

Inmunopatogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana

Siham Salmen¹, Lisbeth Berrueta¹, Henry Montes².

¹Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes Mérida, Venezuela

²CAMIULA, Universidad de Los Andes Mérida, Venezuela

Recibido Marzo 1, 2007. Aceptado Marzo 25, 2007.

IMMUNOPATHOGENESIS OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS INFECTION

Resumen

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se caracteriza por el deterioro progresivo de la respuesta inmune, asociado a una pérdida gradual numérica (mediada por muerte celular acelerada) y funcional de los elementos del sistema inmunitario, especialmente de los linfocitos T cooperadoras (T CD4+). Los linfocitos T CD4+ son el principal blanco del virus, sin embargo, en la actualidad existe gran interés por el estudio de otros elementos celulares, que se encuentran alterados y que contribuyen al deterioro del paciente. Dentro de este grupo celular se encuentran los componentes de la inmunidad innata [células dendríticas (CD), monocitos/macrófagos, células asesinas naturales (*natural killer cells*), neutrófilos polimorfonucleares], así como también los componentes solubles. Las CD residentes de las mucosas establecen el primer contacto con el virus y son las responsables de mediar la transferencia hacia los linfocitos T CD4+, mientras que los monocitos/macrófagos constituyen sitios de alojamiento, replicación y persistencia viral. Los neutrófilos no son sitios permisivos para la replicación viral, pero son afectados por el VIH, estas células presentan defectos funcionales, y en estadios avanzados los pacientes cursan con neutropenia, asociado con un incremento en la susceptibilidad para sufrir muerte espontánea de estas células. En conjunto estos defectos generados durante la infección por el VIH incrementan el riesgo a sufrir infecciones por agentes tanto intra como extracelulares, que ponen en peligro la vida de los individuos infectados por este virus. En este trabajo, se describen los mecanismos inmunopatogénicos de la infección por el VIH, haciendo especial referencia a los eventos que conducen a la muerte celular, los cuales son clave en determinar la progresión de la enfermedad hacia la fase de SIDA.

PALABRAS CLAVE: Linfocitos T CD4+; VIH; Células dendríticas; Inmunidad innata; Inmunidad adaptativa; Neutrófilos; Apoptosis.

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) infection is characterized by the progressive detriment of the immune response, associated to loss (by apoptosis) and dysfunction of key elements of the immune system, specifically T cell lymphocytes. Although these cells are the main target of the virus, a great deal of interest has recently emerged for different cellular components of the immune system, which are altered during the disease as well, contributing to disease progression. HIV also mediates a disruption of the innate immune response comprising dendritic cells (DC), monocytes/macrophages, natural killer and polymorphonuclear cells. Because DCs are located in the mucosae (including the oral and vaginal mucosal surfaces) and the lymphoid tissues, they have been proposed to be among the first cells that encounter HIV type 1 during sexual transmission, while monocytes/macrophages are one of the main viral reservoirs and contribute to viral persistence. Neutrophils have been described as dysfunctional during the course of the disease and have an increased susceptibility to undergo spontaneous cell death. HIV-mediated injury increased the risk of invasive bacterial and fungus disease, even in the era of highly active antiretroviral therapy. In this work we describe the mechanisms involved in HIV pathogenesis with special reference to mechanisms of cell death which are believed to be a key determinant of disease progression during AIDS.

KEY WORDS: TCD4 lymphocytes; HIV; Dendritic cells; Innate immunity; Adaptive immunity; Neutrophils; Apoptosis

Introducción

Se estima que 60 millones de personas en el mundo están infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). El VIH es un retrovirus, que contiene una doble hebra de ARN como material genético. Existen dos tipos de VIH: VIH-1 y VIH-2, el primero es el que se encuentra principalmente diseminado a nivel mundial, mientras que el segundo, predomina fundamentalmente en el continente africano. Filogenéticamente, el VIH-1 proviene de una subespecie de la cepa del virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), que infecta al chimpancé (*Pan troglodytes troglodytes*). La transmisión del VIH-1 puede ocurrir a través del contacto sexual íntimo (homosexual, bisexual y heterosexual), contacto con sangre o sus productos contaminados y a través de la transmisión madre-hijo (transplacentario y/o lactancia), siendo la ruta sexual la principal forma de transmisión. Durante la historia natural de la infección, el individuo cursa con una fase aguda/primaria seguida por una fase de latencia entre 3-10 años, que conduce finalmente a un colapso del sistema inmune que caracteriza al SIDA.

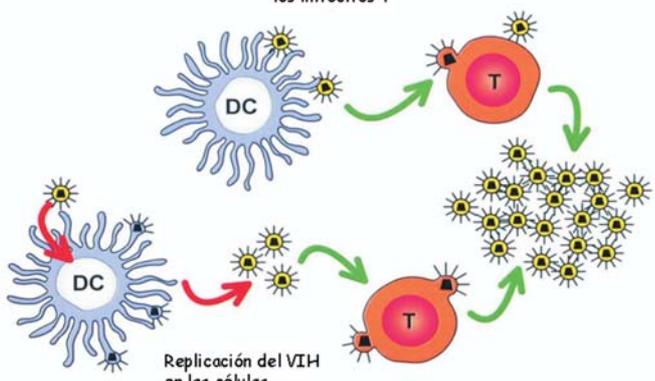
El VIH es el agente infeccioso más estudiado de la historia; desde su descripción durante los años 80, ha generado diversidad de publicaciones en todos los campos de la ciencia, estudios que han permitido entender cómo el virus infecta a la célula blanco y cuál es su ciclo de replicación, conocimientos que han hecho posible el desarrollo de estrategias terapéuticas para su control y así minimizar su diseminación. Sin embargo, a pesar de contar con la terapia anti-retroviral altamente efectiva (TAAE), no todos los individuos infectados tienen acceso a ella y en los casos de países con mayor disponibilidad de recursos, se presentan obstáculos debido a la emergencia de cepas resistentes. Paralelo a esta no siempre es efectiva, es tóxica y no elimina al virus de los reservorios, lo que ha dificultado el control de la infección. Esta revisión está orientada a describir la inmunopatogenia de la infección por el VIH y los eventos que conducen al deterioro de la respuesta inmune, condición que predispone a estos individuos a sufrir infecciones severas o al desarrollo de cáncer.

Entrada y diseminación del VIH

La infección aguda es el resultado del paso exitoso de las partículas virales a través de las células epiteliales de la mucosa vaginal o rectal, mediante un mecanismo de transporte de vesículas en células polarizadas, conocido como transitos, o al contactar directamente a las células dendríticas (CDs) intraepiteliales que emiten procesos dendríticos hacia el lumen y capturan a las partículas virales. Los virus presentes en estos fluidos pueden estar en forma de partículas virales libres o asociados a células infectadas presentes en el semen y fluido vaginal, esta última forma representa la manera más efectiva de transmisión del virus. Existen dos tipos de cepas virales, las cepas monocitotrópicas (R5) y las linfocitotrópicas (X4). Las cepas R5, representan la población viral que predomina durante la transmisión del VIH, siendo los fagocitos mononucleares (monocitos) los principales portadores del virus en el semen, fluido vaginal y secreción cervical y son los que establecen el contacto con las células epiteliales y CDs para facilitar la transmisión del virus.

Las CDs abundan en las mucosas, por lo que son las primeras células del sistema inmune que establecen contacto con el virus y son las responsables de su diseminación hacia los linfocitos T CD4+ presentes en los tejidos linfoides, convirtiéndose estas últimas posteriormente en una de los principales sitios de replicación y diseminación. El virus contiene en su superficie a la glicoproteína de 120 kDa (gp120), responsable de establecer el contacto inicial con receptores presentes en la superficie de las células blanco. Los principales receptores que median esta unión inicial son los de lectina tipo C, dentro de los que se encuentran DC-SIGN, langerina, el receptor de manosa (conocido también como CD206) y un receptor de lectina tipo C no caracterizado, resistente a la tripsina. Una vez establecido el contacto con el virus, el receptor DC-SIGN, puede mediar dos eventos: la internalización y la transferencia viral (con o sin infección de las CDs) a los linfocitos T CD4+ que co-expresan el correceptor de la quimiocina CCR5+ (Fig. 1). La internalización conlleva al tráfico del virus dentro de las CDs, paso crucial para mediar la posterior transferencia. Este tráfico se establece en los compartimientos intracelulares no lisosomales, para posteriormente ser re-expresado en la

Captura y transporte del VIH por las células dendríticas a través del receptor DC-SIGN hasta los linfocitos T



Replicación del VIH en las células dendríticas previo a la infección de los linfocitos T

entender parte de la variabilidad existente entre los individuos, tanto en la susceptibilidad a infectarse como a progresar hacia la fase de SIDA, y resulta promisorio para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Esta variabilidad se ha asociado con la presencia de polimorfismo en genes que codifican para CCR5, como la variante CCR5 32, que se asocia con limitación de la infección; asimismo, los individuos que producen niveles elevados de RANTES o CCL5 (ligando de CCR5), son resistentes a la infección y al desarrollo de la enfermedad.

