

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

► Paula María Cooke^{1a*}, Cinthya Caula^{1a}, Miguel Ángel Orsilles^{2a}

¹ Doctora en Bioquímica. Bioquímica. Farmacéutica.

² Doctor en Ciencias Químicas. Bioquímico.

^a Universidad Católica de Córdoba, Unidad Asociada al CONICET, Área de Ciencias Agrarias, Ingeniería, Ciencias Biológicas y de la Salud. Córdoba. Argentina.

* Autora para correspondencia.

Resumen

En los últimos años se ha determinado que los neutrófilos son células altamente versátiles y sofisticadas, cuyas funciones van mucho más allá de la eliminación de los microorganismos. En la infección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV), si bien el papel de los neutrófilos no está totalmente caracterizado, actualmente está claro que la relación entre los neutrófilos y el virus es mucho más compleja de lo que se pensaba. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar en pacientes con infección asintomática, y sin tratamiento antirretroviral, el efecto de la infección por el HIV sobre la muerte celular de los neutrófilos y la expresión de receptores de superficie. En pacientes seropositivos sin tratamiento hubo un aumento de la apoptosis temprana de los neutrófilos en relación a los grupos controles. Esta apoptosis aumentada no depende de la activación de la vía extrínseca o intrínseca. En estos pacientes hubo un aumento de la expresión de TLR2 que, unido al aumento de la apoptosis temprana, podría ser indicativo de un fenotipo activado de los neutrófilos. En conclusión, este trabajo aporta información sobre aspectos relacionados con la apoptosis de los neutrófilos en estadios tempranos de la infección por HIV, contribuyendo así a una mayor comprensión acerca del efecto de este virus sobre componentes de la respuesta inmune innata.

Palabras clave: HIV; Neutrófilos; Apoptosis; Infección asintomática

Neutrophil apoptosis in asymptomatic Human Immunodeficiency Virus infection

Abstract

In recent years it has been determined that neutrophils are highly versatile and sophisticated cells whose functions go far beyond the elimination of microorganisms. In Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection, the role of neutrophils is not fully characterized but it is now clear that the relationship between neutrophils and HIV is much more complex than previously thought. The aims of this study were to evaluate the effect of HIV infection on neutrophil cell death and the expression of surface molecules on neutrophils in patients with asymptomatic infection and without antiretroviral treatment (ART). In HIV seropositive patients without antiretroviral therapy there was an

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

increase in the early apoptosis of neutrophils in relation to the control groups. This increased apoptosis does not depend on the activation of the extrinsic or intrinsic pathway. In these patients there was an increase in the expression of TLR2 which, together with the increase of early apoptosis, could be indicative of an activated phenotype of neutrophils. In conclusion, this study provides information on aspects related to the apoptosis of neutrophils in early stages of HIV infection and therefore contributes to a better understanding of the effect of this virus on components of the innate immune response.

Keywords: HIV; Neutrophils; Apoptosis; Asymptomatic infection

Apoptose de neutrófilos na infecção assintomática pelo Vírus de Imunodeficiência Humana

Resumo

Nos últimos anos, determinou-se que os neutrófilos são células altamente versáteis e sofisticadas, cujas funções vão muito além da eliminação dos microrganismos. Na infecção pelo HIV, embora o papel dos neutrófilos não esteja totalmente caracterizado, atualmente fica bem claro que a relação entre os neutrófilos e o vírus é muito mais complexa do que se pensava anteriormente. Os objetivos deste trabalho foram avaliar em pacientes com infecção assintomática, e sem tratamento antirretroviral, o efeito da infecção pelo HIV na morte celular dos neutrófilos e a expressão de receptores de superfície. Nos pacientes soropositivos sem tratamento, houve um aumento da apoptose precoce dos neutrófilos em relação aos grupos controle. Esta apoptose aumentada não depende da ativação da via extrínseca ou intrínseca. Nestes pacientes, houve um aumento da expressão de TLR2 que, juntamente com o aumento da apoptose precoce, poderia ser indicativo de um fenótipo ativado dos neutrófilos. Em conclusão, este trabalho fornece informações sobre aspectos relacionados com a apoptose dos neutrófilos em estágios precoces da infecção pelo HIV, contribuindo desse modo para uma maior compreensão sobre o efeito deste vírus nos componentes da resposta imune inata.

Palavras-chave: HIV; Neutrófilos; Apoptose; Infecção assintomática

Introducción

Los neutrófilos constituyen la población celular predominante del sistema inmune innato y tradicionalmente representaron la primera línea de defensa del organismo frente a lesiones e infecciones bacterianas y micóticas (1). Sin embargo, además de esta función, en los últimos años se ha demostrado que los neutrófilos son un componente del circuito regulatorio y efector del sistema inmune innato y adaptativo (2). Estas células abundan en las mucosas oral, genital e intestinal inflamadas (3) y también en los ganglios linfáticos de los pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV), lo que sugiere la importancia del estudio de la relación entre este virus y los neutrófilos (4).

El papel de los neutrófilos en la infección por HIV no está totalmente caracterizado, sin embargo, actualmente está claro que la relación entre los neutrófilos y el HIV es mucho más compleja de lo que se pensaba. El HIV tiene la capacidad de unirse a los neutrófilos debido a que estas células poseen un alto nivel de expresión del correceptor de este virus, el receptor de quimiocinas CXCR4 (5), además de un amplio repertorio de receptores de superficie capaces de reconocer otras clases de macromoléculas (6). Por otro lado, los estímulos inflamatorios por infeccio-

nes concomitantes aumentan la capacidad de unión del HIV a los neutrófilos. Esta unión afecta a casi todas las funciones de estas células (quimiotaxis, fagocitosis, estallido respiratorio y muerte de microorganismos), particularmente en los estadios avanzados de la infección, y la función anormal de los neutrófilos podría predisponer a una mayor susceptibilidad a desarrollar infecciones bacterianas y/o infecciones oportunistas (7) (8).

El HIV cuenta con diversas estrategias para activar la apoptosis en células infectadas y no infectadas, induciendo así la muerte de células efectoras del sistema inmune (4). La contribución de la apoptosis en la progresión de la infección ha sido documentada en varios modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, la muerte celular acelerada activada por el virus o sus componentes es considerada como clave en la declinación progresiva de las células del sistema inmune, lo que conduce a la disfunción no sólo de los elementos de la inmunidad adquirida, sino también a una parte importante de componentes de la inmunidad innata (9). Aunque la inmunidad antiviral ha sido clásicamente estudiada en términos de la respuesta inmune adaptativa, existen muchas pruebas que sugieren que la inmunidad innata juega un papel muy importante desde las etapas tempranas de la infección (10).

