

UNIVERSIDAD DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR, INMUNOLOGÍA Y
NEUROCIENCIAS

**Defensinas: moléculas de la inmunidad innata con actividad
frente a la infección por VIH y su progresión a SIDA.**

Memoria presentada por la licenciada en Medicina
Marta Rodríguez García
Para optar al grado de doctora en medicina por la Universidad de Barcelona

Esta tesis ha sido inscrita en el departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, y ha seguido el programa de doctorado “Biología y Patología Celulares”, bienio 2004-2006.

El Doctor Felipe García Alcaide, profesor asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y Consultor del Servicio de Enfermedades infecciosas del Hospital Clínico de Barcelona y la Doctora Nùria Climent Vidal, investigadora asociada del Servicio de Inmunología y del Servicio de Enfermedades infecciosas del hospital Clínico de Barcelona

CERTIFICAMOS: Que la memoria titulada “Defensinas: moléculas de la inmunidad innata con actividad frente a la infección por VIH y su progresión a SIDA” presentada por Marta Rodríguez García para optar al grado de Doctora en Medicina se ha realizado bajo nuestra dirección y reúne las condiciones necesarias para ser defendida delante del tribunal correspondiente.

Dr. Felipe García Alcaide

Dra. Nùria Climent Vidal

Barcelona, abril de 2009

A mi madre.

“No se puede esperar construir un mundo mejor sin mejorar a los individuos. Con tal fin cada uno de nosotros debe trabajar en su propia mejoría, y al mismo tiempo compartir una responsabilidad general con toda la humanidad, nuestra tarea particular es ayudar a aquellos para los que pensamos que podemos ser más útiles.”

Marie Curie.

AGRADECIMIENTOS.

Me resulta curioso haber llegado finalmente al momento de escribir los agradecimientos. Siento una mezcla de tristeza, por una etapa que termina, y de entusiasmo e ilusión, por un futuro que comienza.

Me gustaría agradecer a todos aquellos que durante estos cinco años me han acompañado en mi aventura y me han ayudado a ir construyendo piedra a piedra el camino hacia el final o quizá, mejor dicho, hacia el principio.

Me gustaría comenzar agradeciendo muy encarecidamente a la Dra. Teresa Gallart, mi mentora y mi maestra, una persona excepcional y una científica de un talento inigualable. Gracias Teresa por tus ideas geniales, gracias por todo lo que me has enseñado, gracias por tu entusiasmo y, sobre todo, gracias por haber creído en mí.

Quiero agradecer también a mis directores de tesis, Dr. Felipe García y Dra. Nuria Climent, por su inestimable ayuda para llevar a buen puerto este proyecto. Gracias Felipe por todo el tiempo que me has dedicado, por tu confianza y por tu ayuda para encaminar mi futuro hacia lo que realmente me gustaba. Gracias Nuria por estar ahí desde el principio hasta el final, por el día a día, por las risas y los buenos momentos y por tanta y tanta ciencia que he aprendido de ti.

Gracias a mi tutor de tesis, el Dr. Carles Enrich, por su ayuda para conseguir presentar esta tesis. Y a Nuria Morante, por su buen humor, eficacia y paciencia y facilitar tantísimo el papeleo.

Quisiera agradecer también muy sinceramente a todos los miembros del Servicio de Inmunología, el lugar que elegí para hacer la residencia, y que sin duda volvería a elegir si tuviera que hacerlo de nuevo. El lugar al que llegué recién salida de la universidad, llena de ilusión, y del que me voy satisfecha y con muchas metas cumplidas. A los adjuntos, los docotes y doctoras Jordi Yagüe, Jordi Vives, Ramón Vilella, Francisco Lozano, Jaume Martorell, Guadalupe Ercilla, Odette Viñas, Juanxo Arostegui, Carles Serra y Manel Juan, gracias a cada uno de vosotros por vuestro tiempo, vuestros consejos, por todo lo que me habéis enseñado y por haberme ayudado a crecer en lo profesional, lo científico y lo personal.

Gracias a las secretarias, Luisa, Montse y Merce, y a todas las técnicas de inmuno, Loli, Mar, Maite, Fina, Susana, Belén, Virginia, Angels, Pepa, Mari, Laura, Rosa, Jordi, Marisol, Paqui, Montse, Luchy, Isabel, M^o José, Elias y Juanjo, por el día a día, por enseñarme tanto cuando aún no sabía nada y por la gran compañía y ayuda en las noches y días de guardia. Gracias a la Juanita por aportar siempre tanta alegría.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio, sobre todo a los que ya se fueron. Los antiguos "Pacos", Idoia (gracias por haber sido

nuestra residente mayor, nuestro ejemplo a seguir), Mónica, Sandra, Anna, Montse. A Dani, que aunque ya no estaba cuando yo llegué, siempre ha sido una persona ejemplar para todos. Gracias también a los nuevos residentes, Mariona y Miguel, y a las nuevas incorporaciones del laboratorio: Esther y Maite, Lisy, Mario, todas las Cristinas, Mireia, Laura.

Gracias a los que se han convertido en más amigos que compañeros, Rafa, Xavi, María Rosa, Juanjo, gracias por vuestro enorme apoyo en los momentos difíciles, las interesantes charlas científicas y no científicas, la grata compañía en el comedor y en los cafés, por los viajes, las cenas, las risas, y tantas otras cosas que no podría enumerar.

Gracias a todos los miembros del "camarote", el lugar con más factor de impacto por metro cuadrado: Nuria, la post-doc del lab, Cristina y Laia, las doctoras rosaditas, Rodrigo, Chema y Víctor, toda una generación de talentos científicos, Isaac, el último incorporado y, por supuesto, Harold. Gracias por esa conexión especial entre todos los miembros del grupo y por ese ambiente de trabajo tan especial que ninguno de nosotros volverá a encontrar nunca. Gracias a Laia y Cristina por haberme ayudado tantísimo en tantas y tantas cosas, dentro y fuera del laboratorio, gracias por acogerme, por vuestra amistad, gracias por cada uno de los días que hemos compartido. Gracias Chema por todo lo que me has ayudado, por mostrarme que el camino existía y por acogerme en vuestro hogar, ya sabes, nos vemos en Boston. Gracias a Víctor por sus bromas y su ilusión. Gracias a Harold, mi maestro,...por todo, es difícil encontrar palabras para agradecer todo aquello por lo que me siento agradecida, por tu calidad científica, por tu excelencia como persona, por tu paciencia, tu saber estar, por ser un ejemplo a seguir, por tu confianza en mí, por enseñarme a no caer en el "lado oscuro" de la ciencia, gracias infinitas.

Gracias a Virginia (la principal "culpable" de que viniese a Barcelona), Willi y Nuria Amézaga, qué decir que no os haya dicho ya. Gracias por vuestra inestimable amistad, por vuestros consejos, por vuestra confianza en mí, vuestros ánimos cuando más los necesitaba, vuestro apoyo incondicional, por abrir el camino, gracias por todos esos días que pasamos juntos y que llevaré siempre conmigo en el corazón. Sin vosotros no estaría ahora escribiendo estas líneas.

Quiero agradecer también a todos los miembros de la Unidad de SIDA del servicio de Infecciosas, por toda su ayuda y consejos durante el desarrollo de este trabajo, especialmente al Dr. Gatell, Dra. Cristina Gil, Dra. Montserrat Plana, Dra. Agathe León, Dra. Anna López, Dr. Gilles Mirambeau, y al Dr. José María Miró, entre muchos otros. A todas las técnicas también, especialmente a Ana y Maite García por su ayuda con las muestras.

Agradezco también sinceramente al Dr. Thomas Moran y a los miembros de su grupo, especialmente Toni, María, Bruno y Juanro, por haberme acogido y haberme hecho sentir como en casa mientras estuve en Nueva York.

Como nota de humor, me gustaría agradecer a Rocco, el loro de Teresa, por todo lo que nos hemos reído gracias a él, y por hacerme poner “los pies en el suelo” en un momento en que lo necesitaba.