Posterior a la unión de la gp120 al correceptor, la membrana celular y del virión se fusionan y la capsida viral es liberada en el citoplasma de la célula, donde comienza su transcripción reversa y participan tanto proteínas celulares y virales, como la transcriptasa reversa (RT), proteínas de la matriz viral (p17), Nef, Vif, para posteriormente dar paso a la formación del complejo de preintegración (PIC), que se traslada al núcleo a través de los poros nucleares y posteriormente es insertado en el genoma de la célula blanco mediante la acción de una integrasa viral (IN). Para que el paso final de integración ocurra, el linfocito T infectado en reposo debe ser activado; si esto no tiene lugar, el PIC es degradado en el citoplasma. La infección de linfocitos T de memoria, linfocitos T vírgenes y monocitos/macrófagos, conduce a una infección latente no productiva y constituyen los principales reservorios virales. Por último y para iniciar su diseminación, la primera ronda de transcripción requiere de la expresión de tres proteínas reguladoras (Tat, Nef y Rev), que son las encargadas del control de la replicación y gemación de nuevas partículas virales. Durante todo este proceso, en el interior de la célula blanco se activan factores de resistencia que tratan de limitar la replicación del virus tales como: “*tripartite motif (TRIM) family protein*” (TRIM5a), que restringe la entrada de la capsida viral; y la “*apolipoprotein B editing catalytic polypeptide*” (APOBEC3G), miembro de la citidín desaminasa, que se asocia con el virión nascente e incorpora mutaciones que impiden su replicación.

Papel de la respuesta inmune innata durante la infección por el VIH

El sistema inmune innato ejerce la respuesta más temprana a la invasión y daño ocasionado por los

microorganismos, y sin este sistema la respuesta inmune adaptativa o adquirida no puede activarse adecuadamente. Así, la alteración del sistema innato puede predisponer a infecciones al incrementar la susceptibilidad a los agentes microbianos. Individuos con mutaciones en genes asociados con el complemento, receptores de manosa o que están involucrados en mediar la activación de macrófagos, células asesinas naturales (natural *killer cells*, NK) y neutrófilos, cursan con procesos infecciosos recurrentes que pueden poner en peligro la vida del individuo. El SIDA ha sido atribuido principalmente a la infección y/o destrucción de los linfocitos T CD4+ causando una linfopenia y deficiencia del sistema inmune adaptativo; sin embargo, el virus infecta, interactúa e inhibe la respuesta del sistema innato, evidenciado por el hecho de la existencia de una alta prevalencia de infecciones bacterianas en los pacientes infectados.

El sistema inmune innato tiene varios componentes que ejercen su efecto anti-VIH. Dentro de los factores solubles está la lectina de unión a manosa (MBL) que se une a partículas de VIH y favorece su fagocitosis y destrucción por células fagocíticas. Otros componentes solubles importantes son el complemento que puede unirse a partículas virales y favorecer su destrucción. La producción de interferones (IFNs) ha sido evaluada durante la infección y se ha observado que en algunos casos la producción normal de IFNs en sujetos con valores inferiores a 200 CD4/mm³, ejerce un efecto protector contra las infecciones. Unas de las células más importantes productoras de IFNs son las células dendríticas plasmocitoides (PDCs), reconociéndose así su papel antiviral y antitumoral. Las PDCs se han visto afectadas (tanto en número como en función) durante el desarrollo de la enfermedad, en particular se ha determinado que su reducción predispone al desarrollo del sarcoma de Kaposi.

Otro factor soluble con actividad antiviral es el factor antiviral proveniente de las células T CD8+ (CAF) que media la respuesta antiviral no-citotóxica de las células T CD8+ (CNAR), considerado como elemento de la inmunidad innata ya que no requiere de la activación específica de los linfocitos T CD8+ y su producción no está restringida por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Su función principal es suprimir la transcripción viral, y su

liberación ocurre mucho antes que la producción de anticuerpos, durante la fase aguda de la infección (pico máximo de secreción entre 5 a 9 días) y puede detectarse en los individuos seronegativos con alto riesgo de exposición, por lo que se ha sugerido que tiene un papel en la prevención de la infección.

Las células NK son los elementos de la inmunidad innata que se encargan de reconocer células infectadas por virus, a través de la detección de cambios en la densidad de expresión (disminución de la expresión en la superficie celular) de las moléculas de histocompatibilidad clase I (MHC-I) o modificaciones presentes en las moléculas MHC-I propias; este reconocimiento se establece a través de receptores de tipo inmunoglobulina (*immunoglobulin-like receptors*, KIR), que son inhibidos en presencia de MHC-I propias (principalmente los alelos *HLA-B* y *HLA-C*), cuando se expresan adecuadamente. Esta inhibición se pierde cuando ocurren cambios en la célula blanco por lo que son eliminadas por las células NK. Proteínas reguladoras del virus (Nef), disminuyen la expresión de las MHC-I tipo *A* y *B* y de esta manera evaden el reconocimiento de células infectadas por los linfocitos T citotóxicos (CTLs) específicos, pero mantienen la densidad en la superficie de MHC-I tipo *C* y de esta manera inhiben el ataque por las células NK. Se ha reportado una disfunción de la actividad de las células NK durante la infección por el VIH; alteración que se correlaciona con la progresión de la enfermedad hacia la fase de SIDA. El sistema inmune de los pacientes infectados por el VIH presenta un estado crónico de activación, reflejado en estas células NK por la alteración de la expresión de receptores de activación tales como CD16 y CD69, observándose que las células NK de pacientes en fase de SIDA muestran niveles elevados de CD69, asociado con baja expresión de CD16 e incapacidad para regular negativamente a CD16 en respuesta a sustancias activadoras, evento clave para la activación de estas células. Estas alteraciones pudieran contribuir con una disminución de la eficiencia de las células NK para mediar citotoxicidad frente a células tumorales o células infectadas por el VIH.

Los monocitos y macrófagos son infectados por el VIH, ya que como se mencionó anteriormente co-expresan tanto CD4 como CCR5, sin embargo y en contraste a lo que ocurre con los linfocitos T CD4+, estas células pueden acumular grandes

cantidades de viriones sin morir y la población de macrófagos es preservada a pesar de la destrucción masiva de los linfocitos T CD4+, por lo que constituyen importantes reservorios virales, incluso resistentes al efecto de la TAAE, ya que a pesar de las cargas virales indetectables en plasma, el virus mantiene su replicación activa dentro de estas células.

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) como parte de los componentes inespecíficos del sistema inmune, participan como elementos amplificadores, que en asociación con el complemento se encargan de eliminar a los agentes extraños. La función de los neutrófilos no se limita a la fase efectora de la respuesta inmune, sino también han sido estudiados como elementos moduladores de la inmunidad adaptativa. Existen evidencias previas de alteraciones funcionales de los neutrófilos asociados con la progresión de la enfermedad. Los defectos funcionales descritos incluyen disfunción de la producción de superóxido, dada por una producción basal incrementada, pero incapacidad para responder frente a estímulos, defecto que se profundiza conforme progresa la enfermedad, además defectos en la fagocitosis, en la quimiotaxis y en la expresión de moléculas de adhesión. Una de las explicaciones de estas alteraciones funcionales y de la neutropenia observada durante las fases avanzadas de la enfermedad, es el incremento de la muerte constitutiva evidenciada por algunos autores.