Por lo mencionado anteriormente, el objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto de la infección por HIV sobre neutrófilos, determinando el nivel de apoptosis y la expresión de receptores de superficie, en pacientes con infección por HIV que cumplimentaban los siguientes criterios de inclusión: infección asintomática, sin previas manifestaciones clínicas o eventos asociados a SIDA, sin coinfección con otros agentes virales, sin tratamiento antirretroviral (TAR) al momento de la evaluación y sin compromiso inmunológico o con un compromiso moderado.

Materiales y Métodos

Pacientes y controles

Grupo de estudio

Se estudiaron 38 pacientes con infección asintomática por HIV y sin TAR de ambos sexos (23 mujeres y 15 varones; edad: 19 a 54 años) provenientes de la población de pacientes atendidos en el Hospital Rawson de la ciudad de Córdoba, con serología previa negativa según evaluación clínica y epidemiológica realizada por los médicos. El diagnóstico de la infección se realizó mediante la técnica de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) para detectar anticuerpos y se confirmó con la técnica de *Western blot* (11). El período medio de la seroconversión fue de 12 meses.

La inclusión de los pacientes se realizó a través de un muestreo no probabilístico discriminado. En todos los pacientes, un médico infectólogo realizó el examen clínico que, junto con el nivel de LT-CD4⁺, permitió determinar el estadio de la infección.

Control negativo

El grupo control negativo fue el grupo de personas sanas o sin infección, constituido por 40 individuos de ambos sexos (20 mujeres y 20 varones) dadores de sangre, de entre 18 y 58 años provenientes del Banco de Sangre del Instituto de Hematología y Hemoterapia de la Universidad Nacional de Córdoba con serología negativa para VHB, VHC, HTLV1 y 2, HIV 1 y 2, Chagas, sífilis y brucelosis.

Control positivo

El grupo control positivo estuvo constituido por 40 pacientes con infección asintomática por el HIV (13 mujeres y 27 varones, edad: 28 a 58 años) y con TAR consistente en la administración de dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos asociados a un inhibidor de la integrasa o un inhibidor de la

transcriptasa inversa no nucleósido o un inhibidor de la proteasa potenciado. El período medio del TAR fue de 56 meses (1 a 156 meses) y todos los pacientes tenían una carga viral indetectable.

Los pacientes firmaron el consentimiento escrito de participación en el trabajo, de acuerdo con el protocolo aprobado por el Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud (CIEIS Polo Hospitalario de la Provincia de Córdoba).

Muestras biológicas

Suero, plasma, sangre entera anticoagulada con EDTA-K₃ (DVS), neutrófilos aislados de sangre periférica mediante un gradiente de densidad sobre Ficoll-Hypaque (*Sigma-Aldrich*, San Luis, Estados Unidos) (12) y posterior sedimentación en Dextrán (*Sigma-Aldrich*, San Luis, Estados Unidos) al 6%.

Métodos

Hemograma

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

Cuantificación de linfocitos T (LT)-CD4⁺ y LT-CD8⁺

La cuantificación de linfocitos T (LT)-CD4⁺ y LT-CD8⁺ se realizó en sangre entera anticoagulada con EDTA-K₃ con marcación con 4 fluorocromos *BD multi-test* en tubos *Trucount CD3/CD8/CD45/CD4* (*BD Bioscience FITC, PE, PerCP, APC*, respectivamente,) en plataforma única en un citómetro de flujo *FacsCalibur* (*Becton Dickinson Argentina SRL*) con *software MultiSET V2.2*.

Carga viral

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

Estudios citomorfológicos del proceso de muerte celular por apoptosis

Se realizó coloración con May-Grünwald Giemsa de neutrófilos aislados y de sangre entera. Las improntas se observaron en microscopio de luz visible con un aumento de 100x (*Primo Star, Karl Zeiss®*, Alemania) y las

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

Translocación de la fosfatidilserina por citometría de flujo

Se utilizó un equipo comercial (*BD Pharmingen*TM, San José, CA, Estados Unidos) en el cual la anexina V está conjugada con ficoeritrina (PE). La detección de apoptosis se realizó en neutrófilos aislados y en sangre entera siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células positivas con anexina V y negativas con 7-AAD se consideraron apoptóticas tempranas. Se realizaron controles de células sin marcar, células con monomarca de cada monoclonal, células incubadas con anticuerpos monoclonales irrelevantes del mismo isotipo conjugados con los fluorocromos correspondientes y células control positivo de apoptosis. Se adquirieron 100.000 eventos en cada muestra en un citómetro de flujo *FACScan Canto II* (Becton Dickinson Argentina SRL). La población de neutrófilos fue identificada por sus propiedades físicas: tamaño celular (FSC, del inglés *Forward Scatter*) y granularidad o complejidad citoplasmática (SSC, del inglés *Side Scatter*) confirmada marcando la región alrededor de la población CD11b⁺-APC (*BD Bioscience*). De la población de neutrófilos así seleccionada (20.000 a 50.000 eventos) se evaluó el nivel de apoptosis mediante la detección de anexina V-PE (con un filtro de excitación para 585 nm y otro de emisión de 578 nm) y de 7-AAD (con un filtro de excitación para 670 nm y otro de emisión de 675 nm). Para cuantificar la apoptosis de los neutrófilos, se determinó el porcentaje de células marcadas positivas para anexina V-PE y la intensidad media de fluorescencia (IMF). El análisis de los datos se realizó utilizando el *software FlowJo 5.7.2* (*Tree Star, Inc.*).

Actividad de caspasa-8 y caspasa-9 por Western blot

Brevemente, se obtuvieron los extractos proteicos a partir de 1×10^6 neutrófilos con *buffer* Laemmli 1X. La concentración de proteínas de las muestras se cuantificó utilizando el reactivo de Bradford (*Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos*). La absorbancia se midió a 595 nm en el lector de placas *MultiPlate Reader* (*Bio-Rad*). Posteriormente, las proteínas fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (13). Una vez concluida la separación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 10 cm x 10 cm (Tecnolab S.A), de 0,45 μ m de tamaño de poro en un equipo de transferencia (*Bio-Rad*). A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario anticaspasa-8 o anticaspasa-9 (*Cell Signaling Technology*[®]) en una dilución 1:1.000 en solución de bloqueo, a temperatura ambiente durante 60 minutos en agitador de balanceo.

