph nodes of HIV-infected individuals produce inflammatory cytokines

In order to determine if DC are able to mature and produce inflammatory cytokines, we assessed the production of IL-12 and TNF- α in cDC, and IFN- α and TNF- α in pDC from PB and LN of

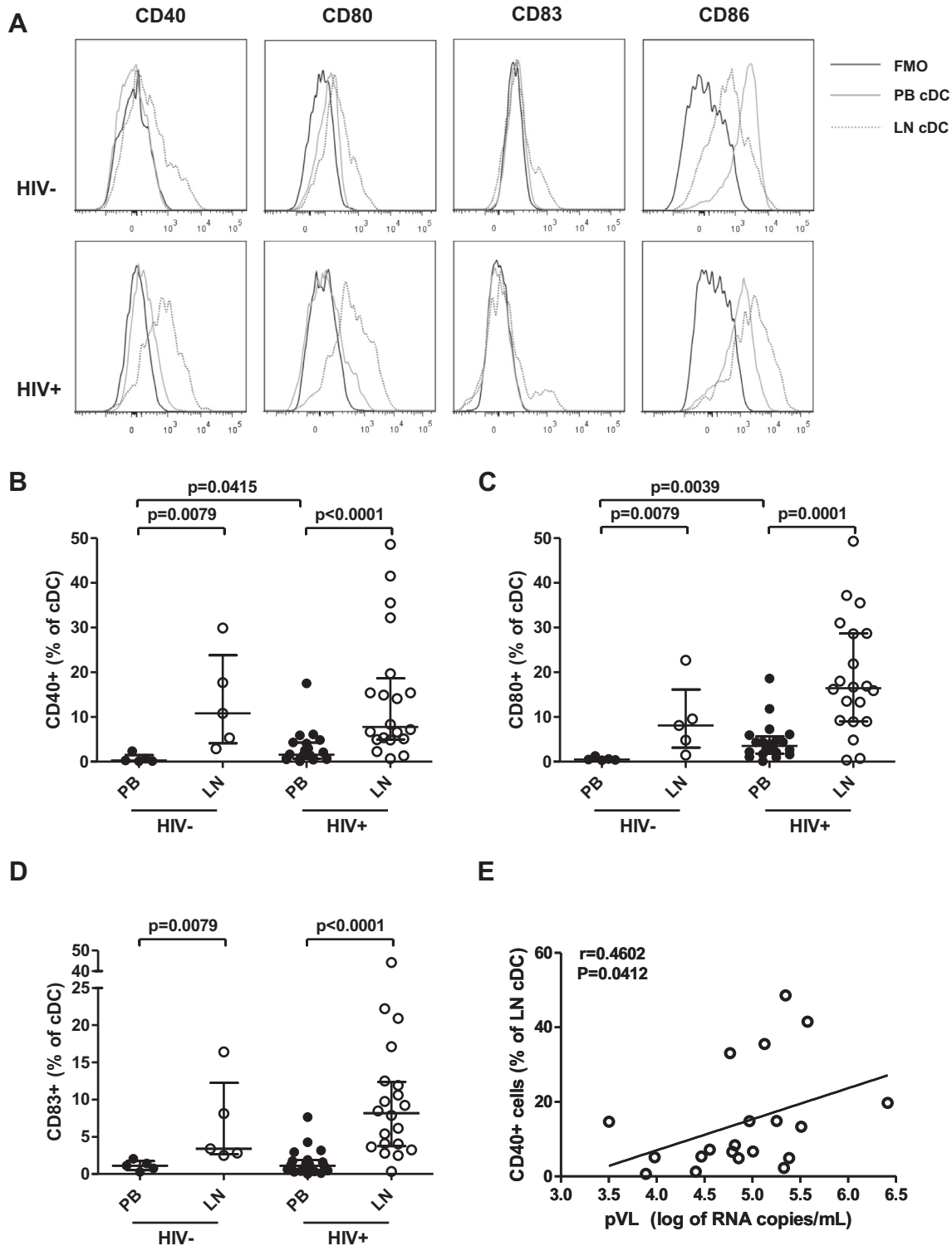


Fig. 3. Expression of activation and co-stimulatory proteins in cDC within freshly isolated peripheral blood and lymph nodes. **A.** Representative histograms of CD40, CD80, CD83 and CD86 expression from FMO controls (black line), PB cDC (gray line) and LN cDC (dotted line). **B.** Frequency of CD40⁺ cDC in the PB and LN from HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **C.** Frequency of CD80⁺ cDC in the PB and LN from HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **D.** Frequency of CD83⁺ cDC in the PB and LN from HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **E.** Plasma viral load (pVL) positively correlated with the percentage of CD40⁺ cDC. The frequency and geometric mean of fluorescence intensity (GMFI) was determined using the fluorescence minus one (FMO) control for each fluorescent antibody. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney *U* test for comparisons between groups or sample compartments and the Spearman correlation test was performed for correlations. A *p* value less than 0.05 was considered significant. PB = peripheral blood, LN = lymph node.

HIV-infected individuals, after TLR stimulation (Fig. 5A). Surprisingly, in the unstimulated condition, we observed a higher frequency of IL-12⁺ cDC and TNF- α ⁺ cDC from LN of HIV⁺ individuals compared to PB cDC ($p=0.003$ for IL-12 and

$p=0.0039$ for TNF- α , Fig. 5C and D respectively). Suggesting that LN cDC in basal conditions produce inflammatory cytokines possibly due to the inflammatory environment found in the LN of HIV⁺ individuals. Additionally, when stimulated with LPS, we