Papel de la respuesta inmune adaptativa durante la infección por el VIH

La infección por el VIH se caracteriza por una primera etapa o fase aguda, donde se evidencia una destrucción rápida y masiva de linfocitos T de memoria, efecto generado directamente por el virus y que ocurre fundamentalmente a nivel de las mucosas (sitio principal de alojamiento de estas células), y una segunda etapa o fase crónica, que puede durar varios años (3-10 años), que se caracteriza por la lucha del sistema inmune para recuperarse del menoscabo sufrido durante la fase aguda, esfuerzo que se complica por la ofensiva que se genera en contra del VIH, ya que el virus ha desarrollado múltiples estrategias para evadir la respuesta inmune e incrementar la susceptibilidad a sufrir infecciones oportunistas. Esta lucha se

traduce en un estado de activación crónico, lo que facilita la replicación viral debido a que el VIH tiene preferencia por infectar células T CD4+ activadas. Como ya se mencionó antes, la principal puerta de entrada del VIH son las mucosas, donde se establece el contacto inicial con los elementos de la respuesta inmune. La infección inicial es dependiente de la presencia de la molécula CD4 y del co-receptor CCR5, presente en las células T CD4+ de memoria activadas, localizadas en la lámina propia, lo que compromete la inmunidad frente a otros patógenos (por ejemplo, citomegalovirus) y tumores, ya que se pierde gran parte del repertorio de células encargadas de mediar la respuesta secundaria altamente específica y efectiva frente a agentes conocidos. En macacos, la infección por el VIS conduce durante los primeros 10 días post-contagio a la infección de más del 60% de las células T de memoria residentes en las mucosa, las cuales son eliminadas al día 14, lo que compromete la función del sistema inmune a nivel de la barrera principal, puerta de entrada para muchos patógenos. Además, durante esta fase aguda son reclutados linfocitos T específicos para el VIH, los cuales durante el proceso de reconocimiento son activados y se convierten en blanco para la infección y replicación viral, células que posteriormente son destruidas por efecto citopático del virus, por los CTLs o activación de mecanismos de apoptosis, provocando una falla en el repertorio de linfocitos T CD4+; esto explica porqué la respuesta de linfocitos T CD4+ específica contra el virus solo está presente durante la fase aguda de la infección y no se detecta durante la infección crónica.

Los CTLs y la presencia de anticuerpos específicos, juegan un papel clave durante las fases iniciales de la infección y en el control de la replicación viral. El papel de los CTLs específicos es crítico en el control de la viremia, aparecen antes de la seroconversión y en la fase aguda se les considera más efectivos que los anticuerpos para controlar la viremia; sin embargo, su función se ve afectada a partir de la aparición de mutantes de escape viral. Los CTLs específicos median destrucción de células infectadas a través del reconocimiento vía MHC-I y activación de mecanismos de lisis mediados por perforina y liberación de proteasas sobre las células infectadas, o a través de la activación de la apoptosis vía Fas/FasL. Adicionalmente a estos mecanismos

citotóxicos, los CTLs también liberan IFNs y quimiocinas (RANTES, MIP-1alfa y MIP-1beta) que tienen actividad antiviral, ya que estas últimas son ligandos naturales de CCR5 y actúan inhibiendo la infección de nuevas células blanco por cepas R5, ya que bloquean parcialmente su unión a CCR5. A pesar de estos mecanismos el sistema inmune no puede evitar la cronicidad de la infección o mediar la erradicación del virus. La aparición de mutantes de escape para los CTLs específicos y la pérdida de CTLs específicos contra antígenos virales dominantes, se asocia con la pérdida del control de la viremia ejercido por estas células y como consecuencia el deterioro del paciente infectado.

La respuesta inmune antiviral mediada por los CTLs es dependiente de la presencia de moléculas MHC-I. El reconocimiento de los péptidos antigénicos es altamente específico para determinados alelos del HLA, por lo que se ha logrado establecer una asociación entre ciertos alelos de HLA y la efectividad de la respuesta inmune en el control de la infección por el VIH, donde la comparecencia de los alelos *HLA-B57*, *HLA-B27* y *HLA-B18*, se asocia con una evolución favorable de la infección, mientras que la existencia de los alelos *HLA-B35*, *HLA-B22*, con una evolución desfavorable en presencia del VIH y pérdida acelerada de las poblaciones de linfocitos T CD4+. La aparición de estos alelos en forma combinada pudiera predecir la progresión de la enfermedad hacia progresores lentos, progresores rápidos, no progresores y/o niveles de carga viral previa a la terapia antiretroviral. Esta respuesta pudiera ser explicada por el efecto protector de alelos como *HLA-B57* y *HLA-B27* en el reconocimiento e inducción de una respuesta efectiva frente a la presencia de mutantes de escape viral.

Los anticuerpos al parecer no juegan un papel relevante en el control de la diseminación viral durante la fase aguda o crónica. Aunque existen evidencias de la generación de anticuerpos neutralizantes, esta respuesta es débil y durante la respuesta primaria se genera después del control parcial de la viremia establecido por los CTLs. Hallazgos recientes indican que los anticuerpos ejercen presión en la selección de las mutantes virales resistentes a los anticuerpos neutralizantes; de esta manera, las mutantes virales presentes en un individuo son aquellas que no son neutralizadas por

los anticuerpos específicos.

Finalmente, la fase crónica se asocia con una declinación lenta y progresiva de linfocitos T CD4+ en sangre periférica, de los cuales pocos están infectados, y con un incremento en la tasa de muerte de las células CD4+ y CD8+, junto con el estado crónico de activación. Se cree que las causas de esta depleción está relacionada a: 1) que las células activadas son blanco de infección por el virus; 2) una elevación del recambio acelerado de linfocitos, lo que conduce a consumo de los repertorios celulares, y 3) una alteración del control del ciclo celular y aumento en la susceptibilidad a la muerte.

Así, el VIH conduce a la alteración funcional y declinación numérica de los linfocitos T CD4+, lo que conlleva al desarrollo del SIDA y como consecuencia, a la aparición de infecciones oportunistas y la muerte del individuo. A pesar de múltiples estudios, todavía existen muchas lagunas sobre los mecanismos utilizados por el virus para mediar la muerte de las células linfoides. Reportes recientes indican que la pérdida progresiva de las poblaciones de linfocitos CD4 es consecuencia de: (a) inapropiada producción a nivel del timo, (b) relocalización de los linfocitos virus-específicos en los órganos linfoides, y (c) alteración en la homeostasis entre la proliferación y muerte celular por apoptosis, siendo este último mecanismo uno de los principales eventos que conduce a la destrucción de las células del sistema inmune y a la progresión hacia la fase del SIDA. 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, por lo que dedicaremos especial atención a los mecanismos que utiliza el virus para modular la apoptosis y así conducir a la disfunción, no sólo de los elementos de la inmunidad adquirida, sino también a una parte importante de componentes de la inmunidad innata.

Apoptosis inducida por el VIH en células del sistema inmune

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico altamente controlado y esencial para la regulación del crecimiento y diferenciación celular. La apoptosis se caracteriza por retracción celular, compactación de la cromatina nuclear, pérdida de la forma multilobulada del núcleo y de los receptores de superficie, cambios en la asimetría

de la membrana plasmática asociado con la externalización de fosfatidilserina, lo que permite que las células apoptóticas sean fagocitadas por los macrófagos. La muerte celular se genera a través de dos vías: la extrínseca o muerte inducida por activación (MIA), mediada por receptores de muerte, y la vía intrínseca o muerte de forma autónoma de células activadas (MACA), mediada por proteínas relacionadas con la familia Bcl-2. La vía extrínseca es activada por miembros de la familia del TNF (TNF/TNFR, FasL/Fas, TRAIL/TRAIL ligando, etc), mientras que la vía intrínseca se lleva a cabo por sensores internos que transmiten señales directamente hacia la mitocondria.

El VIH cuenta con diversas estrategias para activar la maquinaria de apoptosis tanto en células infectadas como en las no infectadas, induciendo así la muerte de células efectoras del sistema inmune. Los mecanismos involucrados en la destrucción de las células linfoides incluyen la muerte directa por expresión de genes virales en las células infectadas; muerte indirecta de células no infectadas por liberación de proteínas virales pro-apoptóticas; destrucción de efectores específicos en los tejidos infectados por el virus, y expresión alterada de proteínas reguladoras de la apoptosis tanto en las células T, como en las células presentadoras de antígeno, como consecuencia de la activación celular crónica mediada por el virus. La contribución de la apoptosis a la progresión de la enfermedad ha sido documentada en varios modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha evidenciado que los progresores lentos muestran una tasa de apoptosis mas baja, en comparación con los progresores rápidos y de esta manera, contribuyen al incremento en la susceptibilidad a sufrir infecciones por gérmenes oportunistas.