Luego de realizar tres lavados con TBST, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante diluido 1/2.000 en solución de bloqueo, durante 60 minutos a temperatura ambiente en agitador. Finalmente, las membranas se lavaron tres veces con TBST y la detección se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL con el *kit ECLTM Western Blotting Detection Reagents* (*Amersham Pharmacia, Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido*) y la impresión se realizó en una película de autorradiografía (*Agfa Curix RP2 Plus, Agfa HealthCare Argentina*), que se reveló en el equipo *Agfa Curix 60*.

Ensayo de caspasa-3 activa

Este ensayo fue realizado en muestras de 1×10^6 células con un equipo comercial (*PE Active Caspase-3 Apoptosis Kit, BD Pharmingen*TM) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo *FACScan Canto II Becton Dickinson*, con la adquisición de 50.000 eventos. El análisis de los datos se realizó utilizando el *software FlowJo 5.7.2* (*Tree Star, Inc.*).

Expresión de los receptores de superficie TLR2 y CD95

La expresión de estos receptores de superficie en neutrófilos fue determinada por citometría de flujo a partir de muestras de sangre entera. Para la marcación de CD95 se utilizó el anticuerpo anti-CD95-FITC (*BD Pharmingen*TM) y para TLR2, el anti-CD282 (*AlexaFluo*[®]488, *BD Pharmingen*TM). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo *FACScan Canto II Becton Dickinson* y se adquirieron 50.000 eventos. El análisis de los datos se realizó utilizando el *software FlowJo 5.7.2* (*Tree Star, Inc., Ashland, OR, Estados Unidos*).

Análisis estadístico

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

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

Resultados

En el grupo de estudio se incluyeron 38 pacientes con infección asintomática por HIV sin TAR al momento de la evaluación. Previamente, ninguno presentó manifestaciones clínicas o eventos asociados a SIDA, ni coinfección con otros agentes virales. Los pacientes fueron categorizados según el sistema de clasificación de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta, Estados Unidos, del año 2014 (14).

Las características clínicas e inmunológicas de los distintos grupos incluidos se muestran en la Tabla I.

Evaluación del nivel de apoptosis de neutrófilos

La anexina V es una proteína de 35-36 kDa que se une con alta afinidad a la fosfatidilserina en presencia de Ca^{2+} , lo que posibilita identificar células apoptóticas mediante la incubación de las células con anexina V unida a ficoeritrina (PE). De esta manera se puede detectar apoptosis en estadios más tempranos que en otros ensayos basados en los cambios que experimenta el núcleo de la célula, como la fragmentación del ADN y se evidencia

antes que se produzca la pérdida de la integridad de la membrana en las etapas finales de muerte de la célula, ya sea por apoptosis o necrosis (15). La pérdida de la integridad estructural de la membrana plasmática, característica distintiva de la necrosis, representa la etapa final en la que una célula no puede mantener su identidad independiente de la del entorno. Bioquímicamente, puede manifestarse por entrada a la célula de colorantes vitales como 7-amino-actinomicina (7-AAD). Por lo tanto, mediante esta doble marcación se pueden diferenciar por citometría de flujo: células viables (anexina V⁻/7-AAD⁻), células en apoptosis temprana (anexina V⁺/7-AAD⁻), células en apoptosis tardía (anexina V⁺/7-AAD⁺) y células necróticas (anexina V⁻/7-AAD⁺).

En pacientes HIV seropositivos asintomáticos y sin TAR, el nivel de apoptosis total de neutrófilos de sangre circulante fue significativamente mayor al detectado en neutrófilos de los grupos controles ($8,73 \pm 2,15\%$ vs. pacientes con TAR: $5,10 \pm 2,13\%$ y controles sanos: $0,97 \pm 1,02\%$, $p < 0,05$, respectivamente). No hubo diferencias significativas entre los niveles de apoptosis obtenidos en muestras de sangre entera y en neutrófilos aislados. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de anexina V-PE unida a los neutrófilos, mostró un aumento significativo en pacientes HIV seropositivos sin TAR, respecto a pacientes con infección por HIV con TAR y controles no infectados (Fig. 1). Se determinó que el mayor nivel de apoptosis ocurría durante la etapa temprana de este proceso (Tabla II).

Las características citomorfológicas de la apoptosis de los neutrófilos fueron observadas mediante microscopía óptica observándose el clásico encogimiento celular, la membrana celular intacta, condensación de la cromatina y presencia de cuerpos apoptóticos.

Tabla I. Características de controles sanos y pacientes con infección por HIV asintomáticos sin y con TAR.

	Controles sanos	Pacientes HIV sin TAR	Pacientes HIV con TAR
Edad	33 (26-43)	36 (28-46)	43 (33-48)
Mujeres (n)	20	23	13
Varones (n)	20	15	27
Detección de la seroconversión (meses)	-----	12 (4-24)	58 (26-114) *
Inicio del tratamiento (meses)	-----	-----	56 (18-134)
Linfocitos %	52 (35-58)	24 (18-34)	26 (19-31)
TCD4+ (/ μ L)	734 (512-1.230)	538 (414-659)	485 (356-627)
Linfocitos (%)	29 (22-34)	49 (42-56)	51 (38-67)
TCD8+ (/ μ L)	498 (359-521)	1.101 (752-1.499)	775 (637-1.444)
Relación CD4+/CD8+	1,74 (1,57-1,72)	0,52 (0,34-0,73)	0,49 (0,31-0,82)
Carga viral (copias/mL)	-----	11.725 (4.936-36.012)	50 (10-52) *
Carga viral (\log_{10} HIV ARN)	-----	4,0 (3,7-4,6)	<1,7 *

Valores expresados en mediana (rango intercuartil).

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

Tabla II. Nivel de apoptosis de neutrófilos de pacientes HIV seropositivos sin TAR y controles en las distintas etapas del proceso de muerte.

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

Valores expresados en porcentajes como media±DE.

* $p < 0,01$ respecto a control sano obtenido mediante la prueba *t* de Student.