Finalmente me gustaría agradecer muy especialmente a Jared por su infinita paciencia y comprensión, por su amor, su calor y amistad insustituibles, por nuestro dulce día a día, por elegirme como compañera y ser mi compañero elegido, por querer embarcarse junto a mí rumbo a un emocionante futuro común.

ÍNDICE

i. INTRODUCCION.....	1
1. Infección por VIH.....	3
1.1 Epidemiología.....	5
1.2 Historia natural de la infección.....	6
1.3 Patogenia de la infección por VIH.....	8
1.3.1 Estructura del VIH.....	9
1.3.1.1 Morfología estructural del VIH.....	9
1.3.1.2 Organización del genoma viral.....	10
1.3.2 Ciclo de replicación del VIH.....	12
1.3.3 Inmunopatología de la infección por VIH.....	15
1.3.4 Papel de la respuesta inmune en individuos que controlan la infección por VIH.....	18
1.3.4.1 Prevalencia e historia natural de los controladores del VIH.....	19
1.3.4.2 Mecanismos potenciales que protegen frente al VIH en individuos controladores.....	21
1.3.4.2.1 Factores genéticos del huésped.....	21
1.3.4.2.2 Inmunidad innata.....	23
1.3.4.2.3 Inmunidad celular CD8+.....	26
1.3.4.2.4 Inmunidad celular CD4+.....	27
1.3.4.2.5 Inmunidad humoral.....	29
1.3.4.2.6 Inmunidad innata intracelular.....	30
1.3.4.2.7 Virus atenuados.....	31
2. Células dendríticas.....	32
2.1 Subpoblaciones de DC.....	33
2.2 DC e infección por VIH.....	33
2.3 Células dendríticas derivadas de monocitos como modelos <i>in</i> <i>vitro</i>	35
2.4 Transmisión del VIH por las DC.....	36
3. Defensinas.....	38
3.1 Características generales de las defensinas.....	40
3.1.1 Clasificación y estructura.....	40

3.1.2 Estructura genómica.....	42
3.1.3 Fuentes celulares y distribución en los tejidos.....	44
3.1.4 Defensinas como moléculas efectoras y reguladoras de la inmunidad innata.....	46
3.1.4.1 Efecto antimicrobiano directo.....	46
3.1.4.2 Defensinas como agentes quimiotácticos.....	48
3.1.4.3 Inducción de mediadores inflamatorios.....	49
3.1.5 Defensinas como potenciadores de la inmunidad adaptativa.....	49
3.1.5.1 Reclutamiento de DC.....	49
3.1.5.2 Maduración de DC.....	50
3.2 Defensinas y VIH.....	50
3.2.1 Actividad anti-VIH de las α -defensinas1-3.....	51
3.2.1.1 Efecto inhibitorio directo de las α -defensinas1-3 sobre el VIH.....	52
3.2.1.2 Efecto de las α -defensinas1-3 sobre las células diana del VIH.....	54
3.2.1.3 Evidencias del efecto anti-VIH de las α -defensinas 1-3 <i>in vivo</i>	57
4. Justificación del estudio.....	58
ii. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	61
1. Hipótesis.....	63
2. Objetivos.....	63
iii. MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
1. Generación de células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC).....	67
1.1 Selección por adherencia.....	67
1.2 Selección por bolitas magnéticas.....	68

2. Aislamiento de células dendríticas mieloides (myDC) circulantes de sangre periférica.....	69
3. Aislamiento de linfocitos totales y linfocitos naïve.....	69
4. Análisis mediante citometría de flujo.....	70
4.1 Análisis de moléculas de superficie.....	70
4.2 Análisis de defensinas intracelulares.....	70
5. Inmunotinción para análisis mediante microscopia confocal.....	71
6. ELISA.....	73
7. Expresión relativa de mRNA mediante RT-PCR en tiempo real.....	73
8. Secuenciación.....	75
9. Tratamientos celulares.....	75
9.1 Ensayos de estimulación con α -defensinas1-3.....	75
9.2 Tratamientos hormonales.....	77
9.3 Ensayos de infección con NDV-B1 y NDV-NS1.....	77
10. Medición de citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes.....	77
11. Detección de apoptosis y necrosis.....	77
12. Cultivo mixto leucocitario.....	78
12.1 Cultivo alogénico tras incubación con defensinas.....	78
12.2 Cultivo alogénico para la medición de defensinas en sobrenadante.....	78
13. Estudio de la producción de α -defensinas1-3 en individuos infectados y no infectados por VIH.....	79
13.1 Cohortes de individuos incluidos en el estudio.....	79
13.2 Muestras necesarias para el estudio.....	80
13.3 Análisis estadístico.....	80
iv. RESULTADOS.....	81

1. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANAS PRODUCEN Y SECRETAN α -DEFENSINAS-1-3.....	83
1.1 Expresión relativa de mRNA de α -defensinas-1-3 en MDDC.....	83
1.2 Detección intracelular de α -defensinas-1-3 en MDDC.....	84
1.3 Secreción de α -defensinas1-3 por las MDDC.....	85
1.4 Producción de α -defensinas 1-3 tras estimulación de las MDDC	

con citocinas proinflamatorias.....	87
1.5 La completa maduración de las células dendríticas por distintos agentes madurativos disminuye la producción de α -defensinas 1-3.....	88
2. LA INFECCIÓN VIRAL MODULA LA SECRECIÓN DE α -DEFENSINAS 1-3 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS Y EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MIELOIDES (CD1c+) CIRCULANTES. IMPORTANCIA DEL EFECTO ESTROGÉNICO.....	90
2.1 Las DC mieloides (CD1c+) circulantes aisladas de sangre también, al igual que las MDDC, producen α -defensinas 1-3.....	90
2.2 Las DC mieloides (CD1c+) circulantes responden más robustamente a la infección viral que las MDDC.....	92
2.3 El desarrollo de una respuesta antiviral por las DC modula la secreción de α -defensinas1-3.....	93
2.4 El estrógeno, pero no la progesterona, reduce la secreción de α -defensinas1-3 en MDDC y myDC.....	95
2.5 El cocultivo alogénico de MDDC con células T indujo la secreción de α -defensinas1-3 y fue también susceptible a regulación hormonal.....	97
3. IMPACTO DE LAS α -DEFENSINAS 1-3 SOBRE LA MADURACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS DC DERIVADAS DE MONOCITOS. EFECTOS OPUESTOS DEPENDIENTES DE LA CONCENTRACIÓN.....	99
3.1 Las α -defensinas 1-3 modifican la morfología de las DCs.....	99
3.2 El inmunofenotipo de maduración de las DC se vio modificado tras incubación con α -defensinas 1-3.....	101
3.3 El patrón de producción de citocinas por las DC se ve alterado tras tratamiento con α -defensinas 1-3.....	104
3.4 Las α -defensinas 1-3 inducen la producción de IL-8 por DCs.....	106
3.5 La capacidad aloestimuladora de las MDDCs se ve modificada tras incubación con α -defensinas 1-3.....	107
3.6 Las α -defensinas 1-3 interfieren el proceso de diferenciación de las MDDCs.....	109

4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE α -DEFENSINAS 1-3 POR LAS MDDC DE PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH Y SU INFLUENCIA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	114
4.1 Determinación de los niveles fisiológicos de α -defensinas 1-3 producidos por las MDDC de individuos sanos no infectados por el VIH.....	114
4.2- Determinación de los niveles de α -defensinas 1-3 producidos por las MDDC de individuos infectados por el VIH.....	116
4.3 Comparación entre los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por individuos no infectados e individuos infectados por VIH.....	117
4.4 Comparación entre los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por DC de individuos infectados por VIH.....	117
4.5 Los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por las MDDC inmaduras se correlacionan con los niveles de células T CD4+.....	119
4.6 Análisis de los niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3 en los individuos infectados por VIH.....	121
4.7 Niveles mayores de producción de α -defensinas1-3 por las DC se asociaron a un menor riesgo de progresión de la infección por VIH.....	123
v. DISCUSIÓN.....	127
1. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANAS PRODUCEN Y SECRETAN α -DEFENSINAS-1-3.....	129
2. LA INFECCIÓN VIRAL MODULA LA SECRECIÓN DE α -DEFENSINAS 1-3 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS Y EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MIELOIDES CD1c+ CIRCULANTES. IMPORTANCIA DEL EFECTO ESTROGÉNICO.....	132
3. IMPACTO DE LAS α -DEFENSINAS 1-3 SOBRE LA MADURACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS DC DERIVADAS DE MONOCITOS. EFECTOS OPUESTOS DEPENDIENTES DE LA CONCENTRACIÓN.....	137
4. LAS MDDC DE INDIVIDUOS INFECTADOS POR VIH PRODUCEN MAYORES NIVELES DE α -DEFENSINAS1-3 Y ESTOS NIVELES SE ASOCIAN CON UNA MENOR PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	144
vi. CONCLUSIONES.....	155
vii. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	159