Las células infectadas por el VIH obtenidas de pacientes, al igual que líneas celulares promonocíticas infectadas *in vitro*, exhiben cambios en la regulación de receptores pro-apoptóticos; ejemplo de ello es un incremento en la expresión de Fas y su ligando (FasL), acompañado por incremento de la expresión de proteínas intracelulares pro-apoptóticas miembros de la familia Bcl2 (BclXS y Bax) y disminución de la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl2 y BclXL. Las células T de pacientes infectados no sólo muestran aumento en la expresión del receptor

Fas, sino que además tienen mayor susceptibilidad a morir por esta vía. En células mononucleares (linfocitos T CD4+ y CD8+, así como en macrófagos) se ha evidenciado un aumento en la expresión en superficie de FasL y niveles elevados de Fas soluble. Estos cambios están asociados con un incremento en la carga viral y la progresión hacia la fase de SIDA. La participación de otros receptores y ligandos de muerte también ha sido documentada durante la infección por VIH; por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de TNF se encuentran elevados en sangre periférica de pacientes sintomáticos. En resumen, en linfocitos T CD4+ y CD8+, el virus es capaz de regular la apoptosis mediante la modulación de MIA, asociado con alteración en la expresión de receptores de muerte (sistema Fas/FasL); estos cambios a su vez están relacionados con la progresión de la enfermedad hacia la fase de SIDA.

También se ha sugerido la regulación de MACA durante la apoptosis inducida por el VIH, por el aumento de la apoptosis espontánea observada en las células mononucleares de sangre periférica, especialmente aquellas que tienen fenotipo de células activadas. Esto se ha asociado con una disminución de la expresión de Bcl2 detectado in vivo en nódulos linfáticos y sangre de individuos seropositivos. Los linfocitos de sangre periférica de los pacientes, tienen una pérdida del potencial transmembrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), así como también un aumento en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno por la mitocondria; estos cambios se han correlacionado con la apoptosis espontánea.

Otro fenómeno observado es la muerte mediada por células autólogas infectadas, demostrada en macrófagos, monocitos, células T CD4+ y células T CD8+, derivadas de pacientes infectados, que son capaces de inducir muerte a células no infectadas. Los macrófagos constituyen reservorios importantes para el VIH, el cual incrementa la expresión de FasL y TNF en su superficie y de esta manera los protege de las células T CD4 y CD8 efectoras, induciéndoles muerte una vez que establecen contacto celular.

Proteínas del VIH que participan en la modulación de la muerte celular

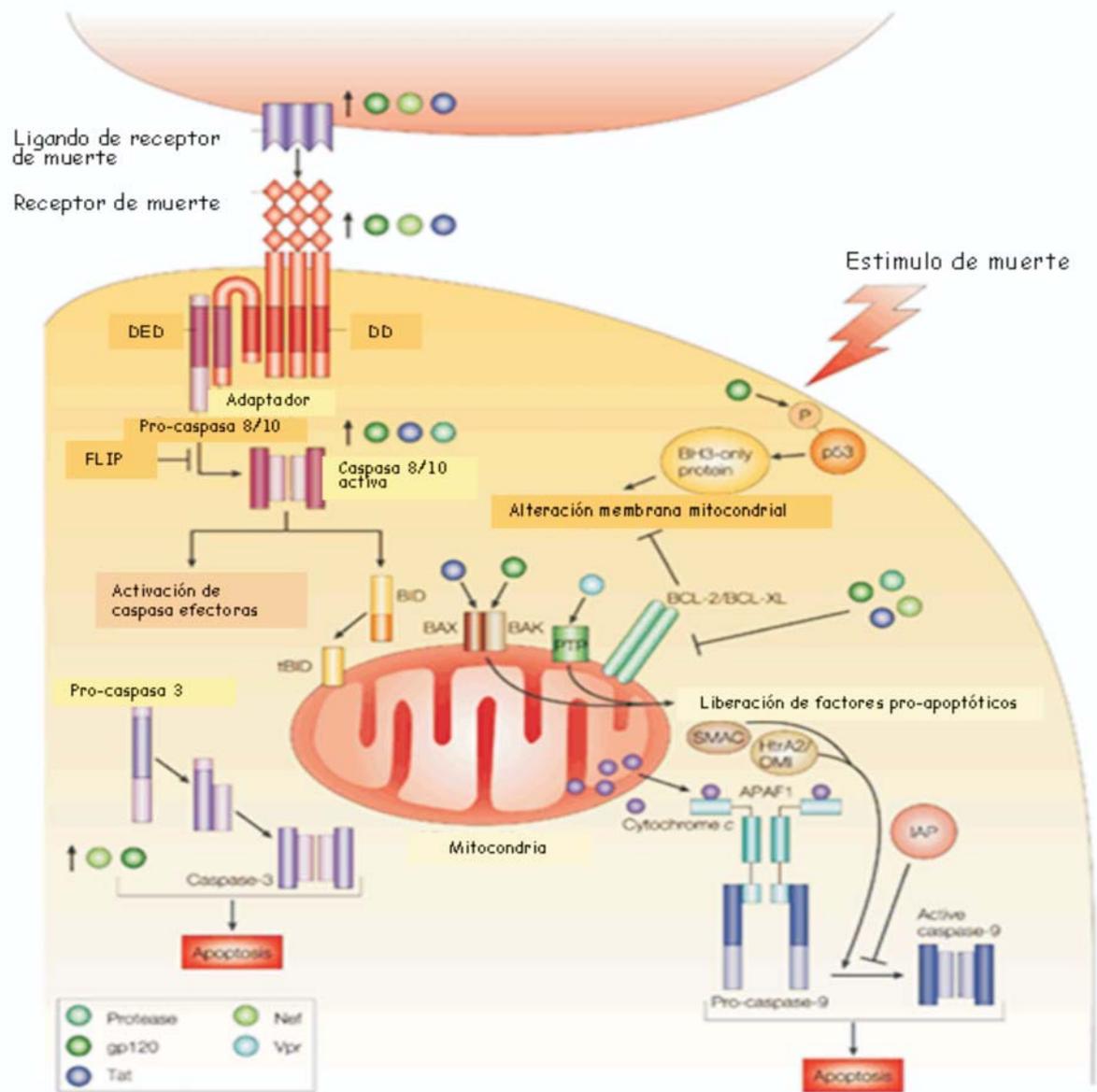
Varias proteínas del virus están involucradas en mediar la muerte celular, entre ellas la glicoproteína

de envoltura (Env), Tat, Rev, Nef, Vpr y proteasas. Por ejemplo, en células intactas el Vpr (*viral protein R*) puede causar desintegración del potencial de membrana de la mitocondria, provocar la liberación del citocromo c y de esta manera, conducir a la apoptosis. Por otro lado, Tat favorece la disminución de la expresión de Bcl2 e incremento de la expresión de caspasa 8. El decremento de Bcl2 intracelular es afectada además por la degradación proteolítica inducida por proteasas codificadas por el virus o por proteínas virales reguladoras y estructurales (Tat, Nef, Env o Vpr) (Fig. 2).

Env es capaz de interactuar directamente con receptores ubicados en la superficie de la célula blanco (por ejemplo, CD4 o con los correceptores) e inducir muerte de los linfocitos no infectados. El mecanismo por el cual se genera la muerte puede variar dependiendo de la naturaleza de la proteína Env (soluble secretada de células infectadas, expresada sobre los viriones o en la superficie de las células infectadas) y de la célula blanco. En el caso de expresarse en la superficie de una célula infectada, puede interactuar con un linfocito no infectado que expresa CD4 en su superficie e inducir muerte a través de activación de señales de apoptosis mediada por receptores, hemifusión con la célula blanco y la formación de sincitio, eventos que conducen a la muerte celular. La muerte inducida por Env puede activarse, además, dependiente de CXCR4 e independiente de la presencia de CD4, conduciendo a la activación de la cascada de apoptosis subordinada a la mitocondria y al parecer, no involucra la participación de los miembros de la familia de las MAPK (ERK, p38, JNK), ni del sistema Fas/FasL. Así, la interacción de Env con CXCR4 genera despolarización de la membrana mitocondrial, liberación del citocromo c y activación de las caspasas 9 y 3. Env puede además interactuar con CCR5 e inducir la expresión de FasL y activación de caspasa 8 en linfocitos T CD4+. La regulación de la expresión de FasL en la superficie de células mononucleares (linfocitos T CD4, CD8, monocitos/macrófagos, células dendríticas) se ha atribuido principalmente a dos productos virales Env y Nef.