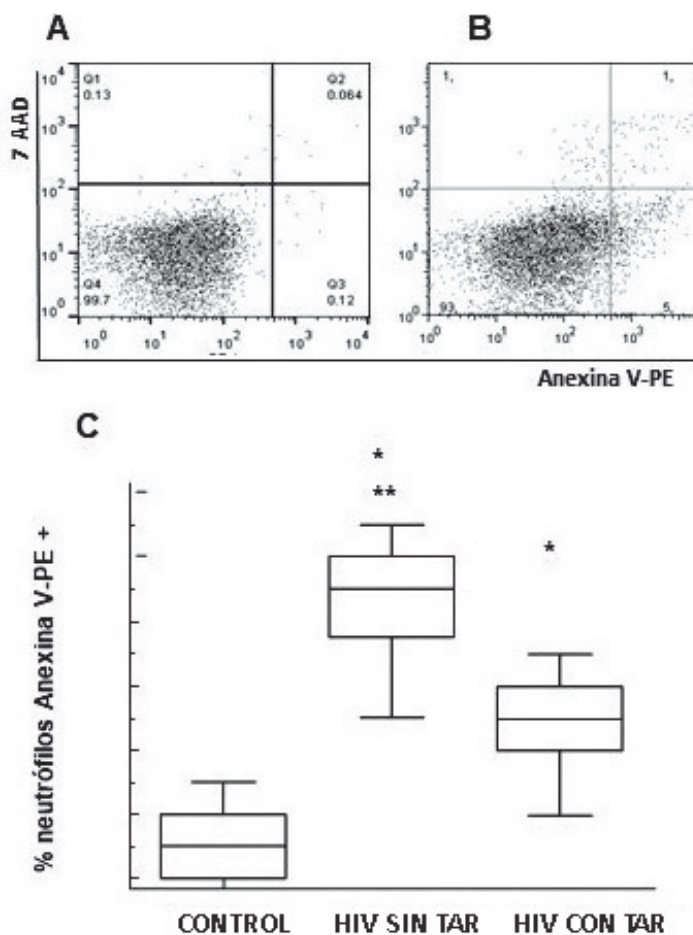


Figura 1. Apoptosis de neutrófilos de pacientes HIV seropositivos.

Translocación de la fosfatidilserina mediante marcación con anexina V-PE y 7-AAD en (A) un control sin infección y (B) en un paciente HIV seropositivo asintomático sin TAR. (C) Porcentaje de apoptosis de neutrófilos de pacientes HIV seropositivos y controles no infectados: las cajas representan la mediana y los rangos intercuartiles y las barras de error, los valores mínimo y máximo * $p < 0,0001$ respecto a controles sanos; ** $p < 0,05$ respecto a pacientes HIV con TAR. Valores de *p* obtenidos con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (*test* de comparación múltiple de Dunn).

Actividad de caspasas

Con el fin de valorar la expresión de las caspasas iniciadoras de la vía extrínseca e intrínseca, se analizó la expresión de caspasa-8 y caspasa-9, respectivamente. Tanto en neutrófilos de pacientes HIV seropositivos sin TAR como de pacientes con TAR, en los *immunoblots* solamente se observó la expresión de la proforma de caspasas-8 y -9 (o forma entera) sin expresión de las proformas clivadas (Fig. 2). Estos hallazgos sugieren una posible falta de activación de las vías intrínseca o extrínseca en el proceso de muerte celular de los neutrófilos de pacientes sin TAR, lo que debería ser confirmado en estudios posteriores utilizando otras metodologías.

En base a los resultados anteriores, se procedió a determinar, por citometría de flujo, si había activación de la caspasa-3, ya que es una proteasa clave en la muerte celu-

lar por apoptosis que es activada durante los estadios tempranos del proceso. En los neutrófilos de pacientes con infección asintomática por HIV sin TAR se evidenció un aumento de la actividad de caspasa-3 respecto a controles sanos y a pacientes con infección por HIV tratados (Fig. 3). El porcentaje de neutrófilos con caspasa-3 activa fue significativamente mayor en pacientes sin TAR respecto a pacientes con TAR e individuos sanos ($6,00 \pm 3,16\%$ vs. $2,0 \pm 1,33\%$ y $0,57 \pm 0,85\%$, respectivamente, $p < 0,05$).

Relación entre apoptosis, carga viral y compromiso inmunológico

Mediante un análisis de correlación se estudió el grado de asociación entre apoptosis, carga viral y compromiso inmunológico. No hubo correlación entre apoptosis

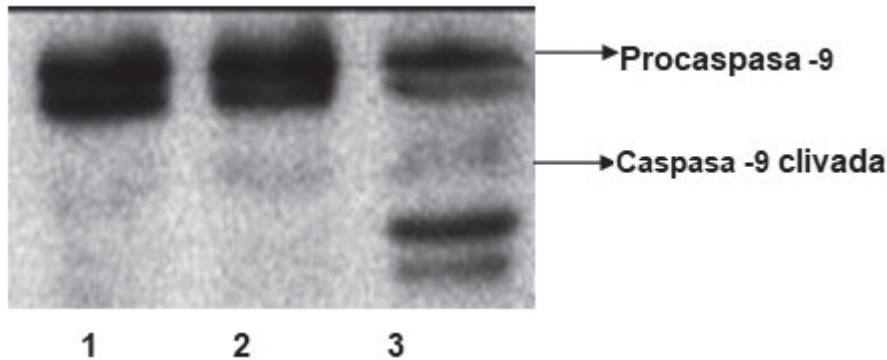


Figura 2. Análisis de caspasa-9 por Western blot.

Setenta microgramos de proteínas totales, obtenidos del lisado de neutrófilos, fueron separados en un gel de poliacrilamida-SDS y marcados con un anticuerpo monoclonal anticaspasa-9. 1) Neutrófilos de control sano, 2) Neutrófilos de un paciente con infección por HIV sin TAR, 3) Neutrófilos sometidos a cambios de temperatura.

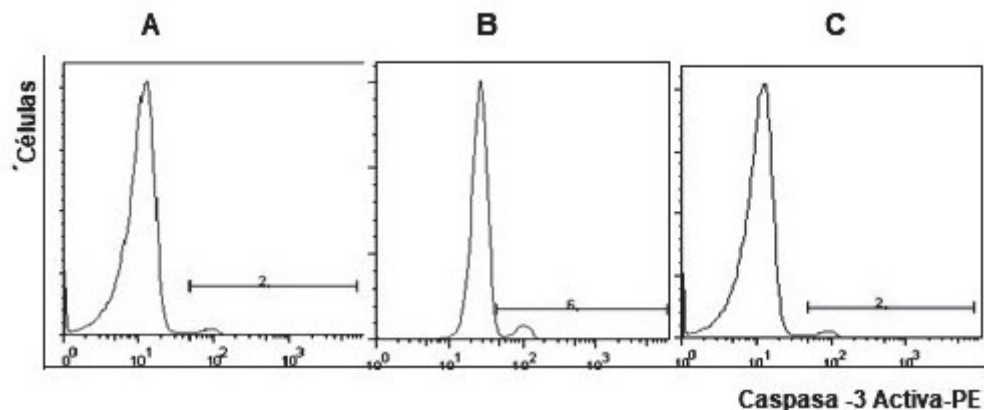


Figura 3. Actividad de caspasa-3.