ABREVIATURAS

APOBEC	Polipéptido catalítico, enzima editora del mRNA de la apolipoproteína B
APC	Célula presentadora de antígeno
AZT	Acidotimidina (Zidovudina:análogo de la timidina)
BSA	Albúmina de suero bovino
CCR5	Receptor 5 de quimiocinas de la familia CC
CD	Cluster de diferenciación
CTL	Célula T citotóxica
CTLA-4	Proteína 4 asociada a células T citotóxicas
CV	Carga viral
CXCR4	Receptor 4 de quimiocinas de la familia CXC
DC	Célula dendrítica
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
ENI	Individuos expuestos al VIH no infectados
FCS	Suero fetal de bovino
HAART	Terapia antirretroviral de gran actividad
HC	Individuos no infectados, controles sanos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HBD	Defensinas humanas beta
HNP	Peptides de los neutrófilos humanos
Ig	Inmunoglobulina/s
IgG	Ig de clase G
IL	Interleuquina
kDa	KiloDaltons
LTNP	Individuos VIH+, no progresores de alta duración
LTR	Terminación larga y repetitiva
MDDC	Células dendríticas derivadas de monocitos
MFI	Intensidad media de fluorescencia
mAb	Anticuerpo monoclonal
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
myDC	Células dendríticas mieloides circulantes
NK	Células asesinas naturales (natural killers)
OD	Densidad óptica
OMS	Organización mundial de la salud
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PKC	Proteína cinasa C
PVL	Carga viral plasmática

RNA	Ácido ribonucleico
RT	Retrotranscriptasa inversa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV	Virus de la inmunodeficiencia de los simios
TCR	Receptor de antígeno del linfocitos T
TEMED	N,N,N';N'-Tetrametiletilendiamina
TNF-α	Factor de necrosis tumoral de tipo α
Tween-20	Monolaureato de Polioxietileno Sorbitano
VC	Paciente controladores de la viremia
VIH-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana de tipo 1
VNC	Pacientes no controladores de la viremia por VIH.

i. INTRODUCCIÓN

1. INFECCIÓN POR VIH.

Se cumplen ya veinticinco años desde el descubrimiento del agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), por Barré-Sinoussi y Montagnier en 1983¹⁷. Aún así, más de dos décadas después de este descubrimiento, la epidemia global no ha podido ser controlada, continúa expandiéndose, y más de 60 millones de personas han sido infectadas en todo el mundo⁵⁰.

Hoy en día, en los países desarrollados, la infección por VIH se ha convertido en una enfermedad crónica gracias, fundamentalmente, al desarrollo de terapia antirretroviral⁵⁷. El desarrollo de los nuevos fármacos antivirales en 1995 marcó sin duda una gran diferencia en la evolución de la enfermedad, pero vino a mostrar que a pesar de disponer de tratamientos eficaces frente al virus, esta infección sigue siendo una enfermedad incurable y es cada vez más evidente que el tratamiento *per se* no será capaz de acabar con la pandemia de SIDA. Es más, la gran mayoría de personas que viven con VIH/SIDA se encuentran en países subdesarrollados, donde estos tratamientos no están disponibles, el acceso a los avances científicos y las nuevas terapias es difícil, y menos de un tercio de las personas que necesitan terapia antirretroviral pueden conseguirla. Las infecciones de novo

superan con creces la capacidad para tratar a cada persona infectada, aproximadamente tres personas se infectan por cada persona que se pone en tratamiento. Sin olvidar el hecho de que la terapia anti-VIH actual supone un compromiso de por vida⁵⁷.

A pesar de la gran heterogeneidad en la secuencia del VIH, que puede llegar hasta casi el 40% de la envoltura proteica, el curso clínico de la enfermedad es en la mayoría de los casos bastante predecible. Los síntomas iniciales son similares una mononucleosis infecciosa, con fiebre, faringitis, linfadenopatías y astenia, seguido por un periodo asintomático de aproximadamente 8-10 años en personas sin tratamiento, durante el cual continúa la replicación viral y se produce una pérdida progresiva de las células T CD4 mediada por el VIH. La mayoría de los pacientes sin tratamiento desarrollan finalmente una inmunodeficiencia profunda y mueren, aproximadamente 10 años después de adquirir la infección, por complicaciones asociadas al SIDA⁵⁰.

El control último de la epidemia por VIH requiere prevención de nuevas infecciones y, a medida que la epidemia global continúa expandiéndose, se hace cada vez más necesaria una vacuna preventiva eficaz. Se ha dicho, sin embargo, que el desarrollo de una vacuna preventiva frente al VIH podría no ser factible¹¹⁹ y, por lo tanto, la mayoría de estrategias actuales se están enfocando en alcanzar una vacuna terapéutica que proteja frente a la progresión de la enfermedad sin necesidad de estar expuestos al tratamiento

antirretroviral continuado. Esta estrategia terapéutica podría limitar la epidemia global de forma similar a una vacuna preventiva, siempre que en las personas vacunadas se mantenga una carga viral lo suficientemente baja como para prevenir una nueva transmisión del virus⁸¹.

1.1 Epidemiología.

Se estima que existen actualmente alrededor de 33,2 millones personas infectadas por el VIH-1 en todo el mundo, de las cuales, aproximadamente 2 millones son niños, y que cerca de 25 millones personas ya han muerto a causa de esta infección. Sólo durante el año 2007 se infectaron unos 2,5 millones de personas y murieron a causa del SIDA aproximadamente 2 millones de personas (Tabla 1).

Global summary of the AIDS epidemic, December 2007		
Number of people living with HIV in 2007	Total	33 million [30 – 36 million]
	Adults	30.8 million [28.2 – 34.0 million]
	Women	15.5 million [14.2 – 16.9 million]
	Children under 15 years	2.0 million [1.9 – 2.3 million]
People newly infected with HIV in 2007	Total	2.7 million [2.2 – 3.2 million]
	Adults	2.3 million [1.9 – 2.8 million]
	Children under 15 years	370 000 [330 000 – 410 000]
AIDS deaths in 2007	Total	2.0 million [1.8 – 2.3 million]
	Adults	1.8 million [1.6 – 2.1 million]
	Children under 15 years	270 000 [250 000 – 290 000]

Tabla 1. Informe de la OMS de 2007 sobre la epidemia de SIDA.

Esta estimación enmascara la naturaleza dinámica de esta epidemia en relación a cambios temporales, distribución geográfica, magnitud, diversidad viral, y modo de transmisión. Lo cierto es que hoy en día no existe ningún lugar en el mundo en el que no exista esa infección. En la figura 1 se muestra la distribución mundial de la pandemia por VIH.