Muerte celular inducida por el VIH sobre los neutrófilos

Los neutrófilos tienen un papel fundamental en la



defensa contra agentes infecciosos, evidenciado por el hecho que ciertos defectos en su función, conducen a infecciones severas que ponen en peligro la vida del paciente, tal es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica (EGC) y el SIDA, en el cual la función inapropiada de los PMNs conduce a una susceptibilidad marcada a sufrir infecciones por hongos y bacterias. Recientemente se ha demostrado la presencia de la molécula CD4 en neutrófilos de individuos, tanto seropositivos como seronegativos para el VIH; esta observación sumada a reportes previos de presencia constitutiva de CXCR4 y DC-SIGN, pudiera indicar que los PMNs son blancos directos del virus o de sus componentes.

Existen evidencias previas de alteraciones funcionales de los neutrófilos asociadas con la progresión de la enfermedad. Una de las explicaciones de estos defectos funcionales, es el incremento de la muerte constitutiva comprobada por algunos autores, que además pudiera explicar en parte la neutropenia observada en los pacientes en fase de SIDA. Los mecanismos que conducen a la muerte acelerada de los neutrófilos no han sido dilucidados. Estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la muerte espontánea de los neutrófilos de los pacientes es significativamente mayor que los controles, la cual no se correlaciona con los niveles de carga viral, ni el número de CD4, resultados que corroboran reportes previos (Fig. 3a). Hallazgos recientes indican que en los estadios tempranos de la infección (antes de la aparición de anticuerpos específicos contra el virus), los granulocitos de estos pacientes expresan en su superficie niveles elevados de Fas. La muerte acelerada de los neutrófilos de los pacientes infectados, pudiera ser consecuencia de una alteración en la expresión de receptores de muerte como Fas/FasL, por lo que se exploró la expresión de ambas moléculas en los PMNs de los pacientes. Los neutrófilos de los pacientes tienen una expresión de FasL significativamente mayor en comparación con los controles seronegativos, sin embargo no se evidenciaron cambios significativos en la expresión ni cinética post-activación del receptor Fas en la superficie de estas células. Paralelamente a la cuantificación de los receptores de muerte expresados en la superficie de los neutrófilos, se evaluó la susceptibilidad de estas células a sufrir muerte vía Fas, a través del uso de un anticuerpo

específico anti-Fas (CH-11), con la finalidad de inducir el entrecruzamiento de este receptor. Se apreció que la muerte vía Fas es significativamente mayor en los neutrófilos de los pacientes (Fig. 3b), lo que sugiere que a pesar de no observarse cambios significativos en los niveles de expresión de Fas, la susceptibilidad de sufrir muerte por esta vía esta incrementada durante la infección. A diferencia de la muerte constitutiva, esta elevada susceptibilidad de morir vía Fas se asoció con la carga viral y con la co-expresión de Fas/FasL en la superficie de estas células en reposo, lo que insinúa que la presencia de ambas moléculas (Fas/FasL) en la superficie de los PMNs de los pacientes pudiera activar la muerte autocrina.

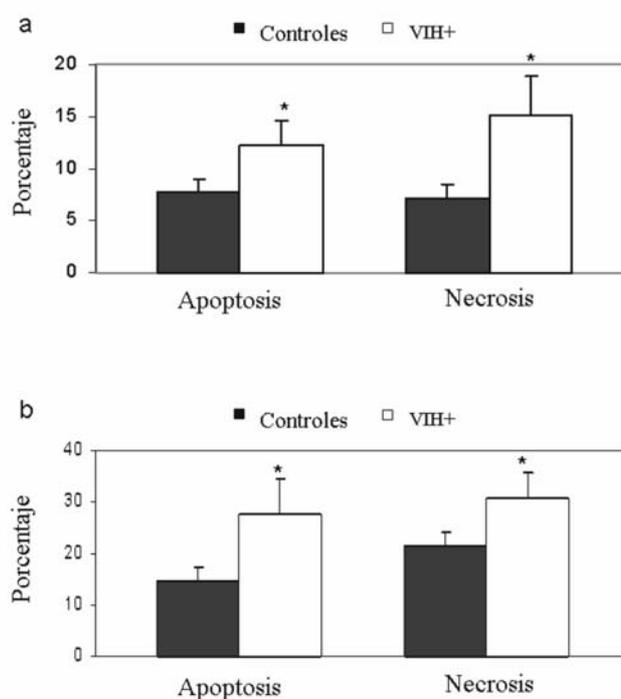


Figura 3. Regulación de la muerte celular en los neutrófilos de los pacientes infectados por el VIH. 3a muestra la media del porcentaje de muerte celular espontánea cuantificada por el número de células positivas solo para Annexina-V (apoptosis) ($7,8 \pm 3,4$ para los controles y $12,4 \pm 6,3$ para los pacientes) y la media del porcentaje de muerte celular espontánea cuantificada por el número de células positivas para Annexina-V/PI (necrosis) ($7 \pm 3,8$ para los controles y $15,4 \pm 10,4$ para los pacientes). 3b muestra la apoptosis ($14,5 \pm 7,7$ para los controles y $27,6 \pm 18,8$ para los pacientes) y la necrosis ($21,2 \pm 8,3$ para los controles y $30,6 \pm 13,7$ para los pacientes) inducida vía Fas. * indica diferencias significativas utilizando t-test pareada ($p < 0,05$).

Al igual que lo advertido en los neutrófilos, las células T de pacientes VIH seropositivos muestran una elevada susceptibilidad a la muerte vía Fas. Inicialmente se pensó que el mecanismo principal de muerte de las células T era producto del efecto citopático generado por el virus sobre las células infectadas. Sin embargo, existen evidencias de que mecanismos diferentes a los efectos citopáticos generados por la infección, pueden regular la muerte celular. Mediante técnicas de hibridación *in situ* en nódulos linfáticos, se ha reportado que la mayoría de las células apoptóticas no están infectadas, indicando que existen otros mecanismos involucrados en inducir muerte, además de la infección directa de las células, por lo que se pudiera argumentar que células inflamatorias como los PMNs son también blanco de proteínas virales, sin ser células susceptibles a la infección.

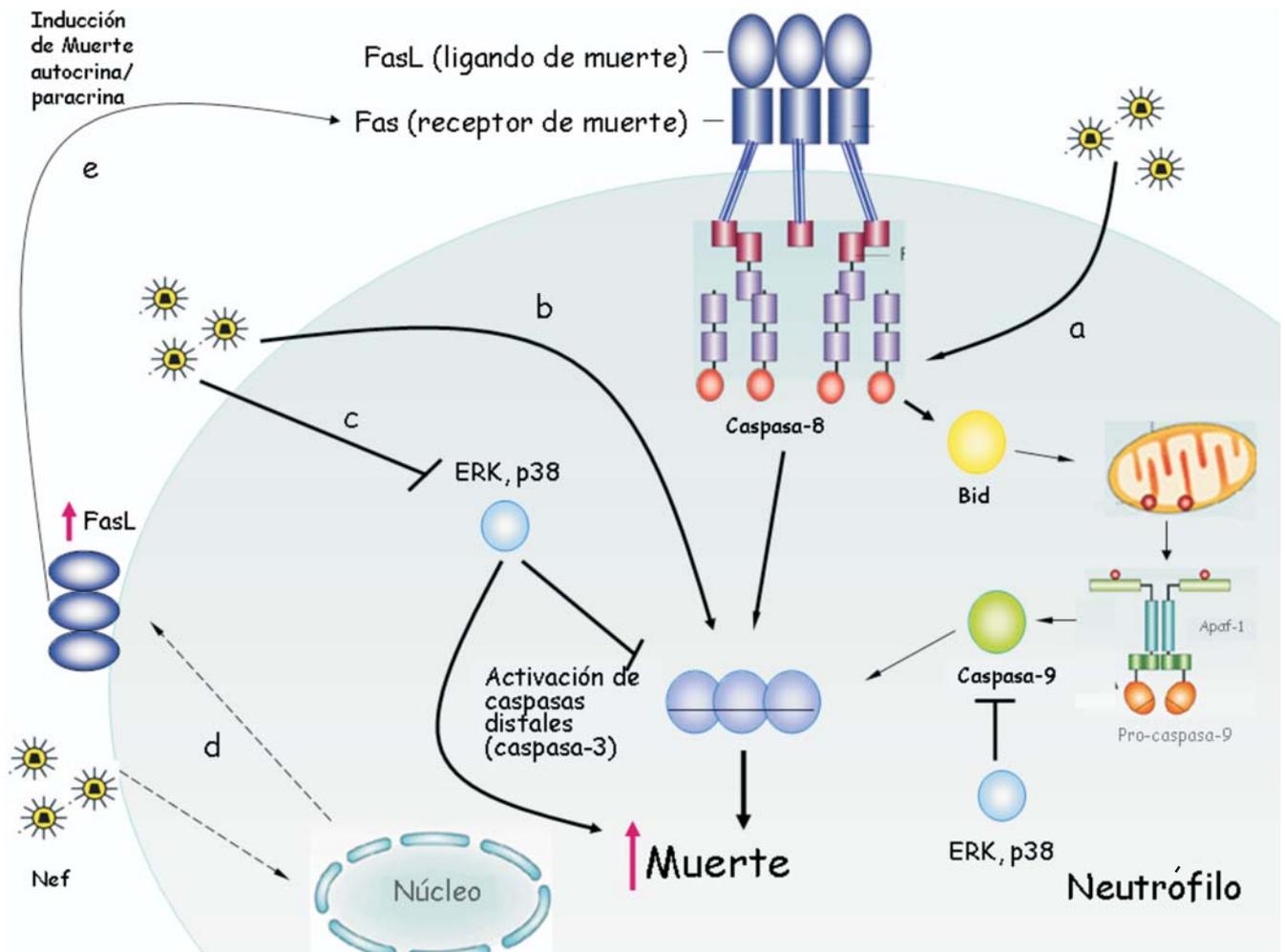
Un aspecto importante a tomar en consideración dentro de la fisiología de los neutrófilos, es la participación de las MAPK, consideradas como mediadores de señales de supervivencia y muerte. Previamente se ha demostrado que la fosforilación y activación de uno de los miembros de las MAPK, ERK media señales asociadas con la supervivencia de estas células, mientras que algunos autores afirman que la fosforilación de p38 está asociada con la apoptosis espontánea de neutrófilos provenientes de controles sanos; no obstante, otros autores no confirman estas observaciones. La inhibición de las MAPK (ERK y p38) incrementa la muerte constitutiva, solo en las células de los pacientes, lo que pudiera sugerir un desequilibrio entre la activación de estas cinasas y componentes de la cascada de muerte, tales como las caspasas. Se ha descrito que ERK regula la supervivencia de las células a través de la fosforilación e inactivación de las caspasas 9 y 3, y p38 puede regular la actividad de las caspasas 3 y 8 mediante su fosforilación e inactivación, y de esta manera prevenir la necrosis que conduciría a inflamación.