Los parámetros se representan en escala lineal para el número de células y escala logarítmica para caspasa-3 Activa-PE. Se señala la población de neutrófilos con marcación positiva para caspasa-3-Activa en los tres grupos: controles sanos (A), pacientes HIV sin TAR (B) y pacientes HIV con TAR (C).

temprana y niveles de LT-CD4⁺ ($r=-0,28$; $p=0,47$) ni con la carga viral ($r=0,10$; $p=0,79$). Sin embargo, el hecho que en los pacientes HIV seropositivos con TAR los niveles de neutrófilos muertos por apoptosis temprana descendieran significativamente, sugiere que el aumento de apoptosis en los pacientes HIV sin TAR podría estar relacionado con los niveles más altos de carga viral que éstos presentan.

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

Expresión de los receptores de superficie TLR2 y CD95

Con el fin de evaluar la participación de los receptores TLR2 (16), (17) y CD95 (18) (19) (20) como posibles inhibidores o inductores, respectivamente, de la apoptosis de neutrófilos, se analizó el nivel de su expresión en pacientes HIV seropositivos respecto a controles sanos. En pacientes con infección por HIV sin TAR se detectó un aumento significativo del porcentaje medio de neutrófilos que expresan TLR2 respecto a controles sanos (media \pm DE = $96,80 \pm 1,81\%$ vs. $92,90 \pm 1,81\%$; $p < 0,05$). Los porcentajes medios de expresión de TLR2 fueron similares en pacientes sin y con TAR ($96,8 \pm 1,81\%$ y $95,90 \pm 2,75\%$, respectivamente). Por otro lado, cuando se evaluó el número de moléculas de TLR2 en los neutrófilos, se detectó en pacientes HIV

sin TAR, una mayor intensidad media de fluorescencia TLR2-Alexa Flour® 488 (IMF \pm DE = $10,89 \pm 1,17$) que en los controles sanos (IMF \pm DE = $10,89 \pm 2,75$) y menor que en los pacientes HIV con TAR (IMF \pm DE = $14,81 \pm 8,03$), aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 4).

Con respecto a la expresión de CD95, en pacientes HIV sin TAR, el porcentaje de neutrófilos que expresaron este antígeno (media \pm DE = $98,60\% \pm 1,10$) y la cantidad de moléculas (IMF \pm DE = $10,60 \pm 2,20$) fueron similares a los de los controles sin infección (media \pm DE = $98,80\% \pm 0,4$; IMF \pm DE = $10,80 \pm 1,90$) y superiores a los niveles expresados en pacientes HIV con TAR (media \pm DE = $95,90\% \pm 4,50$; IMF \pm DE = $8,70 \pm 2,30$), pero en ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas (Fig. 5).

No hubo correlaciones entre la expresión de estos receptores y el estado inmunológico y virológico de los pacientes sin TAR.

Discusión y Conclusiones

Los estudios previos de apoptosis de neutrófilos en individuos infectados con HIV han informado un aumento de este tipo de muerte celular aunque incluyeron un escaso número de individuos, principalmente en estadios avanzados de la infección, con un sistema inmunológico muy comprometido y con cargas virales muy disímiles (21) (22). Por estos motivos, se decidió abordar el estudio de la apoptosis de neutrófilos en la infección por HIV teniendo en consideración los siguientes criterios: infección asintomática, sin previas

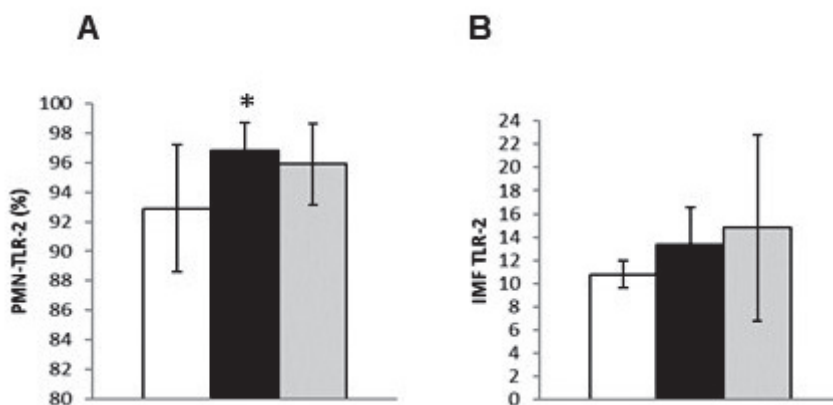


Figura 4. Niveles de expresión de TLR2 en neutrófilos de sangre periférica de pacientes HIV seropositivos sin TAR.

A) Porcentaje de neutrófilos que expresan TLR2. B) Intensidad media de fluorescencia de TLR2- Alexa Flour® 488 en neutrófilos. Las barras representan: controles sanos (blanco), pacientes HIV sin TAR (negro) y pacientes HIV con TAR (gris). Valores expresados como media \pm DE. * $p < 0,05$ obtenida con el *test* no paramétrico de Kruskal-Wallis (prueba de comparación múltiple de Dunn).

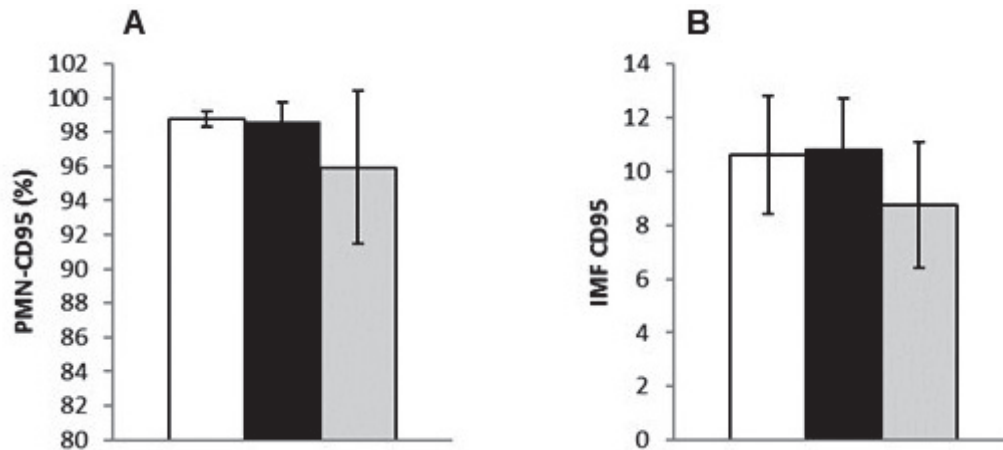


Figura 5. Niveles de expresión de CD95 en neutrófilos de sangre periférica de pacientes con infección por HIV sin TAR.