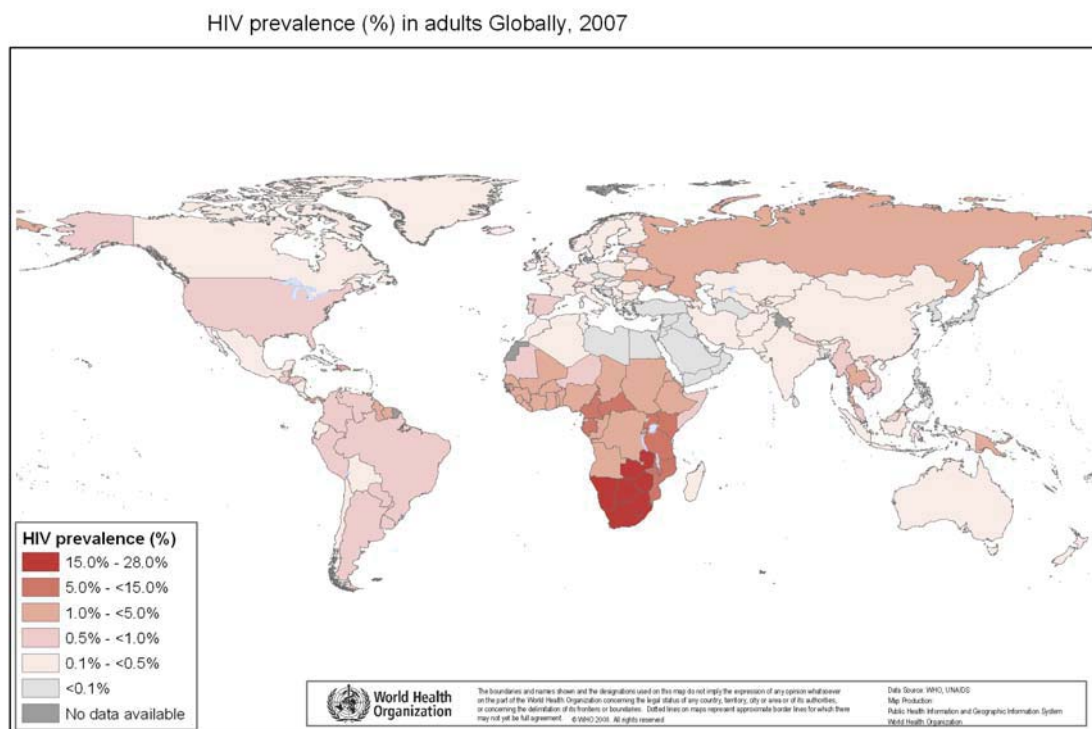


Figura 1. Distribución mundial de la infección por VIH en 2007 según la OMS.

1.2. Historia natural de la infección.

En todo el mundo, la vía de transmisión del VIH más común es la vía sexual. Es muy baja la probabilidad de transmisión en un único contacto heterosexual (0,001%) y está proporcionalmente relacionada con la carga viral plasmática, siendo muy infrecuente cuando estos

valores se encuentran por debajo de 1500 copias/ml⁶⁴. Se han identificado además otros factores implicados en el riesgo de transmisión, como la ausencia de circuncisión, la presencia de inflamación en el epitelio vaginal (debido a enfermedades de transmisión sexual, uso de nonoxinol-9, vaginosis bacteriana, etc.) y la ectopia cervical^{8,129,150}.

La historia natural que se describe a continuación es aquella que se produciría en ausencia de HAART (*Highly Active AntiRetroviral Therapy*).

El síndrome viral agudo o "infección primaria" se define como el periodo de tiempo desde la infección inicial con VIH hasta el desarrollo de una respuesta de anticuerpos y se caracteriza por una sintomatología similar a la mononucleosis infecciosa¹⁹⁸. Estos síntomas aparecen tras días o semanas de la exposición al VIH, aunque no se producen en todos los pacientes. Durante la infección aguda por VIH, normalmente hay alta viremia en plasma y frecuentemente un marcado descenso de células T CD4+. Estos niveles de células T CD4+ vuelven a incrementar más tarde, aunque por lo general no alcanzan los niveles que había antes de la infección.

Tras la infección aguda, se llega habitualmente a un equilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmune del huésped y muchos de los individuos infectados no tienen manifestaciones de la infección por VIH durante años. Incluso en ausencia de tratamiento antirretroviral, este periodo de latencia clínica puede durar 8-10 años o más. Durante este

periodo se va produciendo una progresiva pérdida de células T CD4+ y un aumento de la carga viral.

Al final del periodo de latencia pueden aparecer una serie de síntomas o enfermedades que no cumplen criterios de SIDA. En este punto, niveles de células T CD4+ de 200 células/ul es un importante límite por debajo del cual aumenta el riesgo de enfermedades definitorias de SIDA.

Sin embargo, el curso de la infección puede variar considerablemente y, en algunos casos, la progresión a SIDA ocurre rápidamente. Factores del huésped y del virus determinan fundamentalmente si un individuo infectado por VIH desarrollará una inmunodeficiencia rápidamente o permanecerá asintomático durante muchos años, como se discute extensamente en el apartado 3.3.

1.3 Patogenia de la infección por VIH.

La expansión del VIH a lo largo de todo el mundo indica que el virus es capaz de contrarrestar eficazmente tanto la inmunidad innata como la adaptativa. A pesar del modesto tamaño de su genoma (menos de 10 kb) y sus pocos genes, el VIH-1 es capaz de aprovecharse de los mecanismos celulares y al mismo tiempo neutralizar y evitar los distintos componentes del sistema inmune¹⁹⁹. El conocimiento de la inmunopatogenia de la infección por VIH es un requisito fundamental para mejorar las estrategias terapéuticas y desarrollar nuevas inmunoterapias y vacunas preventivas.

1.3.1 Estructura del VIH.

El VIH-1 es un retrovirus que pertenece a la familia de los lentivirus. Las infecciones por lentivirus se caracterizan por un curso crónico de la enfermedad, un largo periodo de latencia clínica, una replicación viral persistente y afectación del sistema nervioso central.

1.3.1.1. Morfología estructural del VIH.

Las partículas virales del VIH (VIH-1) tienen un diámetro de 100 nm y están recubiertas por una membrana lipoproteica²¹⁷ (fig.2A). Cada partícula viral contiene 72 complejos glicoproteicos que están integrados en la membrana lipídica y cada uno de ellos a su vez está compuesto de trímeros de una glicoproteína externa, gp120, y una transmembrana, gp41^{73,138}. La unión entre gp120 y gp41 es débil y por tanto la gp120 puede liberarse al medio espontáneamente. Además, durante el proceso de gemación que se describirá más adelante, el virus puede incorporar distintas proteínas de la membrana de la célula infectada a su propia membrana lipoproteica, como por ejemplo moléculas de HLA de clase I y II, o moléculas de adhesión como ICAM-1, que facilitan la adhesión a otras células diana. La proteína de la matriz p17 se ancla al interior de la membrana lipoproteica viral. El antígeno del core p24 contiene dos copias de RNA VIH-1. El RNA VIH-1 forma parte del complejo proteína-ácido nucleico compuesto por la nucleoproteína p7 y la transcriptasa reversa p66 (RT). La partícula viral contiene toda la maquinaria enzimática necesaria para la replicación: la RT, la integrasa p32 y la proteasa p11⁶³.

1.3.1.2 Organización del genoma viral.

La mayoría de retrovirus con replicación competente dependen de tres genes: *gag* (*group antigen*), *pol* (*polimerasa*) y *env* (*envelope*)¹⁹³. El esquema estructural clásico del genoma retroviral es: 5'LTR-*gag*-*pol*-*env*-LTR 3'. Las regiones LTR (*long terminal repeat*) representan los dos extremos del genoma viral, que se encuentra conectado al DNA celular del huésped tras la integración y no codifican para ninguna proteína viral. Los genes *gag* y *env* codifican para la nucleocápside y las glicoproteínas de la membrana viral. El gen *pol* codifica la RT y otros enzimas (fig.2B).

Además el VIH-1 contiene seis genes (*vif*, *vpu*, *vpr*, *tat*, *rev* y *nef*)^{19,180} que fueron clasificados como genes accesorios, ya que no se consideraron necesarios para la replicación *in vitro*. *Nef*, *tat* y *rev* se producen tempranamente en el ciclo de replicación viral. *Tat* y *rev* son proteínas reguladoras¹⁵³ que se acumulan en el núcleo y se unen a regiones definidas del RNA viral: TAR (*transactivation-response elements*), que se encuentran en la región LTR, y RRE (*rev response elements*), que se encuentran en el gen *env*, respectivamente. La proteína *tat* es un potente activador transcripcional de la región promotora de LTR y es esencial para la replicación viral en casi todos los sistemas de cultivo *in vitro*. *Tat* y *rev* estimulan la transcripción del DNA proviral en RNA, promueven la elongación del RNA y aumentan el transporte de RNA viral del núcleo al citoplasma y son esenciales para traducción. *Rev* también es un factor de exportación nuclear importante para el cambio

desde las proteínas reguladoras que se expresan tempranamente a las proteínas estructurales que se sintetizan posteriormente.