Se ha sugerido que Nef es esencial para la patogénesis viral y es considerado como uno de los reguladores de la apoptosis, postulado por los siguientes hallazgos: 1) La infección en humanos con cepas que no tienen nef, produce progresión más lenta hacia la fase de SIDA; 2) Las células T que expresan Nef co-expresan FasL, y 3) Nef puede incrementar la muerte de células no infectadas. Basados en estos argumentos, se evaluó el papel de

Nef sobre la modulación de la muerte en los PMNs y se evidenció que Nef induce un incremento significativo en la expresión de FasL en la superficie de los neutrófilos provenientes de individuos seronegativos; estos resultados preliminares hablan a favor de un efecto regulador directo de Nef sobre los mecanismos que controlan la expresión de FasL en los PMNs. En células T se ha evidenciado que Nef es capaz de inducir la expresión de FasL a través de su interacción con la cadena del TCR y esto condiciona la activación y reclutamiento de una cinasa, conocida como cinasa asociada a Nef (p62/NAK); sin embargo, no está claro cómo este complejo conduce a un incremento en la expresión de FasL en la células blanco; hacen falta estudios adicionales para dilucidar como Nef regula la expresión de FasL en la superficie de los neutrófilos.

Se ha postulado que la modulación de la expresión de FasL en la superficie de una gran variedad de células, como es el caso de los macrófagos infectados por el VIH, es un mecanismo para proteger a los reservorios de la acción de las células efectoras. De allí que se evaluó el significado biológico de los niveles elevados de FasL sobre los PMNs de los pacientes, a través de ensayos de co-cultivo con células linfoides no infectadas (utilizando un línea celular susceptible a la muerte mediada por Fas conocida como J77) y los neutrófilos como células inductoras de muerte. El co-cultivo con PMNs de pacientes VIH positivos indujo mayor porcentaje de muerte en células linfoides, sin embargo, no se evidenció correlación entre la expresión de FasL en la superficie de los PMNs y la capacidad para inducir muerte de las J77. Estos resultados sugieren que los neutrófilos de pacientes infectados pudieran participar en la eliminación de células no infectadas y así contribuir con el deterioro de la respuesta inmune. Sin embargo, otros factores además de la expresión de FasL pudieran contribuir con la muerte de células linfoides.

En resumen, podemos sugerir tres posibles efectos del virus sobre los neutrófilos: 1) Muerte espontánea modulada a través del desequilibrio de la cascada de las MAPK, 2) Incremento en la susceptibilidad de sufrir muerte vía Fas, asociada con un aumento tanto en los niveles de viremia como en la expresión de FasL, impulsada en parte por Nef, y 3) Inducción de muerte de células linfoides no infectadas, por mecanismos



conducir al desarrollo de nuevas estrategias para el control de la diseminación viral, de sus efectos patogénicos que conducen a la destrucción de las diferentes subpoblaciones celulares y al desarrollo de nuevos blancos terapéuticos, que permitan la total erradicación del virus, particularmente aquellos que se encuentra alojados en los reservorios virales.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a las siguientes Instituciones: Al FONACIT, subvenciones: S1-2000000522 y al CDCHT de la Universidad de los Andes subvención M- M-865-06-07-B.

Correspondencia: Dra. Siham Salmen Halabi. Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes, Avenida 16 de Septiembre. Edificio Louis Pasteur, Sector Campo de Oro. Anexo IAHULA. Mérida 5101. Venezuela, e-mail: sihamsa@ula.ve

Referencias

- Pilcher, C.D., Eron, J.J. Jr, Galvin, S., Gay, C., Cohen, M.S. 2004. Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *J. Clin. Invest.* 113:937-45.
- Heeney, J.L., Dalgleish, A.G., Weiss, R.A. 2006. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 313:462-6.
- Levy, J.A., Scott, I., Mackewicz, C. 2003. Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity. *Clin. Immunol.* 108:167-74.
- Parniak, M.A. 2004. HIV/AIDS after twenty-five years. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36:1666-7.
- O'Brien, S.J., Nelson, G.W. 2004. Human genes that limit AIDS. *Nat. Genet.* 36:565-74.
- Hocini, H., Bomsel, M. 1999. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J. Infect. Dis.* 179(Suppl 3):S448-53.
- Wu, L., Kewal-Ramani, V.N. 2006. Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination. *Nat. Rev. Immunol.* 6:859-68.
- Gupta, K., Klasse, P.J. 2006. How do viral and host factors modulate the sexual transmission of HIV? Can transmission be blocked? *PLoS Med.* 3:181-5.
- Noursadeghi, M., Katz, D.R., Miller, R.F. 2006. HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect. Dis.* 6:794-804.
- 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.* 74:710-18.
- Steinman, R.M., Sing, D.C. 2000. A guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 100:491-4.
- Pope, M., Betjes, M.G., Romani, N., et al. 1994. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 78:389-98.
- Cameron, P.U., Freudenthal, P.S., Barker, J.M., Gezelter, S., Inaba, K., Steinman, R.M. 1992. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* 257:383-7.
- Finzi, D., Plaeager, S.F., Dieffenbach, C.W. 2006. Defective virus drives human immunodeficiency virus infection, persistence, and pathogenesis. *Clin. Vaccine Immunol.* 13:715-21.
- Schols, D. 2006. HIV co-receptor inhibitors as novel class of anti-HIV drugs. *Antiviral Res.* 71:216-26.
- Nolan, D., Gaudieri, S., Mallal, S. 2006. Host genetics and viral infections: immunology taught by viruses, virology taught by the immune system. *Curr. Opin. Immunol.* 18:413-21.
- Sierra, S., Kupfer, B., Kaiser, R. 2005. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J. Clin. Virol.* 34:233-44.
- Janeway, C.A. Jr. 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98:7461-68.
- Salmen, S., Berrueta, L., Heyworth, P., Borges, L., Hernandez, M., Munoz, J. 1999. The NADPH-oxidase complex in chronic granulomatous disease: preliminary description of a cluster in Merida-Venezuela. *Invest. Clin.* 40:277-300.
- Saifuddin, M., Hart, M.L., Gewurz, H., Zhang, Y., Spear, G.T. 2000. Interaction of mannose-binding lectin with primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Gen. Virol.* 81:949-55.
- Sullivan, B.L., Knopoff, E.J., Saifuddin, M., Takefman, D.M., Saarloos, M.N., Sha, B.E. et al. 1996. Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. *J. Immunol* 1996; 157:1791-8.
- Levy, J.A. 2003. The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol.* 24:628-32.
- Plaeager-Marshall, S., Spina, C.A., Giorgi, J.V., Mitsuyasu, R., Wolfe, P., Gottlieb, M., Beall, G. 1987. Alterations in cytotoxic and phenotypic subsets of natural killer cells in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *J. Clin. Immunol.* 7:16-23.
- Vowels, B.R., Gershwin, M.E., Gardner, M.B., McGraw, T.P. 1990. Natural killer cell activity of rhesus macaques against retrovirus-pulsed CD4+ target cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 6:905-18.
- Ljunggren, K., Karlson, A., Fenyo, E.M., Jondal, M. 1989. Natural and antibody-dependent cytotoxicity in different clinical stages of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Exp. Immunol.* 75:184-9.
- Brenner, B.G., Gornitsky, M., Wainberg, M.A. 1994. Interleukin-2-inducible natural immune (lymphokine-activated killer cell) responses as a functional correlate of progression to AIDS. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 1:538-44.
- Ahmad, A. Menzes, J. 1995. Positive correlation