A) Porcentaje de neutrófilos que expresan CD95. B) Intensidad media de fluorescencia de CD95-FITC en neutrófilos. Las barras representan: controles sanos (blanco), pacientes HIV sin TAR (negro) y pacientes HIV con TAR (gris). Valores expresados como media \pm DE.

manifestaciones clínicas o eventos asociados a SIDA, sin coinfección con otros agentes virales, sin TAR al momento de la evaluación y sin compromiso inmunológico o con un compromiso moderado.

El Comité de Nomenclatura sobre la Muerte Celular (23) ha propuesto que la clasificación y caracterización de los distintos tipos de muerte celular deberían basarse únicamente en criterios morfológicos, porque no siempre existe una correspondencia clara entre los cambios ultraestructurales y las características bioquímicas de la muerte celular (24). Considerando estos conceptos, se incluyeron técnicas complementarias, basadas tanto en las características morfológicas como en las bioquímicas, ya que ninguna puede hacerlo por sí sola (15). Si bien puede considerarse que la técnica de May-Grünwald Giemsa consume mucho tiempo y depende del operador, es una técnica de microscopía óptica clásica para la identificación de los parámetros tempranos relacionados a la muerte celular, como es la condensación de la cromatina. Sin embargo, algunos autores creen que podría llegar a subestimar el porcentaje de apoptosis debido a que en las etapas tempranas del proceso no se suelen identificar cambios morfológicos severos (25).

En otros estudios, como el de Pitrak *et al.* (21), realizado en individuos infectados con HIV, se determinó un aumento de la apoptosis de neutrófilos de pacientes con SIDA (<200 LT-CD4⁺/ μ L), siendo éste un defecto intrínseco y no un efecto de factores séricos endógenos (21). Resultados similares fueron informados por Mastroianni *et al.* (22) en pacientes con SIDA antes de iniciar el TAR con inhibidores de la proteasa y por Salmen *et al.*, en pacientes con infección asintomática pero con recuentos de LT-CD4⁺/ μ L ≥ 200 (26). Por otro lado,

Elbim *et al.* (27) quienes trabajaron con el modelo de primates con macacos *Rhesus* infectados con Virus de la Inmunodeficiencia Simiana (VIS) demostraron una exacerbación de la apoptosis temprana de neutrófilos en la fase aguda de la infección, coincidente con el pico de replicación viral. Estos autores postularon que la muerte temprana incrementada puede tener relación con la disminución de neutrófilos circulantes que ocurre en la etapa inicial de la infección por el VIS, lo que tendría importantes implicancias en la replicación viral y en la progresión de la enfermedad.

El aumento de la apoptosis de los neutrófilos de los pacientes con infección asintomática por HIV sin TAR, podría justificar el valor absoluto disminuido de neutrófilos hallados en este trabajo, respecto a controles sanos y pacientes HIV seropositivos con TAR. La relación entre aumento de apoptosis y neutropenia ha sido documentada por varios autores (25) (28) (29), quienes han reportado que el aumento de la apoptosis de neutrófilos podría explicar, en parte, la neutropenia observada cuando los pacientes son diagnosticados con SIDA (28). En este trabajo se demostró una disminución del número absoluto de neutrófilos desde los estadios iniciales de la infección, o sea desde la etapa asintomática, y que podrían condicionar la instauración de infecciones oportunistas y ser responsables de alguna de las manifestaciones clínicas iniciales.

La apoptosis de los neutrófilos comparte numerosas similitudes con la de otros tipos celulares, pero también exhibe características distintas en la ejecución del programa de muerte (30). El mecanismo molecular de la apoptosis es muy complejo y puede implicar la activación de distintas caspasas (cisteín-proteasas) que intervienen en la iniciación, propagación y ejecución

de la apoptosis (31). En relación a la participación de las caspasas en la muerte por apoptosis de neutrófilos, se evidenció un aumento significativo de la actividad de caspasa-3 en los pacientes HIV asintomáticos sin TAR, respecto de controles sanos y pacientes HIV con TAR. Sin embargo, no se encontró activación de caspasa-8 (caspasa iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis) ni de la caspasa-9 (iniciadora de la vía intrínseca). Estos resultados indican que la apoptosis de los neutrófilos de pacientes con infección asintomática por HIV y con un corto tiempo de seroconversión (12 meses), podría no ser dependiente de la activación de la vía extrínseca o intrínseca, lo que debería ser confirmado con metodologías adicionales. La apoptosis de neutrófilos aumentada que se demostró en este trabajo, sin activación de caspasas-8 y -9, sugiere otros mecanismos de inducción de esta muerte celular que podrían activarse durante el curso de la infección. Estos resultados coinciden en parte con lo demostrado por Salmen *et al.* (32) quienes informaron que en la infección crónica por HIV, con un tiempo medio de seroconversión de 67,9 meses, la apoptosis espontánea de neutrófilos es dependiente de caspasa-3, pero independiente de caspasa-8, lo que sugiere que la vía intrínseca estaría involucrada en esta muerte celular. Por su parte, Anita *et al.* (24) afirmaron que la apoptosis puede ser independiente de caspasas. Si bien se ha demostrado que la activación de caspasas es esencial en la apoptosis inducida por ligandos, aún no está claro si lo es en la apoptosis espontánea de neutrófilos. Existen discrepancias en los resultados obtenidos en la evaluación de caspasas y en los niveles de apoptosis, debido quizás a las diferentes muestras de donde se obtuvieron los neutrófilos, a los métodos utilizados para purificarlos, a las técnicas empleadas para medir apoptosis, al tiempo transcurrido en el procesamiento de las muestras y/o a la fuente de obtención y a la concentración de inhibidores de caspasas utilizados en los ensayos para inhibir la apoptosis (33).

Entre otros mecanismos propuestos acerca de la apoptosis de neutrófilos en pacientes HIV sin TAR, Lichtner *et al.* (34) demostraron que la apoptosis de neutrófilos de pacientes con SIDA está mediada por calpaínas. Por lo expuesto, aún no han sido totalmente dilucidados los mecanismos involucrados en la apoptosis de neutrófilos en pacientes con infección por HIV. Por lo tanto, los hallazgos realizados en este trabajo permiten delinear futuros estudios para evaluar vías de activación de la apoptosis en neutrófilos en etapas tempranas de la infección por HIV.

Si bien no hubo correlación entre apoptosis, niveles de LT-CD4⁺ y carga viral, el hecho que en los pacientes HIV seropositivos con TAR los niveles de neutrófilos muertos por apoptosis temprana desciendan significativamente, sugiere que el aumento de apoptosis en los pacientes sin TAR podría estar relacionado con la replicación viral.