Nef ha mostrado tener diversas funciones. Puede inducir down regulación de CD4³ y moléculas de HLA de clase I de la superficie de la célula infectada, lo que representaría un importante mecanismo del virus para evadir un ataque mediado por células T CD8⁺ citotóxicas y evadir reconocimiento por células T CD4⁺. Además, *nef* puede interferir con la activación de las células T uniéndose a diversas proteínas involucradas en vías de señalización intracelular.

Vpr parece ser esencial para la replicación viral en células que no están dividiéndose, como macrófagos por ejemplo. Además se ha mostrado que es importante para el transporte del complejo de preintegración en el núcleo y puede arrestar células en la fase G2 del ciclo celular¹⁴⁷.

Vpu es importante para el proceso de gemación de virus ya que mutaciones en vpu se asocian con permanencia de las partículas virales en la superficie de la célula infectada.

Publicaciones recientes aportan nuevas e importantes funciones para vif en apoyar la replicación viral. Vif será comentado más adelante.

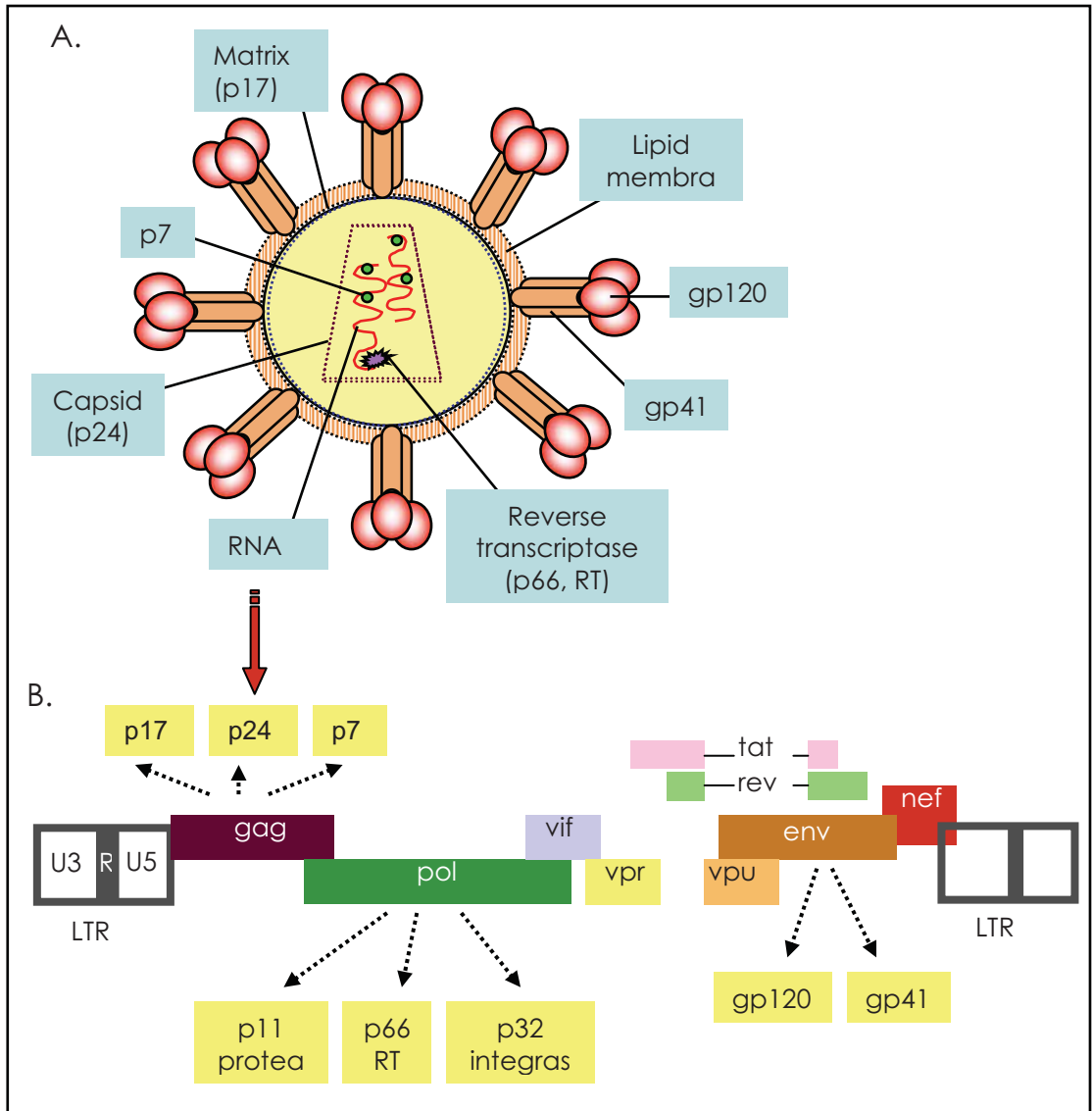


Figura 2. Estructura (A) y organización del genoma (B) del VIH.

1.3.2 Ciclo de replicación viral.

El ciclo de replicación del VIH es complejo y su duración y desenlace depende del tipo de célula diana y de la activación celular¹⁹⁹.

En las fases tempranas, el VIH gana acceso a las células sin causar daños letales inmediatamente, pero el proceso de entrada puede estimular cascadas de señalización intracelular que a su vez pueden facilitar la replicación viral^{11,39}.

Las dos moléculas de la envoltura del VIH, gp120 y gp41, forman “espinas” en la superficie del virión¹⁷³. Durante el proceso de entrada, gp120 se une a la membrana celular gracias a la unión al receptor CD4. Continúa una interacción entre el virus y el receptor de quimiocinas CCR5 o CXCR4 que desencadena cambios conformacionales irreversibles^{54,173}. La fusión tiene lugar en minutos gracias a la formación de un poro^{54,162} y la liberación del core viral al citoplasma celular. Una vez que el core se desensambla, el genoma viral sufre una transcripción inversa a DNA gracias a la RT del propio virus. Durante este proceso pueden generarse virus relacionados pero diferentes ya que la RT tiene propensión a cometer errores y no posee una actividad correctora. En el punto medio de la infección, la proteína viral integrasa, junto con enzimas de reparación del DNA del huésped, inserta el genoma viral en dominios ricos en genes transcripcionalmente activos del DNA cromosómico del huésped^{148,186,189}. LEDGF/p75, un factor de unión a la integrasa del huésped, facilita la integración^{40,211} y marca el punto de no retorno con la transformación irreversible de la célula en un productor potencial de virus.

Durante la fase tardía, la producción de partículas virales necesita de la ayuda de factores virales y del huésped. Las proteínas virales son transportadas y ensambladas en las proximidades de la membrana celular. El virus no es lítico y toma ventaja de las vías de transporte de vesículas (ESCRT-I, II, III) que normalmente media la gemación de endosomas en cuerpos multivesiculares¹³⁴. El VIH alcanza esta vía por

unión a TSG101 a través de su dominio tardío, una secuencia corta del motivo de p6 en Gag^{72,133}. El corte de la poliproteína Gag-Pol por la proteasa viral produce viriones infecciosos maduros²³⁰.

Dado que moléculas citoplasmáticas de la célula productora y componentes de la bicapa lipídica de la superficie celular son incorporados en la nueva partícula viral, los viriones tendrán características propias de las células en las que fueron producidos³⁰. La incorporación de estas moléculas del huésped permite determinar el fenotipo del virus de diversas maneras, como por ejemplo configurar los rasgos replicativos en el siguiente ciclo o mediar activación inmune en células del entorno³⁰.