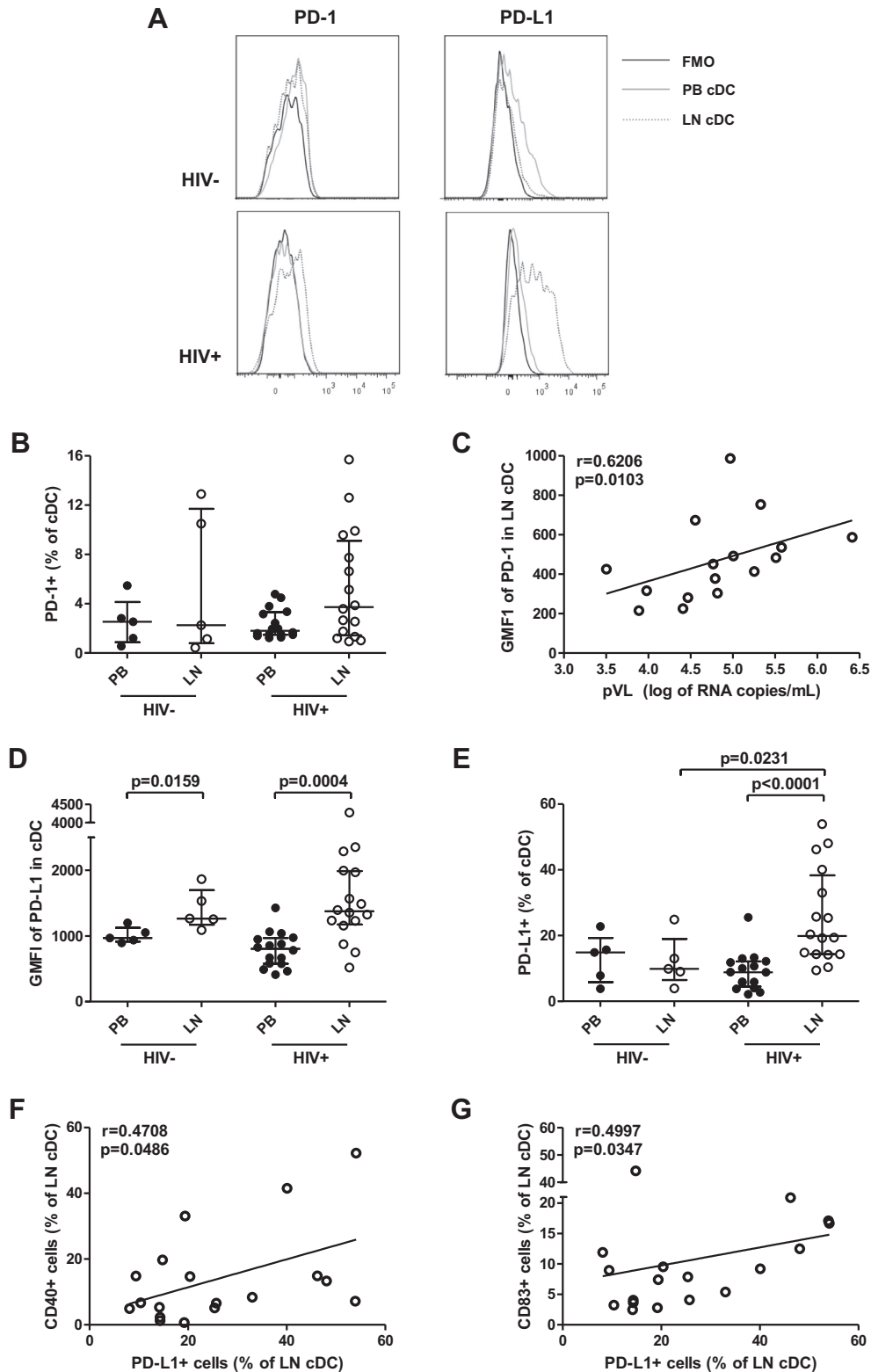


Fig. 4. Expression of co-inhibitory proteins PD-1 and PD-L1 in cDC within freshly isolated peripheral blood and lymph nodes. **A.** Representative histograms of PD-1 and PD-L1 expression from FMO controls (black line), PB cDC (gray line) and LN cDC (dotted line). **B.** Frequency of PD-1⁺ cDC in the PB and LN from HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **C.** Plasma viral load (pVL) positively correlated with PD-1 GMFI of LN cDC. **D.** Expression (GMFI) of PD-L1 in cDC from the PB and LN of HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **E.** Frequency of PD-L1⁺ cDC in the PB and LN from HIV⁻ and HIV⁺ individuals. **F.** Positive correlation between the percentage of CD40⁺ and PD-L1⁺ cDC. **G.** Positive correlation between the percentage of CD83⁺ and PD-L1⁺ cDC. The frequency and geometric mean of fluorescence intensity (GMFI) was determined using the fluorescence minus one (FMO) control for each fluorescent antibody. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney *U* test for comparisons between groups or sample compartments and the Spearman correlation test was performed for correlations. A *p* value less than 0.05 was considered significant. PB = peripheral blood, LN = lymph node.