Pitrak *et al.* (21) y Salmen *et al.* (26) (29) demostraron que en la infección por HIV, la mayor muerte espontánea de los neutrófilos no se correlaciona con los niveles de carga viral ni con el número de LT-CD4⁺. Por otro lado, Elbim *et al.* (35) observaron que en primates el aumento temprano de muerte de los neutrófilos, en la fase aguda de la infección por VIS, coincidía con el pico de la replicación viral y que el nivel de neutrófilos muertos era mayor en los primates que progresaron más rápido a la etapa SIDA, coincidiendo con la neutropenia.

En la infección por HIV el rol de los Receptores de Reconocimiento de Patrones (RRP), incluyendo los TLR, aún no ha sido aclarado; poco se sabe acerca de la expresión y funcionamiento de los TLR en la respuesta mediada por neutrófilos expuestos al HIV (36). El trabajo publicado por Giraldo *et al.* (37), quizás sea el primero en demostrar *in vitro* la expresión y funcionamiento de los TLR de neutrófilos expuestos al HIV, lo que sugiere una posible interacción neutrófilo/HIV a través de TLR. Asimismo, estos autores informaron una disminución de la expresión génica de TLR2 en neutrófilos de individuos sanos estimulados con HIV *in vitro*. Seguidamente, Hernández *et al.* (38) publicaron los resultados de sus investigaciones sobre el nivel de expresión génica de RRP y la producción de citoquinas luego de la activación de neutrófilos de pacientes HIV seropositivos, individuos seronegativos expuestos al HIV y controles sanos. TLR2 (39) y TLR4 son los principales TLR que participan, aunque de distintas maneras, en la regulación de la supervivencia de los neutrófilos (40). Hernández *et al.* (38) hallaron una disminución significativa de la IMF de expresión de TLR2 en la superficie de neutrófilos de nueve pacientes infectados con HIV (4 pacientes sin TAR y 5 pacientes con TAR), respecto de controles sanos, pero no informaron la expresión en porcentaje de neutrófilos. Algunos autores sugieren que el HIV puede desarrollar estrategias para evadir la respuesta inmune innata dependiente de TLR o regular la expresión de TLR para aumentar la diseminación viral, como se ha observado con otros virus (41). Respecto a la relación entre TLR y supervivencia o muerte de los neutrófilos, Sabroe *et al.* (40) reportaron que TLR2 y TLR4 serían los principales reguladores.

A nuestro conocimiento, el presente trabajo sería el primer estudio en medir la expresión de TLR2 en la superficie de los neutrófilos en sangre de 38 pacientes con infección por HIV asintomática sin TAR y 40 con TAR, analizados por separado. En los neutrófilos de pacientes con infección por HIV sin TAR, sin ningún otro estímulo, se observó aumento de expresión de TLR2, alteración de la expresión de moléculas de superficie y aumento de la apoptosis temprana. Esto estaría indicando que en estos pacientes, el HIV podría estar regulando la expresión de TLR2, como así también su función, induciendo el fenotipo activado de los neutrófilos y ejerciendo un efecto muy bajo o nulo para evitar la apoptosis temprana.

Dado que la apoptosis de neutrófilos puede ser inducida mediante la activación de CD95 por entrecruzamiento con anticuerpos anti-Fas o mediante la interacción con FasL, éste fue uno de los mecanismos originariamente propuesto para explicar la apoptosis constitutiva de los neutrófilos (26). Los neutrófilos de individuos sanos expresan constitutivamente el receptor CD95/Fas/ApoI que al activarse es capaz de mediar la apoptosis de varias células. Nuestros resultados respecto a los niveles expresión de CD95 (en porcentaje de neutrófilos e IMF) en pacientes HIV sin TAR, concuerdan con lo informado por Salmen *et al.* (26), quienes encontraron niveles basales altos de expresión constitutiva de CD95 en neutrófilos de pacientes con infección por HIV asintomática y en controles sanos. No encontraron diferencias de expresión de CD95, en porcentaje y en densidad, entre pacientes HIV asintomáticos y controles sanos.

La importancia biológica del sistema Fas/FasL (42) ha sido ampliamente documentada en la apoptosis de linfocitos T, ya que intervienen en la eliminación de células autorreactivas y activando el suicidio inducido. Sin embargo, en la infección por HIV, los mecanismos intracelulares que conducen a la muerte de neutrófilos por apoptosis espontánea o inducida por Fas/FasL, no han sido totalmente definidos. Si bien parecen ser diferentes, no puede descartarse la posibilidad de que ambas ocurran simultáneamente, contribuyendo a la neutropenia y al desarrollo de infecciones secundarias con la evolución de la enfermedad (19).

En conclusión, estos resultados que son parte de un trabajo de tesis doctoral (43), indican que desde los estadios iniciales de la infección por HIV hay un aumento de la apoptosis temprana de neutrófilos, con activación de caspasa-3, que se relaciona con la disminución del número absoluto de neutrófilos. Este hecho podría condicionar la instauración de infecciones oportunistas y ser responsable de algunas manifestaciones clínicas iniciales. Asimismo, el aumento de la expresión de TLR2, unido a la alteración de la expresión de moléculas de superficie y al aumento de la apoptosis temprana, podría ser indicativo de un fenotipo activado de los neutrófilos. Una mayor comprensión acerca de cómo la infección por HIV impacta en la inmunidad innata, en particular en los neutrófilos, resulta de gran importancia debido a que podría contribuir al desarrollo de nuevas medidas profilácticas y estrategias que complementen y sinergicen el abordaje terapéutico de esta infección centrado en la restitución de la respuesta adaptativa (9).

Agradecimientos

Los autores agradecen a las Dras. Paula Abadie y Pilar Crespo del CIBICI, Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, quienes asistieron en la realización de los estudios por citometría de flujo.