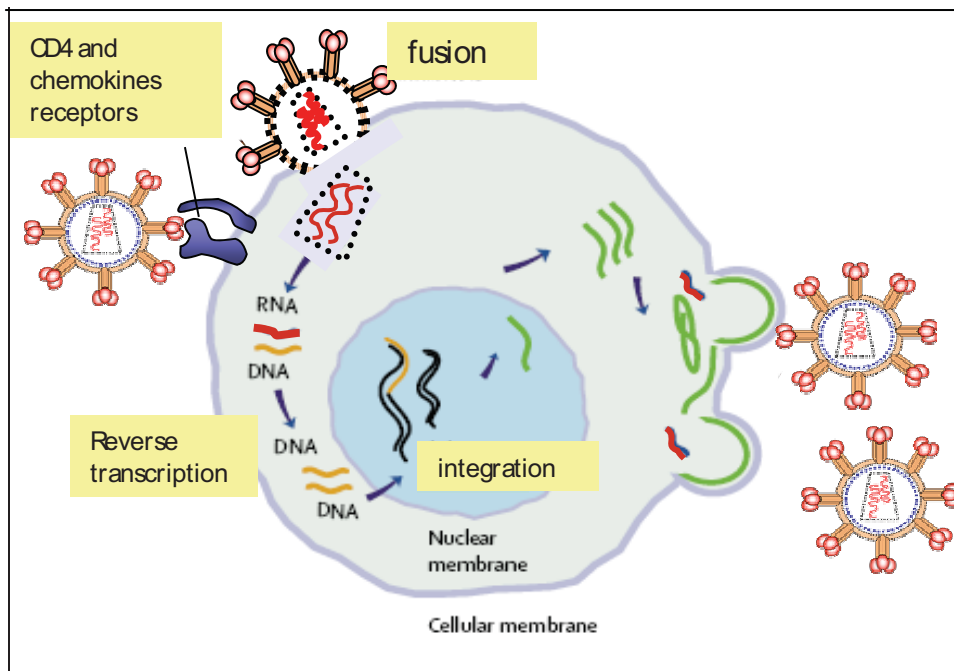


Figura 3. Esquema del ciclo de replicación del VIH. Adaptado de Simon et al, 2006.

1.3.3 Immunopatología de la infección por VIH.

Los estudios sobre los eventos tempranos que ocurren una vez que el VIH alcanza la barrera mucosa parecen indicar la existencia de un periodo ventana en el cual la propagación viral no está establecida aún y las defensas del organismo podrían potencialmente controlar la expansión viral⁸⁶. Los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 son dos importantes correceptores para la infección por VIH. La mayoría de las infecciones *de novo* se establecen por variantes virales que requieren el correceptor CCR5, por lo que se denominan cepas R5, independientemente de la vía de transmisión²⁶. En contraposición, los virus que requieren el correceptor CXCR4, denominados cepas X4, aparecen generalmente en estadios más avanzados de la infección y se asocian con un aumento de la patogenicidad y progresión de la enfermedad⁴³.

Los estudios realizados en modelos de primates no humanos sugieren que la infección por vía vaginal da lugar a la infección de un pequeño número de células T CD4+, macrófagos y células dendríticas que se encuentran en la lámina propia⁸⁶. Las vías potenciales para la transmisión del virus incluyen endocitosis, transcitosis y unión del virus a receptores de manosa de lectina tipo C de células dendríticas y macrófagos¹⁹⁵. La replicación inicial tiene lugar en los órganos linfoides regionales, se compone de pocas variantes virales y da lugar a una modesta amplificación primaria. La infección masiva de células susceptibles se produce con la migración de las células T infectadas o

los viriones al torrente sanguíneo y una segunda amplificación en tracto gastrointestinal, bazo y médula ósea. Este pico de viremia se encuentra temporalmente muy relacionado con los síntomas clínicos que pueden manifestarse durante la infección primaria. Los niveles de viremia que más tarde caracterizarán la fase crónica de la infección en un individuo (*viral set point*) se diferencian del pico de viremia inicial en uno o dos órdenes de magnitud. Esta reducción de la viremia se atribuye a la respuesta CD8+ VIH-específica pero también podría estar en parte limitada por las propias células diana. En las etapas tempranas de la transmisión la población viral es más homogénea pero, a medida que las quasi-especies virales se diversifican en distintos compartimentos biológicos, se generan virus mutantes resistentes a la neutralización por anticuerpos, a las células T citotóxicas o a la terapia antirretroviral, y se almacenan en células de larga vida constituyendo los reservorios virales¹⁹⁹.

En individuos identificados tempranamente tras la infección se ha observado una importante depleción de las células T CD4+ activadas y memoria que se localizan en los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT)¹⁴². Esta depleción preferencial de las células T CD4+ en los tejidos linfoides asociados a mucosas se mantiene a pesar de años de tratamiento antirretroviral, lo que contrasta con el hecho de que el número de células T CD4+ en sangre periférica puede volver a la normalidad con este tratamiento.

La infección por VIH se caracteriza por una destrucción gradual de células T CD4+ naive y memoria que culmina con la aparición del SIDA⁵³. A pesar de la ausencia de síntomas durante las fases temprana y crónica, la replicación viral es dinámica a lo largo de toda la enfermedad. La vida media de un único virión es tan corta, que la mitad de toda la población viral en plasma es reemplazada en menos de 30 minutos¹⁷⁰ y el número total de viriones producidos en una persona con infección crónica puede alcanzar más de 10^{10} partículas virales por día^{170,198}. Las tasas de movimiento de las poblaciones linfocitarias se encuentran aumentadas varias veces durante la infección por VIH, mientras que la proliferación disminuye cuando la replicación viral se reduce gracias al tratamiento^{110,149}. Se han propuesto distintos mecanismos para justificar esta depleción y, en general, se acepta que es la activación inmune la causa de la constante depleción del reservorio de células T CD4+⁴⁶.

La activación inmune puede predecir la progresión de la enfermedad⁷⁵ y por tanto parece ser un rasgo central en la patogenia de la infección por VIH. Recientemente se describió que las proteínas Nef del VIS (virus de la inmunodeficiencia de los simios), que no son patogénicas para su huésped natural, son capaces de down-regular el receptor CD3 de las células T, dando lugar a una reducida activación celular y apoptosis¹⁸⁷. Sin embargo, la proteína Nef del VIH no puede apagar la activación de células T.

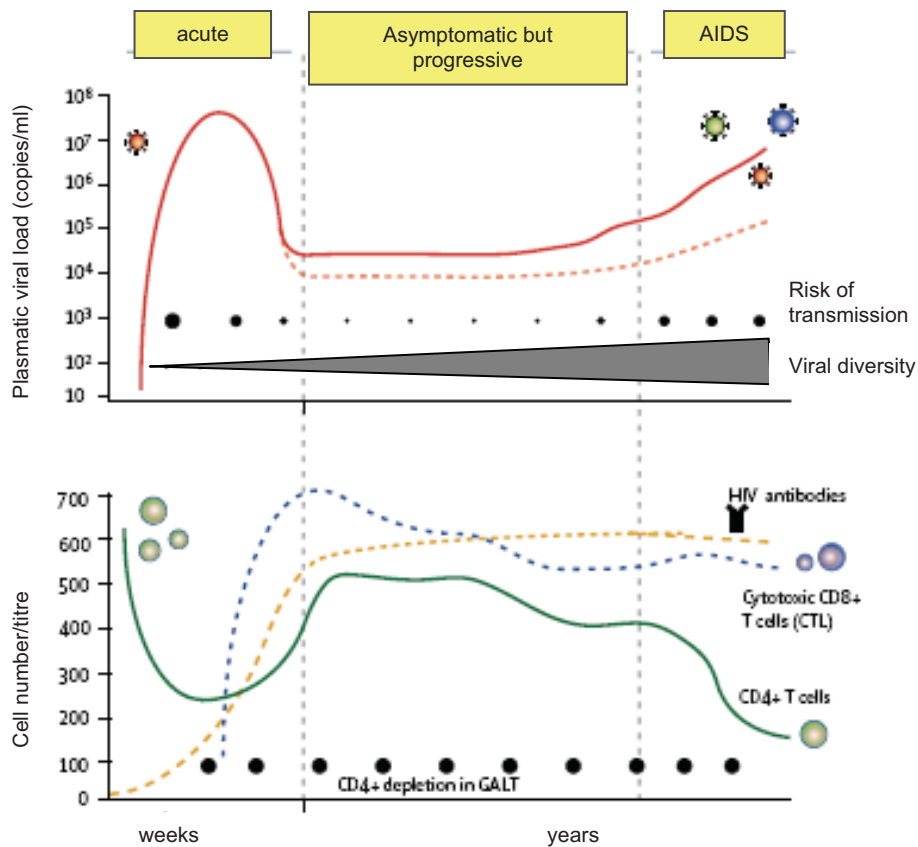


Figura 4. Curso de la infección por VIH. (Adaptado de Simon et al, 2006)

1.3.4 Papel de la respuesta inmune en individuos que controlan la infección por VIH.

El conocimiento y comprensión de los mecanismos inmunes que llevan a la protección o control duradero de la infección por VIH es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas⁵⁰.