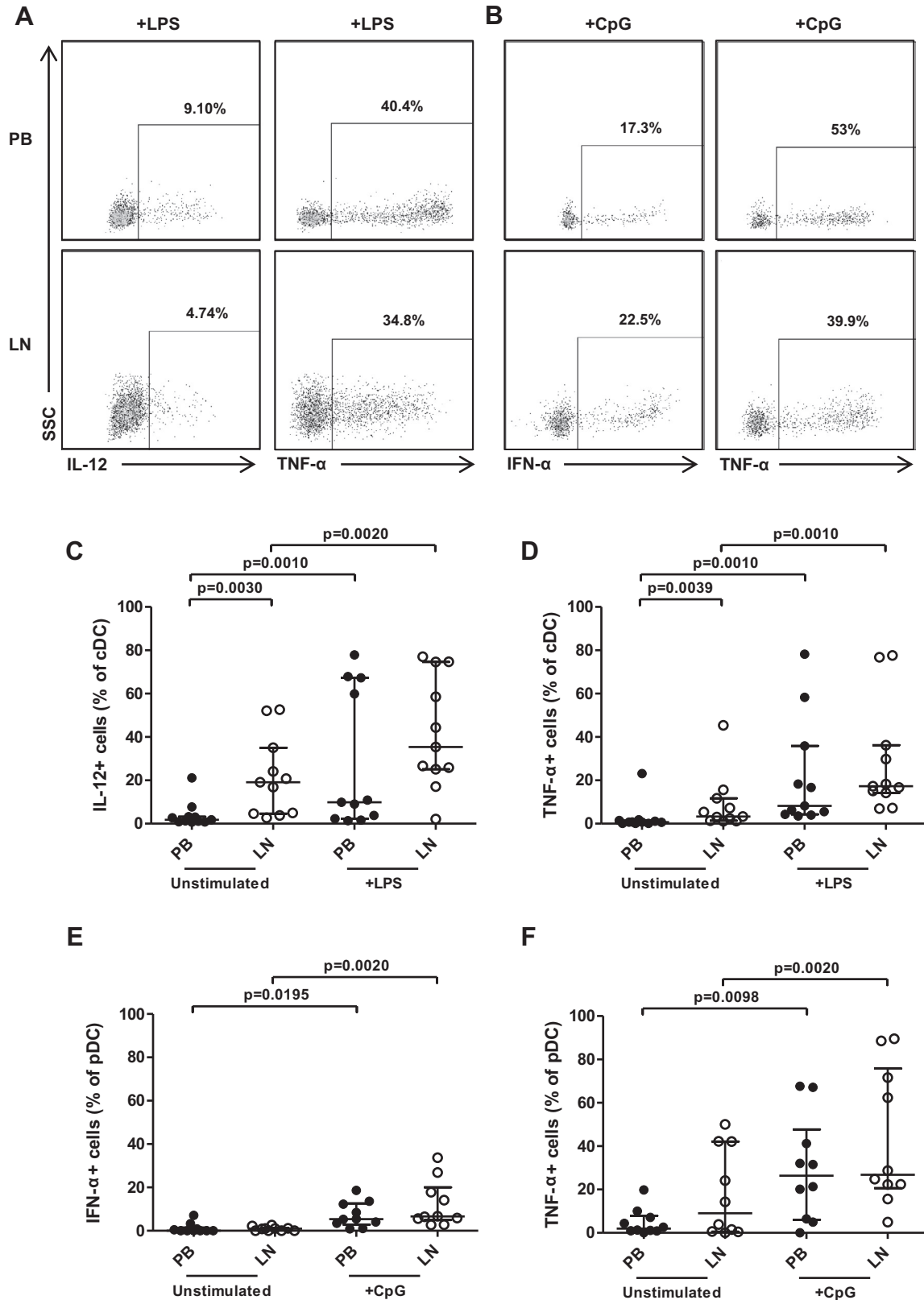


Fig. 5. Cytokine production by cDC and pDC from HIV-infected individuals. **A.** Representative dot plots of cDC from PB (upper dot plots) and LN (lower dot plots) producing IL-12 and TNF- α after TLR-4 stimulation with LPS. **B.** Representative dot plots of pDC from PB (upper dot plots) and LN (lower dot plots) producing IFN- α and TNF- α after TLR-9 stimulation with CpG. **C.** Frequency of IL-12⁺ cDC from the PB and LN of HIV+ individuals after cell stimulation with LPS and non-stimulated cells. **D.** Frequency of TNF- α ⁺ cDC from the PB and LN of HIV+ individuals after cell stimulation with LPS and non-stimulated cells. **E.** Frequency of IFN- α ⁺ pDC from the PB and LN of HIV+ individuals after cell stimulation with CpG and non-stimulated cells. **F.** Frequency of TNF- α ⁺ pDC from the PB and LN of HIV+ individuals after cell stimulation with CpG and non-stimulated cells. Statistical analysis was performed using the Mann Whitney *U* test for comparisons between sample compartments and Wilcoxon rank sum test for comparisons between non-stimulated and stimulated conditions. A *p* value less than 0.05 was considered significant. PB = peripheral blood, LN = lymph node.

found a significant increase of IL-12⁺ cDC and of TNF- α ⁺ cDC from PB compared to unstimulated cells ($p = 0.0010$ for IL-12 and TNF- α , Fig. 5C and D respectively). A similar increase was observed in LN cDC stimulated with LPS, compared to non-stimulated cells ($p = 0.0020$ for IL-12 and $p = 0.0010$ for TNF- α , Fig. 5C and D respectively). We also found that pDC produced IFN- α only after CpG stimulation. We observed a significant increase of IFN- α ⁺ pDC or TNF- α ⁺ pDC from PB after stimulation with CpG compared to non-stimulated cells ($p = 0.0195$ for IFN- α and $p = 0.0098$ for TNF- α , Fig. 5E and F respectively). A similar increase was observed in LN pDC that were stimulated with CpG, compared to non-stimulated cells ($p = 0.0020$ for IFN- α and TNF- α , Fig. 5E and F respectively).