Fuente de financiación

Secretaría de Investigación y Vinculación Tecnológica, Universidad Católica de Córdoba.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dra. PAULA MARÍA COOKE
Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Católica de Córdoba
Avenida Armada Argentina 3555
(X5016DHK) CÓRDOBA, Argentina
Tel: (54) 351 4938000
Correo electrónico: paulamcooke@gmail.com

Referencias bibliográficas

1. Kruger P, Saffarzadeh M, Weber ANR, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, *et al.* Neutrophils: between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* 2015; 11 (3): 1-23.
2. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011; 11 (8): 519-31.
3. Somsouk M, Estes JD, Deleage C, Dunham RM, Albright R, Inadomi JM, *et al.* Gut epithelial barrier and systemic inflammation during chronic HIV infection AIDS 2015; 29 (1): 43-5.
4. Moir S, Chun T-W, Fauci AS. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* 2011; 6 (1): 223-48.
5. Förster R, Kremmer E, Schubel A, Breitfeld D, Kleinschmidt A, Nerl C, *et al.* Intracellular and surface expression of the HIV-1 coreceptor CXCR4/fusin on various leukocyte subsets: rapid internalization and recycling upon activation. *J Immunol* 1998; 160 (3): 1.522-31.
6. Gordon S. Pathogen recognition or homeostasis? APC receptor functions in innate immunity. *C R Biol* 2004; 327 (6): 603-7.
7. Pitrak DL. Neutrophil deficiency and dysfunction in HIV-infected patients. *Am J Health Syst Pharm* 1999; 56 (suppl 5): S9-16.
8. Pitrak DL, Bak PM, DeMarais P, Novak RM, Andersen BR. Depressed neutrophil superoxide production in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993; 167 (6): 1.406-10.
9. Borrow P, Shattock RJ, Vyakarnam A. Innate immunity against HIV: a priority target for HIV prevention research. *Retrovirology* 2010; 7 (84): 1-17.
10. Salmen S, Guillermo C, Colmenraes M, Barboza L, Goncalves L, Terán G. Papel del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en la apoptosis de leucocitos de pacientes infectados. *Invest Clin* 2005; 46 (3): 289-305.
11. Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detec-

- tion with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112 (2): 195-203.
12. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97: 77-89.
 13. Roland JT. Laemmli Sample Buffer- 20 mL. [internet] www.Cytographica.com. 2007.
 14. Selik RM, Mokotoff ED, Branson B, Owen SM, Whitmore S, Hall HI. Revised surveillance case definition for HIV infection - United States, 2014. *Centers Dis Control Prev MMWR Recomm Reports* 2014; 63 (RR-03): 1-10.
 15. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1.093-107.
 16. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med* 2007; 39 (4): 421-38.
 17. Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011; 34 (5): 637-50.
 18. Liles WC, Kiener PA, Ledbetter JA, Aruffo A, Klebanoff SJ. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J Exp Med* 1996; 184 (2): 429-40.
 19. Yan J, Zapata JC, Pauza CD, Salvato MS. Modulation of SIV and HIV DNA vaccine immunity by Fas-FasL signaling. *Viruses* 2015; 7 (3): 1.429-53.
 20. Silvestris F, Nagata S, Cafforio P, Silvestris N, Dammacco F. Cross-linking of Fas by antibodies to a peculiar domain of gp120 V3 loop can enhance T cell apoptosis in HIV-1-infected patients. *J Exp Med* 1996; 184 (6): 2.287-300.
 21. Pitrak DL, Tsai HC, Mullane KM, Sutton SH, Stevens P. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest* 1996; 98 (12): 2.714-9.
 22. Mastroianni CM, Mengoni F, Lichtner M, D'Agostino C, D'Ettore G, Forcina G, *et al.* Ex vivo and in vitro effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors on neutrophil apoptosis. *J Infect Dis* 2000; 182: 1.536-9.
 23. Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19 (10): 107-20.
 24. Anita P, Sharma H, Paras J, Amit P. Apoptosis (programmed cell death) – A review. *World J Pharm Res* 2014; 3 (4): 1.854-72.
 25. Baldelli F, Preziosi R, Francisci D, Tascini C, Bistoni F, Nicoletti I. Programmed granulocyte neutrophil death in patients at different stages of HIV infection. *AIDS* 2000; 14 (8): 1.067-9.
 26. Salmen S, Terán G, Borges L, Goncalves L, Albarrán B, Urdaneta H, *et al.* Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 2004; 137 (1): 166-72.
 27. Elbim C, Monceaux V, François S, Hurtrel B, Gougerot-Pocidal M, Estaquier J. Increased neutrophil apoptosis in chronically SIV-infected macaques. *Retrovirology* 2009; 6 (29): 1-6.
 28. Kuritzkes DR. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with Human Immunodeficiency Virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 256-60.
 29. Salmen S, Berrueta L, Montes H. Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Rev Médica la Extensión Port* 2007; 1 (1): 29-44.
 30. Elbim C, Katsikis PD, Estaquier J. Neutrophil apoptosis during viral infections. *Open Virol J* 2009; 3: 52-9.
 31. Geering B, Simon H. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ* 2011; 18 (9): 1.457-69.
 32. Salmen S, Montes H, Soyano A, Hernández D, Berrueta L. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: Role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways. *Clin Exp Immunol* 2007; 150 (3): 539-45.
 33. Luo HR, Loison F. Constitutive neutrophil apoptosis: Mechanisms and regulation. *Am J Hematol* 2008; 83 (4): 288-95.
 34. Lichtner M, Mastroianni CM, Sauzullo I, Vullo V, Rossi R, Mengoni F. HIV protease inhibitor therapy reverses neutrophil apoptosis in AIDS patients by direct calpain inhibition. *Apoptosis* 2006; 11 (5): 781-7.
 35. Elbim C, Monceaux V, Mueller YM, Lewis MG, François S, Diop O, *et al.* Early divergence in neutrophil apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *J Immunol* 2008; 181 (12): 8.613-23.
 36. François S, El Benna J, Dang PMC, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidal MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005; 174 (6): 3.633-42.
 37. Giraldo DM, Hernandez JC, Velilla P, Urcuqui-Inchima S. HIV-1-neutrophil interactions trigger neutrophil activation and Toll-like receptor expression. *Immunol Res* 2016; 64 (1): 93-103.
 38. Hernandez JC, Giraldo DM, Paul S, Urcuqui-Inchima S. Involvement of neutrophil hyporesponse and the role of Toll-like receptors in Human Immunodeficiency Virus 1 protection. *PLoS One* 2015; 10: e0119844.
 39. Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, *et al.* Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor. *Biol Chem* 1999; 274 (47): 33.419-25.
 40. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Malcolm J, Foster SJ, Vogel SN, *et al.* Selective roles for Toll-like receptor TLR2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 2003; 170: 5.268-75.
 41. Lee RM, White MR, Hartshorn KL. Influenza A viruses upregulate neutrophil Toll-like receptor 2 expression and function. *Scand J Immunol* 2006; 63 (2): 81-9.
 42. Voss M, Lettau M, Paulsen M, Janssen O. Posttranslational regulation of Fas ligand function. *Cell Commun Signal* 2008; 6 (11): 1-12. Cooke PM. Apoptosis de neutrófilos en la infección asintomática por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana. [Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Católica de Córdoba]; 2016.

Recibido: 10 de octubre de 2019

Aceptado: 10 de marzo de 2020