- between the natural killer and gp120/41-specific antibody-dependent cellular cytotoxic effector functions in HIV-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 10:115-9.
28. Hatam, L., Schuval, S., Bonagura, V.R. 1994. Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry* 16:59-68.
29. Plaeger-Marshall, S., Isacescu, V., O'Rourke, S., Bertolli, J., Bryson, Y.J., Stiehm, E.R. 1994. T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: Three-color immunophenotyping. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 71:19-26.
30. Barboza, J.M., Salmen, S., Cova, J.A., Albarran, B., Goncalves, L., Borges, L., Hernandez, M., Berrueta, L. 2002. Uncoupling activation-induced modulation of CD16 and CD69 in CD56+ cells during AIDS. *APMIS* 110:415-22.
31. Sirianni, M.C., Mezzaroma, I., Aiuti, F., Moretta, A. 1994. Analysis of the cytolytic activity mediated by natural killer cells from acquired immunodeficiency syndrome patients in response to phytohemagglutinin or anti-CD16 monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 24:1874-8.
32. Ruscetti, F.W., Mikovits, J.A., Kalyanaraman, V.S., Overton, R., Stevenson, K. 1986. Analysis of effector mechanisms against HTLV-1 and HTLV-III/LAV-infected lymphoid cells. *J. Immunol.* 136:3619-24.
33. Ahmad, A., Menezes, J. 1996. Defective killing activity against gp120/41-expressing human erythroleukaemic K562 cell line by monocytes and natural killer cells from HIV-infected individuals. *AIDS* 10:143-9.
34. Smith, J.A. 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double edged sword. *J. Leukoc. Biol.* 56:672-86.
35. Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E. et al. 1997. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J. Immunol.* 158:5349-56.
36. Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F., Poli, V. 1996. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J. Exp. Med.* 183:1345-55.
37. Elbim, C., Prevot, M.H., Bouscarat, F., Franzini, E., Chollet-Martin, S., Hakim, J., Gougerot-Pocidaló, M.A. 1994. Polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-induced L-selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood* 84:2759-66.
38. Ellis, M., Gupta, S., Galant, S., Hakim, S., VandeVen, C., Toy, C., Cairo, M.S. 1988. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation. *J. Infect. Dis.* 158:1268-76.
39. Munoz, J.M., Salmen, S., Berrueta, L.R., Carlos, M.P., Cova, J.A., Donis, J.H., Hernandez, M.R., Torres, J.V. 1999. Effect of human immunodeficiency virus type 1 on intracellular activation and superoxide production by neutrophils. *J. Infect. Dis.* 180:206-10.
40. Baldelli, F., Preziosi, R., Francisci, D., Tascini, C., Bistoni, F., Nicoletti, I. 2000. Programmed granulocyte neutrophil death in patients at different stages of HIV infection. *AIDS* 14:1067-69.
41. Pitrak, D.L., Sutton, S.H., Tsai, C.H., Mullane, K.M., Pau, A.K. 1999. Reversal of accelerated neutrophil apoptosis and restoration of respiratory burst activity with r-metHuG-CSF (Filgrastim therapy in patients with AIDS. *AIDS* 13:427-9.
42. Mastroianni, C.M., d'Ettorre, G., Forcina, G. et al. 2000. Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96:1979-84.
43. Derdeyn, C.A., Silvestri, G. 2005. Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr. Opin. Immunol.* 17:366-73.
44. Letvin, N.L. 2006. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 6:930-9.
45. Ahr, B., Robert-Hebmann, V., Devaux, C., Biard-Piechaczyk, M. 2004. Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology* 1:1-12.
46. McCune, J.M. 2001. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 410:974-9.
47. Badley, A.D., Pilon, A.A., Landay, A., Lynch, D.H. 2000. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* 96:2951-64.
48. Adachi-Yamada, T., O'Connor, M.B. 2004. Mechanisms for removal of developmentally abnormal cells: cell competition and morphogenetic apoptosis. *J. Biochem.* 136:13-7.
49. Gougeon, M. 2003. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat. Rev. Immunol.* 3:392-404.
50. Badley, A.D., McElhinny, J.A., Leibson, P.J., Lynch, D.H., Alderson, M.R., Paya, C.V. 1996. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J. Virol.* 70:199-206.
51. Kaplan, D., Sieg, S. 1998. Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human immunodeficiency virus type 1 disease. *J. Virol.* 72:6279-82.
52. Dockrell, D.H., Badley, A.D., Algeciras-Schimnich, A., Simpson, M., Schut, R., Lynch, D.H., Paya, C.V. 1999. Activation-induced CD4+ T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4+ T cell count, and HIV plasma viral copy number. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15:1509-18.
53. Estaquier, J., Idziorek, T., Zou, W., Emilie, D., Farber, C.M., Bourez, J.M., Ameisen, J.C. 1995. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Exp. Med.* 182:1759-67.
54. Gehri, R., Hahn, S., Rothen, M., Steuerwald, M., Nuesch, R., Erb, P. 1996. The Fas receptor in HIV infection: expression on peripheral blood lymphocytes and role in the depletion of T cells. *AIDS* 10:9-16.
55. Hosaka, N., Oyaizu, N., Kaplan, M.H., Yagita, H., Pahwa, S. 1998. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *J. Infect. Dis.* 178:1030-9.
56. Katsikis, P.D., Wunderlich, E.S., Smith, C.A., Herzenberg, L.A. 1995. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human