La resistencia natural a la infección por VIH es rara y varía considerablemente entre los distintos individuos. Entre los factores de resistencia del huésped descritos hasta el momento se encuentran, entre otros, distintos haplotipos de HLA, autoanticuerpos, mutaciones en regiones promotoras y codificadoras de los correceptores CCR5 y CCR2

y la inducción de producción de citocinas. En la tabla 2 se resumen estos factores que seguidamente se discuten.

Factores genéticos	Inmunidad innata	Inmunidad adaptativa
Haplotipos HLA (B57, B27) HCP5	KIR3DS1	Actividad citotóxica T CD8 específica
Gen/promotor CCR5 Gen/promotor CCR2 Nº copias gen CCL3L1	Polimorfismos TLR9 DC plasmacitoides APOBEC3G	Función células T helper CD4 específicas Anticuerpos neutralizantes

Tabla 2. Factores de resistencia del huésped frente a la infección por VIH.

Existe un porcentaje muy pequeño de individuos en los que se produce un estado de aparente control de la replicación viral en ausencia de tratamiento antirretroviral⁵⁰. Estas personas poseen anticuerpos frente al VIH pero mantienen cargas virales indetectables por las pruebas clínicas habituales, es decir, cargas virales plasmáticas menores de 50-75 copias de RNA por ml. Estos individuos, denominados “controladores de élite” son extremadamente raros, con una frecuencia estimada menor del 1% de la población infectada⁹⁶. Algunos de estos individuos tienen ya una infección documentada de más de 25 años, constituyendo así una evidencia clara de que el control duradero del VIH en ausencia de tratamiento es posible. Por lo tanto, comprender los mecanismos de control del VIH en estos individuos probablemente proporcionará información crítica para nuevas estrategias vacunales y terapéuticas.

1.3.4.1. Prevalencia e historia natural de los controladores del VIH.

La gran mayoría de individuos infectados por VIH en ausencia de tratamiento antirretroviral, muestran una evidente replicación viral y una

pérdida progresiva de células T CD4. Sin embargo, una pequeña proporción de individuos infectados (5-15%) se mantiene clínica o inmunológicamente estable durante años^{31,151,158,196}. Para este tipo de individuos se acuñó el término “no progresor de larga duración” (LTNP, *long term nonprogressor*) que en general se basaba en la duración de la infección y los niveles de células T CD4, ya que las pruebas para determinar la carga viral no estuvieron disponibles hasta mitad de los años 90. Cuando la determinación de la carga viral (CV) estuvo disponible, se comprobó que en realidad los individuos LTNP constituían un grupo heterogéneo, mostraban niveles bajos o moderados de viremia, y un mayor seguimiento mostró que, en realidad, muchos tenían CV que aumentaban progresivamente junto con un descenso de CD4^{77,113,154,177}. Por otro lado, se descubrió que un subgrupo de estos individuos era capaz de mantener niveles de CV por debajo de los límites de detección (controladores de élite).

Los factores epidemiológicos asociados a control completo o casi completo del VIH *in vivo* no han sido definidos. Parece que las personas que se convierten en controladores de élite tienen infección primaria sintomática con menor frecuencia que los individuos con CV detectables, sugiriendo que las complejas interacciones entre virus y huésped que dan lugar a un control mantenido de la replicación viral ya tienen lugar durante las fases más tempranas de la enfermedad por VIH⁷. La vía de adquisición no se asocia con la probabilidad de tener una CV indetectable sin tratamiento. El género tampoco es un factor

limitante, ya que hay controladores de élite tanto hombres como mujeres, aunque la media de RNA plasmático (*set point*) es menor en mujeres que hombres, independientemente de otros factores²⁰⁶. El impacto potencial sobre factores inmunológicos o virológicos del subtipo viral, localización geográfica o raza sigue sin conocerse, aunque los controladores de élite se han encontrado en múltiples etnias y han sido infectados con distintos subtipos virales⁵⁰.

1.3.4.2. Mecanismos potenciales que protegen frente al VIH en individuos controladores.

El mecanismo o combinación de mecanismos exactos que dan lugar a un control virológico duradero permanecen ampliamente desconocidos. Se ha hablado de distintos factores genéticos del huésped, del sistema inmune o el virus.

1.3.4.2.1. Factores genéticos del huésped.

El factor más consistente asociado con control viral es la presencia de ciertos alelos de HLA de clase I, particularmente alelos HLA-B^{50,103}. HLA-B5701, HLA-B5703 y, en menor medida, HLA-B27 están considerablemente incrementados en cohortes de controladores comparados con no controladores^{10,111,145}. Estas observaciones sugieren un papel causal para el sistema inmune adaptativo ya que las moléculas de HLA están implicadas en el reconocimiento de células infectadas por virus. El efecto anti-VIH del HLA-B5701 podría deberse a varios mecanismos ya que 1) HLA-B5701 está en desequilibrio de unión con el gen *HCP5*, que puede estar incluso más asociado con control,

aunque no se conoce el mecanismo de esta asociación⁵⁸, 2) las mutantes de escape de HLA-B5701 no están necesariamente asociadas con rebote viral¹⁰, 3) muchos individuos positivos para HLA-B5701 con altas cargas virales no muestran evidencias de mutantes de escape¹⁴³ y 4) la molécula de HLA-B5701 interacciona directamente con receptores en los NK, sugiriendo un componente genético mediado a través de la respuesta inmune innata, como se discute en el apartado 3.3.2.2.

Además de factores genéticos que influyen la respuesta inmune VIH-específica también existen polimorfismos genéticos del huésped que afectan a la capacidad del VIH para entrar en las células. La homocigosidad para la delección de la base 32 del gen que codifica CCR5, un correceptor para la entrada del VIH en las células T CD4+, protege muy fuertemente frente a la infección por VIH, mientras que la heterocigosidad para el alelo CCR5 Δ 32 se asocia con un retraso en la progresión hacia SIDA⁴⁹. También existe una importante variabilidad genética en las secuencias reguladoras de CCR5, con algunas variantes asociadas a una rápida progresión de la enfermedad¹³⁰.

Muy recientemente se ha descrito cómo el trasplante de médula ósea de un donante homocigoto para la delección CCR5 Δ 32 a un receptor con leucemia aguda e infección por VIH resultó en control duradero de la infección, incluso 20 meses después de la interrupción del tratamiento antirretroviral⁹⁷, viniendo a demostrar aún más la importancia de este genotipo protector.