4. Discussion

Secondary lymphoid organs such as LN are the predominant sites for the initiation of the immune response by providing a microenvironment that allows immune cells to interact. LN represents anatomical sites where T and B cell responses are induced and regulated [28]. More importantly, critical events during HIV infection occur in the LN. The lymphoid tissue compartment is the anatomical site where the virus is produced and stored [20]. Dendritic cells need to be mobilized to sites where they can induce either tolerance or protective immunity [4,29]. The pattern of DC trafficking is different between cDC and pDC; pDC tend to accumulate in the tissues where inflammatory signals are generated [30]. Other DC either stay in the LN in an immature state unless they receive adequate signals to mature [30]. In this study, we observed that the frequency of PB pDC from HIV⁺ subjects is reduced, whereas their frequency in the LN is increased, suggesting that PB pDC could be re-distributed to the LN. The accumulation of pDC in the LN has been demonstrated in NHP models of SIV infection [31,32] and in human LN [8,14]. Moreover, it has been previously demonstrated that pDC from HIV⁺ individuals increase the expression of homing receptors to LN such as CCR7 and CD62L [14]. Although pDC have been extensively studied in the context of HIV infection, little is known regarding cDC during HIV infection. The decrease frequency of cDC in the PB of the HIV⁺ group has been previously reported [7,9,33]. It has been suggested in NHP models that the decrease observed is related either to an increase in apoptosis or to a redistribution to the LN [34]. In this study, we observed a decrease in cDC frequency in the PB and in LN of HIV⁺ individuals, though we did not observe an increase in Annexin V⁺ cDC at the time point assessed. It is possible that cDC redistribute to LN in HIV⁺ individuals in early phase of infection, as it has been reported that the migratory ability of cDC is not affected [8].

Because the interaction between DC and Tc occurs mainly in the LN [28], we thus attempted to describe the phenotypic characteristics of LN DC relative to those from PB DC. As expected, we observed a higher frequency of pDC and cDC expressing activation markers such CD40 and CD83 in the LN of the HIV⁺ individuals in accordance with the mature phenotype observed in LN DC. Although there are controversial reports about the phenotype and functionality of LN cDC during HIV infection [8,14,18], our results suggest that cDC can express co-stimulatory proteins and produce IL-12 and TNF- α after TLR stimulation once they reach the LN. Interestingly, the observed correlation between the frequencies of pDC or cDC expressing CD40 with the pVL, suggests that the increase of CD40⁺ pDC and cDC in the LN might be related to the inflammation induced by the high levels of virions observed in HIV⁺ individuals [20]. Moreover, we observed that pDC stimulated with CpG were able to produce TNF- α and IFN- α ; while cDC produce IL-12 and TNF- α after stimulation. The produced inflammatory cytokines by activated pDC and cDC in LN may

contribute to the chronic inflammation observed during HIV infection [14]. In conjunction, these results demonstrated that LN cDC and pDC from HIV-infected individuals are activated and mature.

We also measured the expression of the co-inhibitory proteins PD-1 and PD-L1, as the balance of co-stimulatory and co-inhibitory signals influence the final outcome of Tc activation. The co-inhibitory protein PD-1 is mainly expressed on activated Tc and is overexpressed in Tc of HIV⁺, HCV⁺ and HBV⁺ individuals [35–38]. This protein can be transferred between Tc and DC during the immunologic synapse by a process called trogocytosis [39], thus PD-1 expression found in cDC might reflect the interaction that occurred between Tc and cDC in the LN of HIV-infected individuals. Detailed experiments need to be done to evaluate this.

PD-L1 overexpression in DC has been observed in PB of HIV⁺ [40] and in HCV⁺ individuals [16,41] and is associated with disease progression [42]. Consistent with a report in the NHP model [43] we demonstrated an increase of PD-L1⁺ cDC in the LN of HIV⁺ individuals. Also, the increased PD-L1⁺ cDC in the LN of the HIV⁺ group could be the result of CD40 interaction with its ligand on Tc because CD40-CD40L interaction induces the expression of PD-L1 on cDC during the maturation process [44]. Moreover, the positive correlation found between the frequency of CD83⁺ or CD40⁺ cDC with PD-L1⁺ cDC might be a reflection of the pro-inflammatory microenvironment due to the high viral load in the LN of HIV⁺ individuals. When PD-1 on Tc binds to its ligand PD-L1 expressed on cDC, the activation of Tc in the LN is regulated in a negative fashion [1]. Then, the increase in PD-L1⁺ cDC may contribute to the pathogenesis of HIV infection, suppressing the specific immune responses against the virus and promoting the disease progression. PD-L1 in conjunction with IL-10 promotes the exhaustion of CD8⁺ Tc during persistent viral infections [19], and functional properties of immunogenic DC might change to tolerogenic properties through the mediation of PD-L1/PD-1 signaling in Tc [45].