- 181:2029-36.
57. Dockrell, D.H., Badley, A.D., Villacian, J.S. et al. 1998. The expression of Fas ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Invest.* 101:2394-405.
58. Medrano, F.J., Leal, M., Arienti, D. et al. 1998. Tumor necrosis factor beta and soluble APO-1/Fas independently predict progression to AIDS in HIV-seropositive patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14:835-43.
59. Estaquier, J., Tanaka, M., Suda, T., Nagata, S., et al. 1996. Fas-mediated apoptosis of CD4+ and CD8+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. *Blood* 87:4959-66.
60. Gougeon, M.L., Lecoecur, H., Boudet, F., et al. 1997. Lack of chronic immune activation in HIV-infected chimpanzees correlates with the resistance of T cells to Fas/Apo-1 (CD95)-induced apoptosis and preservation of a T helper 1 phenotype. *J. Immunol.* 158:2964-76.
61. Sloand, E.M., Young, N.S., Kumar, P., Weichold, F.F., Sato, T., Maciejewski, J.P. 1997. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood* 89:1357-63.
62. Gougeon, M.L., Garcia, S., Heeney, J., et al. 1993. Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:553-63.
63. Gougeon, M.L., Lecoecur, H., Dulioust, A., Enouf, M.G., Crouvoiser, M., Goujard, C., Debord, T., Montagnier, L. 1996. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J. Immunol.* 156:3509-20.
64. Meyaard, L., Otto, S.A., Jonker, R.R., Mijnter, M.J., Keet, R.P., Miedema, F. 1992. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 257:217-9.
65. Oyaizu, N., McCloskey, T.W., Coronese, M., Chirmule, N., Kalyanaraman, V.S., Pahwa, S. 1993. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood* 82:3392-400.
66. Adachi, Y., Oyaizu, N., Than, S., McCloskey, T.W., Pahwa, S. 1996. IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection: correlation with its ability to block culture-induced down-modulation of Bcl-2. *J. Immunol.* 157:4184-93.
67. Boudet, F., Lecoecur, H., Gougeon, M.L. 1996. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8+ T lymphocytes during HIV infection. *J. Immunol.* 156:2282-93.
68. Muro-Cacho, C.A., Pantaleo, G., Fauci, A.S. 1995. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J. Immunol.* 154:5555-66.
69. Castedo, M., Macho, A., Zamzami, N., Hirsch, T., Marchetti, P., Uriel, J., Kroemer, G. 1995. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *Eur. J. Immunol.* 25:3277-84.
70. Macho, A., Castedo, M., Marchetti, P. et al. 1995. Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers. *Blood* 86:2581-7.
71. Mählknecht, U., Herbein, G. 2001. Macrophages and T-cell apoptosis in HIV infection: a leading role for accessory cells? *Trends Immunol.* 22:256-60.
72. Heinkelein, M., Sopper, S., Jassoy, C. 1995. Contact of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4+ T lymphocytes is highly cytolytic for both cells. *J. Virol.* 69:6925-31.
73. Laurent-Crawford, A.G., Krust, B., Riviere, Y., Desgranges, C., Muller, S., Kieny, M.P., Dauguet, C., Hovanessian, A.G. 1993. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:761-73.
74. Ohnimus, H., Heinkelein, M., Jassoy, C. 1997. Apoptotic cell death upon contact of CD4+ T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1. *J. Immunol.* 159:5246-52.
75. Jacotot, E., Krust, B., Callebaut, C., Laurent-Crawford, A.G., Blanco, J., Hovanessian, A.G. 1997. HIV-1 envelope glycoproteins-mediated apoptosis is regulated by CD4 dependent and independent mechanisms. *Apoptosis* 2:47-60.
76. Guillermin, C., Coudronniere, N., Robert-Hebmann, V., Devaux, C. 1998. Delayed human immunodeficiency virus type 1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4. *J. Virol.* 72:1754-61.
77. Roggero, R., Robert-Hebmann, V., Harrington, S., Roland, J., Vergne, L., Jaleco, S., Devaux, C., Biard-Piechaczyk, M. 2001. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J. Virol.* 75:7637-50.
78. Biard-Piechaczyk, M., Robert-Hebmann, V., Roland, J., Coudronniere, N., Devaux, C. 1999. Role of CXCR4 in HIV-1-induced apoptosis of cells with a CD4+, CXCR4+ phenotype. *Immunol. Lett.* 70:1-3.
79. Biard-Piechaczyk, M., Robert-Hebmann, V., Richard, V., Roland, J., Hipskind, R.A., Devaux, C. 2000. Caspase-dependent apoptosis of cells expressing the chemokine receptor CXCR4 is induced by cell membrane-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein (gp120). *Virology* 268:329-44.
80. Berndt, C., Mopps, B., Angermuller, S., Gierschik, P., Krammer, P.H. 1998. CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:12556-61.
81. Gandhi, R.T., Chen, B.K., Straus, S.E., Dale, J.K., Lenardo, M.J., Baltimore, D. 1998. HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism. *J. Exp. Med.* 187:1113-22.
82. Noraz, N., Gozlan, J., Corbeil, J., Brunner, T., Spector, S.A. 1997. HIV-induced apoptosis of activated primary CD4+ T lymphocytes is not mediated by Fas-Fas ligand. *AIDS* 11:1671-80.
83. Blanco, J., Jacotot, E., Cabrera, C., Cardona, A., Clotet, B., De Clercq, E., Este, J.A. 1999. The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein

- induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling. *AIDS* 13:909-17.
84. Herbein, G., Van Lint, C., Lovett, J.L., Verdin, E. 1998. Distinct mechanisms trigger apoptosis in human immunodeficiency virus type 1-infected and in uninfected bystander T lymphocytes. *J. Virol.* 72:660-70.
85. Herbein, G., Mahlknecht, U., Batliwalla, F., Gregersen, P., Pappas, T., Butler, J., O'Brien, W.A., Verdin, E. 1998. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 395:189-94.
86. Cicala, C., Arthos, J., Rubbert, A., Selig, S., Wildt, K., Cohen, O.J., Fauci, A.S. 2000. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1178-83.
87. Algeciras-Schimnich, A., Vlahakis, S.R., Villasis-Keever, A., Gomez, T., Heppelmann, C.J., Bou, G., Paya, C.V. 2002. CCR5 mediates Fas- and caspase-8 dependent apoptosis of both uninfected and HIV infected primary human CD4 T cells. *AIDS* 16:1467-78.
88. Xu, X.N., Laffert, B., Screaton, G.R., et al. 1999. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J. Exp. Med.* 189:1489-96.
89. Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L., Viora, M. 2004. HIV-1 Nef equips dendritic cells to reduce survival and function of CD8+ T cells: a mechanism of immune evasion. *FASEB J.* 18:1459-61.
90. Cottrez, F., Manca, F., Dalglish, A.G., Arenzana-Seisdedos, F., Capron, A., Groux, H. 1997. Priming of human CD4+ antigen-specific T cells to undergo apoptosis by HIV-infected monocytes. A two-step mechanism involving the gp120 molecule. *J. Clin. Invest.* 99:257-66.
91. Tateyama, M., Oyaizu, N., McCloskey, T.W., Than, S., Pahwa, S. 2000. CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway. *Blood* 96:195-202.
92. Babior, B.M. 1999. NADPH Oxidase: An Update. *Blood* 93:1464-76.
93. Kuritzkes, D.R. 2000. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Clin. Infect. Dis.* 30:256-60.
94. Biswas, P., Mantelli, B., Sica, A., et al. 2003. Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. *Blood* 101:4452-6.
95. Salmen, S., Teran, G., Borges, L., Goncalves, L., Albarran, B., Urdaneta, H., Montes, H., Berrueta, L. 2004. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 137:166-72.
96. Cossarizza, A., Mussini, C., Borghi, V., et al. 1999. Apoptotic features of peripheral blood granulocytes and monocytes during primary, acute HIV infection. *Exp. Cell Res.* 247:304-11.
97. Badley, A.D., Dockrell, D., Simpson, M., Schut, R., Lynch, D.H., Leibson, P., Paya, C.V. 1997. Macrophage-dependent apoptosis of CD4+ T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 185:55-64.
98. Xu, X.N., Screaton, G. 2001. HIV-1 Nef: negative effector of Fas? *Nat. Immunol.* 2:384-5.
99. Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W. 2001. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 487:318-22.
100. Aoshiba, K., Yasui, S., Hayashi, M., Tamaoki, J., Nagai, A. 1999. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *J. Immunol.* 162:1692-700.
101. Klein, J.B., Rane, M.J., Scherzer, J.A., Coxon, P.Y., Kettritz, R., Mathiesen, J.M., Buridi, A., McLeish, K.R. 2000. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Immunol.* 164:4286-91.
102. Alvarado-Kristensson, M., Pörn-Ares, M.I., Grethe, S., Smith, D., Zheng, L., Andersson, T. 2002. Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis. *FASEB J.* 16:129-31.
103. Salmen, S., Guillermo, C., Colmenares, M., et al. 2005. Papel del virus de la inmunodeficiencia humana en la apoptosis de leucocitos de pacientes infectados. *Invest. Clin.* 46:289-305.
104. Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., Clarke, P.R. 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.* 5:647-54.
105. Khreiss, T., Jozsef, L., Chan, J.S., Filep, J.G. 2004. Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal* 16:810-10.
106. Alvarado-Kristensson, M., Melander, F., Leandersson, K., Ronnstrand, L., Wernstedt, C., Andersson, T. 2004. p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils. *J. Exp. Med.* 199:449-58.
107. Okada, H., Takei, R., Tashiro, M. 1997. HIV-1 Nef protein-induced apoptotic cytolysis of a broad spectrum of uninfected human blood cells independently of CD95(Fas). *FEBS Lett.* 414:603-6.
108. Okada, H., Takei, R., Tashiro, M. 1997. Nef protein of HIV-1 induces apoptotic cytolysis of murine lymphoid cells independently of CD95 (Fas) and its suppression by serine/threonine protein kinase inhibitors. *FEBS Lett.* 417:61-4.
109. Badley, A.D., Roumier, T., Lum, J.J., Kroemer, G. 2003. Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol. Sci.* 24:298-305.