Taken together, results demonstrate that LN DC of HIV⁺ individuals exhibited an activated phenotype and can contribute to the inflammatory microenvironment that might affect the activation of Tc in the LN. On the one hand pDC not only produce IFN- α but also TNF- α , and on the other, cDC produce IL-12 and TNF- α but also increase the expression of PD-L1. These findings not only help to understand the mechanism of DC dysfunction in HIV infection but also may have an important impact on the use of blockade antibodies against PD-1 and PD-L1 as an alternative therapy to rescue Tc from exhaustion [22]. The results presented here might have implications for DC-based immunotherapies, as the LN is the site where Tc priming occurs.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

PMDRE conceived and directed the project. YAT performed biopsies and helped in patient recruitment to the protocol. PC and PMDRE designed the experiments. PC and DDR performed experiments and analyzed data. GRT and PMDRE contributed reagents/materials/analysis tools. PC, PMDRE, and GRT wrote the paper.

Acknowledgements

Authors thank all patients of the Mexican cohort for their participation in this study. This work was funded by the Mexican Government (Comisión de Equidad y Género de la H. Cámara de Diputados), Fundación México Vivo, and Consejo Nacional de

Ciencia y Tecnología (CONACyT, Project No. 134511). Paloma Carranza had a scholarship provided by CONACyT (Scholarship No. 289270). This paper constitutes a partial fulfillment in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. We want to thank Carolina Demeneghi, Israel Molina, Raymundo González, and Silvia del Arenal, for collection of blood samples; Ramón Hernández, for viral load, and Edna Rodríguez and Mario Preciado, for CD4⁺ Tc count assays; Zeidy Arenas, Sandra Zamora, Eduardo López, Berenice Cancino, and Jannete Balladares, for their administrative support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2016.05.019>.

References

- [1] C. Reis e Sousa, Dendritic cells in a mature age, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 476–483.
- [2] A.T. Satpathy, X. Wu, J.C. Albring, K.M. Murphy, Re(de)fining the dendritic cell lineage, *Nat. Immunol.* 13 (2012) 1145–1154.
- [3] A. Dzionek, A. Fuchs, P. Schmidt, S. Cremer, M. Zysk, S. Miltenyi, et al., BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood, *J. Immunol.* 165 (2000) 6037–6046.
- [4] J. Banchereau, E. Klechevsky, N. Schmitt, R. Morita, K. Palucka, H. Ueno, Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1174 (2009) 24–32.
- [5] J. Tel, A.M. van der Leun, C.G. Figdor, R. Torensma, I.J. de Vries, Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs, *Cancer Immunol. Immunother.* 61 (2012) 1279–1288.
- [6] E. Segura, J. Valladeau-Guilemond, M.H. Donnadieu, X. Sastre-Garau, V. Soumelis, S. Amigorena, Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes, *J. Exp. Med.* 209 (2012) 653–660.
- [7] M.A. Barron, N. Blyveis, B.E. Palmer, S. MaWhinney, C.C. Wilson, Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals, *J. Infect. Dis.* 187 (2003) 26–37.
- [8] S.M. Dillon, K.B. Robertson, S.C. Pan, S. Mawhinney, A.L. Meditz, J.M. Folkvord, et al., Plasmacytoid and myeloid dendritic cells with a partial activation phenotype accumulate in lymphoid tissue during asymptomatic chronic HIV-1 infection, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 48 (2008) 1–12.
- [9] R.L. Sabado, M. O'Brien, A. Subedi, L. Qin, N. Hu, E. Taylor, et al., Evidence of dysregulation of dendritic cells in primary HIV infection, *Blood* 116 (2010) 3839–3852.
- [10] M.S. Killian, S.H. Fujimura, F.M. Hecht, J.A. Levy, Similar changes in plasmacytoid dendritic cell and CD4 T-cell counts during primary HIV-1 infection and treatment, *AIDS* 20 (2006) 1247–1252.
- [11] C. Lehmann, J.M. Harper, D. Taubert, P. Hartmann, G. Fatkenheuer, N. Jung, et al., Increased interferon alpha expression in circulating plasmacytoid dendritic cells of HIV-1-infected patients, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 48 (2008) 522–530.
- [12] Z. Fan, X.L. Huang, P. Kalinski, S. Young, C.R. Rinaldo Jr., Dendritic cell function during chronic hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 infection, *Clin. Vaccine Immunol.* 14 (2007) 1127–1137.
- [13] L. Fantuzzi, C. Purificato, K. Donato, F. Belardelli, S. Gessani, Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis, *J. Virol.* 78 (2004) 9763–9772.
- [14] C. Lehmann, M. Lafferty, A. Garzino-Demo, N. Jung, P. Hartmann, G. Fatkenheuer, et al., Plasmacytoid dendritic cells accumulate and secrete interferon alpha in lymph nodes of HIV-1 patients, *PLoS ONE* 5 (2010) e11110.
- [15] R. Planes, L. BenMohamed, K. Leghmar, P. Delobel, J. Izopet, E. Bahraoui, HIV-1 tat protein induces PD-L1 (B7-H1) expression on dendritic cells through tumor necrosis factor alpha- and toll-like receptor 4-mediated mechanisms, *J. Virol.* 88 (2014) 6672–6689.
- [16] H. Fouad, M.S. Raziky, R.A. Aziz, D. Sabry, G.M. Aziz, M. Ewais, et al., Dendritic cell co-stimulatory and co-inhibitory markers in chronic HCV: an Egyptian study, *World J. Gastroenterol.* 19 (2013) 7711–7718.
- [17] H.H. Sun, D.F. Zhou, J.Y. Zhou, The role of DCs in the immunopathogenesis of chronic HBV infection and the methods of inducing DCs maturation, *J. Med. Virol.* 88 (2016) 13–20.
- [18] G. Alter, D. Kavanagh, S. Rihn, R. Luteijn, D. Brooks, M. Oldstone, et al., IL-10 induces aberrant deletion of dendritic cells by natural killer cells in the context of HIV infection, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 1905–1913.
- [19] D.G. Brooks, S.J. Ha, H. Elsaesser, A.H. Sharpe, G.J. Freeman, M.B. Oldstone, IL-10 and PD-L1 operate through distinct pathways to suppress T-cell activity during persistent viral infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (2008) 20428–20433.
- [20] G. Pantaleo, C. Graziosi, A.S. Fauci, The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection, *AIDS* 7 (Suppl. 1) (1993) S19–S23.
- [21] M. Zeng, A.J. Smith, S.W. Wietgreffe, P.J. Southern, T.W. Schacker, C.S. Reilly, et al., Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 998–1008.
- [22] B. Dai, L. Xiao, P.D. Bryson, J. Fang, P. Wang, PD-1/PD-L1 blockade can enhance HIV-1 Gag-specific T cell immunity elicited by dendritic cell-directed lentiviral vaccines, *Mol. Ther.* 20 (2012) 1800–1809.
- [23] D.E. Campbell, N.B. Tustin, E. Riedel, R. Tustin 3rd, J. Taylor, J. Murray, et al., Cryopreservation decreases receptor PD-1 and ligand PD-L1 coinhibitory expression on peripheral blood mononuclear cell-derived T cells and monocytes, *Clin. Vaccine Immunol.* 16 (2009) 1648–1653.
- [24] R. Camacho-Sandoval, P.M. Del Rio Estrada, A. Rivero-Arrieta, G. Reyes-Teran, L.C. Bonifaz, Differential partial activation phenotype and production of tumour necrosis factor-alpha by conventional dendritic cells in response to lipopolysaccharide in HIV+ viraemic subjects and HIV+ controllers, *Clin. Exp. Immunol.* 178 (2014) 489–503.
- [25] G. Pantaleo, C. Graziosi, J.F. Demarest, O.J. Cohen, M. Vaccarezza, K. Gantt, et al., Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection, *Immunol. Rev.* 140 (1994) 105–130.
- [26] H. Haenssle, T. Buhl, S. Knudsen, U. Krueger, A. Rosenberger, K. Reich, et al., CD40 ligation during dendritic cell maturation reduces cell death and prevents interleukin-10-induced regression to macrophage-like monocytes, *Exp. Dermatol.* 17 (2008) 177–187.
- [27] S. Yao, S. Wang, Y. Zhu, L. Luo, G. Zhu, S. Flies, et al., PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection, *Blood* 113 (2009) 5811–5818.
- [28] M. Buettner, U. Bode, Lymph node dissection-understanding the immunological function of lymph nodes, *Clin. Exp. Immunol.* 169 (2012) 205–212.
- [29] J. Banchereau, R.M. Steinman, Dendritic cells and the control of immunity, *Nature* 392 (1998) 245–252.
- [30] D. Alvarez, E.H. Vollmann, U.H. von Andrian, Mechanisms and consequences of dendritic cell migration, *Immunity* 29 (2008) 325–342.
- [31] K.N. Brown, V. Wijewardana, X. Liu, S.M. Barratt-Boyes, Rapid influx and death of plasmacytoid dendritic cells in lymph nodes mediate depletion in acute simian immunodeficiency virus infection, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000413.
- [32] B. Malleret, B. Maneglier, I. Karlsson, P. Lebon, M. Nascimbene, L. Perie, et al., Primary infection with simian immunodeficiency virus: plasmacytoid dendritic cell homing to lymph nodes, type I interferon, and immune suppression, *Blood* 112 (2008) 4598–4608.
- [33] Y. Jiao, X. Sun, X. Huang, W. Li, T. Zhang, H. Wu, Compare mDCs and pDCs between two distinct patients groups in acute HIV-1 infection, *AIDS Res. Ther.* 11 (2014) 22.
- [34] V. Wijewardana, J. Kristoff, C. Xu, D. Ma, G. Haret-Richter, J.L. Stock, et al., Kinetics of myeloid dendritic cell trafficking and activation: impact on progressive, nonprogressive and controlled SIV infections, *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003600.
- [35] F. Porichis, D.E. Kaufmann, Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy, *Curr. HIV/AIDS Rep.* 9 (2012) 81–90.
- [36] B. Raziorrouh, M. Heeg, P. Kurktschiew, W. Schraut, R. Zachoval, C. Wendtner, et al., Inhibitory phenotype of HBV-specific CD4+ T-cells is characterized by high PD-1 expression but absent coregulation of multiple inhibitory molecules, *PLoS ONE* 9 (2014) e105703.
- [37] B. Saha, M.C. Choudhary, S.K. Sarin, Expression of inhibitory markers is increased on effector memory T cells during hepatitis C virus/HIV coinfection as compared to hepatitis C virus or HIV monoinfection, *AIDS* 27 (2013) 2191–2200.
- [38] W. Xiao, L.F. Jiang, X.Z. Deng, D.Y. Zhu, J.P. Pei, M.L. Xu, et al., PD-1/PD-L1 signal pathway participates in HCV F protein-induced T cell dysfunction in chronic HCV infection, *Immunol. Res.* (2015).
- [39] M. Dhainaut, M. Moser, Regulation of immune reactivity by intercellular transfer, *Front. Immunol.* 5 (2014) 112.
- [40] X. Wang, Z. Zhang, S. Zhang, J. Fu, J. Yao, Y. Jiao, et al., B7-H1 up-regulation impairs myeloid DC and correlates with disease progression in chronic HIV-1 infection, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 3226–3236.
- [41] T. Shen, X. Chen, Y. Chen, Q. Xu, F. Lu, S. Liu, Increased PD-L1 expression and PD-L1/CD86 ratio on dendritic cells were associated with impaired dendritic cells function in HCV infection, *J. Med. Virol.* 82 (2010) 1152–1159.
- [42] D. Trabattoni, M. Saresella, M. Biasin, A. Boasso, L. Piacentini, P. Ferrante, et al., B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression, *Blood* 101 (2003) 2514–2520.
- [43] H. Xu, X. Wang, B. Pahar, T. Moroney-Rasmussen, X. Alvarez, A.A. Lackner, et al., Increased B7-H1 expression on dendritic cells correlates with programmed death 1 expression on T cells in simian immunodeficiency virus-infected macaques and may contribute to T cell dysfunction and disease progression, *J. Immunol.* 185 (2010) 7340–7348.
- [44] M. Hubo, B. Trinschek, F. Kryczanowsky, A. Tuettgenberg, K. Steinbrink, H. Jonuleit, Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells, *Front. Immunol.* 4 (2013) 82.
- [45] Y.J. Kim, S.J. Park, H.E. Broxmeyer, Phagocytosis, a potential mechanism for myeloid-derived suppressor cell regulation of CD8+ T cell function mediated through programmed cell death-1 and programmed cell death-1 ligand interaction, *J. Immunol.* 187 (2011) 2291–2301.