Aunque la expresión de CCR5 tiene un papel claro y central en la patogénesis del VIH, solamente es una parte de la compleja historia que también implica la expresión del ligando del receptor de quimiocinas. *CCL3L1* es el gen que codifica MIP-1α, el ligando de CCR5 más supresivo. Cuanto mayor es el número de copias del gen *CCL3L1* menor es el equilibrio de la carga viral⁷⁶. Cuando se combinan los haplotipos de CCR5 con el número de copias de *CCL3L1* en grupos de riesgo genético basados en el riesgo de desarrollar SIDA o muerte, llama considerablemente la atención la relativa ausencia de un genotipo desventajoso CCR5 y *CCL3L1* entre los controladores. Datos recientes indican que el mecanismo por el cual estas características genéticas protegen frente a la progresión de la enfermedad es multifactorial y comprende una entrada viral restringida, inmunidad celular preservada y quizá otros mecanismos⁵¹. Otros receptores o ligandos de receptores de quimiocinas (como por ejemplo SDF-1) podrían también estar asociados causalmente con control²¹⁸ aunque no ha sido formalmente demostrado en controladores del VIH.

1.3.4.2.2. Inmunidad innata.

La infección aguda por VIH se asocia con una rápida y quizá irreversible destrucción de la población de células T CD4+ que reside en los tejidos linfoides asociados al intestino¹⁴² (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*). En modelos animales, la mitad o más de las células T CD4+ residentes en el intestino se perdieron durante las primeras semanas de la infección. Esta pérdida de la integridad de la mucosa da

lugar a una afectación de la inmunidad celular local²⁵ y quizá a una translocación crónica de productos microbianos, que a su vez contribuye a una inflamación persistente. Todos estos eventos potencialmente definitorios de la enfermedad, ocurren antes de que se desarrolle una respuesta inmune adaptativa y, por lo tanto, posiblemente la influencia más temprana de la respuesta inmune del huésped es probablemente mediada por el sistema inmune innato¹⁶¹.

Consistente con esta hipótesis, una serie de estudios recientes encontraron que aquellos individuos que coexpresan KIR3DS1, un receptor regulador de la superficie de las células NK, y HLA-Bw4-08I, una familia de alelos de HLA que presuntamente se unen a KIR3DS1 y activa las células NK¹⁶⁸, tienen menores set points de CV y un riesgo reducido de progresión a SIDA^{131,132,161}. Así mismo, en recientes estudios en cohortes de controladores, había un considerable aumento en ciertos receptores de NK. El efecto de HLA-B57 sobre la CV era aún mayor cuando se expresaba en el contexto de altos niveles de KIR3DL1, un KIR inhibitorio, proporcionando una fuerte evidencia de que la respuesta inmune innata juega un papel en el desenlace de la enfermedad. Esta interacción entre HLA-B57 y KIR3DL1 puede explicarse, al menos en parte, por el hecho de que el HLA-B57 es un alelo Bw4 que es el ligando natural para KIR3DL1. En condiciones normales, la expresión de HLA-B57 en las células evitaría que éstas fueran lisadas por los NK. La infección de la célula daría lugar a una down-regulación de HLA B57 y, por tanto, una pérdida de la señal inhibitoria mediada a través de KIR3DL1. Esto

desencadenaría una señal en los NK y daría lugar a la lisis de la célula infectada. Este mecanismo proporciona una respuesta al hecho de que las personas que expresan HLA B57 tengan una enfermedad aguda menos sintomática⁶, ya que los NK limitarían la viremia inicial y darían lugar a una mayor reserva de células T CD4+ residentes en los tejidos.

Recientemente se han descrito también polimorfismos en el receptor *toll-like 9* (TLR-9, *toll-like receptor 9*), que media la respuesta inmune innata frente a motivos comunes del DNA en virus y bacterias. Se ha mostrado que tiene un impacto en el curso clínico de la enfermedad sugiriendo una conexión entre el sistema inmune innato y la patogénesis de la enfermedad²².

Otro componente importante del sistema inmune innato son las células dendríticas plasmacitoides (PDCs) que producen interferón de tipo I en respuesta a infecciones virales. El VIH, que estimula estas células via TLR¹⁸, produce un descenso rápido y sostenido del número de PDCs circulantes¹⁸⁸, presumiblemente porque el VIH puede infectar directamente a estas células¹²⁶. El número de PDCs es mayor en aquellos individuos que durante mucho tiempo no progresan clínicamente (LTNP) que en aquellos que progresan, lo que sugiere, pero no prueba, que las PDCs pueden proteger frente a la progresión de la enfermedad, aunque también es posible que su presencia sea simplemente consecuencia de las bajas tasas de replicación viral.

1.3.4.2.3 Inmunidad celular CD8+.

Tras la infección aguda por VIH, y coincidiendo con la disminución de la viremia, se produce un aumento de células T CD8+ específicas frente a VIH que son capaces de matar directamente a las células infectadas por el virus. Estas observaciones, junto con la asociación consistente entre ciertos tipos de HLA de clase I y control del virus, han contribuido a la asunción general de que una inmunidad celular efectiva de células CD8 específicas frente al VIH es un factor dominante que conduce a la contención del VIH, aunque esto permanece en controversia y el mecanismo no ha sido definido aún.

Aunque no hay una asociación clara entre el número de células CD8+ VIH-específicas (definidas por producción de IFN-gamma) y control virológico^{1,20}, la función de estas células es claramente mayor en los controladores que en los no controladores, incluyendo la capacidad de proliferar tras encontrar antígenos del VIH, la capacidad de producir perforina, y la capacidad de producir múltiples citocinas^{20,144}.

Estudios más recientes han demostrado que el ensayo de neutralización viral puede utilizarse para medir el potencial antiviral de las células T CD8+ directamente, de manera comparable a la respuesta medida con anticuerpos. Comparando con no controladores, las células T CD8+ VIH-específicas de los controladores tienen mayor capacidad de inhibir la replicación del VIH en células T CD4+ autólogas¹⁸¹. Estos datos en conjunto sugieren fuertemente que una potente respuesta CD8+ frente al VIH está relacionada causalmente

con el control del VIH, al menos en algunos controladores. Sin embargo, muchos de estos estudios son correlativos por necesidad, haciendo difícil descartar la posibilidad de que la conservación de una respuesta potente VIH-específica sea la consecuencia del control del VIH⁵⁰.

En modelos animales, en simios infectados con VIS, al igual que en humanos, una pequeña subpoblación consigue controlar la infección espontáneamente. La depleción mediante anticuerpos de las células T CD8⁺ en estos animales da lugar a una rápida aparición del VIS, evidenciando que el control viral está, al menos en parte, mediado por células T CD8⁺⁶⁴. Hay que destacar que, en estos ensayos, la reaparición de células CD8⁺ efectivas se asoció con un reestablecimiento del control viral, aunque hubo un cambio en los epítomos inmunodominantes.

1.3.4.2.4 Inmunidad celular CD4+.

Otro factor evidente que participa en el control del VIH son las células T CD4⁺ "helper", necesarias para el mantenimiento a largo plazo de las células T memoria CD8⁺ antígeno específicas⁷⁸, y para una óptima respuesta de anticuerpos. El VIH provoca una infección del sistema inmune y tiene como célula diana principal a las células T CD4⁺. Durante la infección aguda hay una pérdida masiva de células T CD4⁺ y son las células T CD4⁺ VIH-específicas activadas las que primero se infectan y desaparecen⁵². Esta pérdida temprana de células T CD4⁺ VIH-específicas, que son críticas para establecer una repuesta inmune adaptativa efectiva, está ampliamente considerada como una de las

principales razones por las que los humanos no son capaces de controlar el VIH⁵³.

La infección por VIS en simios da lugar a una gran viremia y progresión de la enfermedad en la mayoría de los animales, pero no en todos. En el mismo experimento comentado en el apartado anterior, cuando los simios se recuperaban de la depleción experimental de células T CD8+, esta recuperación del sistema inmune estaba asociada con la aparición de una robusta respuesta de células T CD4 y CD8 VIS-específicas, que iba acompañada de un reestablecimiento de carga viral indetectable o casi indetectable⁶⁴, sugiriendo que las células T CD4+ son de hecho necesarias para mantener la capacidad de las células T CD8+ de controlar la replicación viral.

Los datos que apoyan el papel de las células T CD4+ VIH-específicas en humanos son obviamente menos directos y están basados principalmente en observaciones cross-sectionales. En una cohorte de 30 controladores, la correlación más consistente con control⁵⁵ fue la proporción de células T CD4+ que expresaban IFN- γ e IL-2. Otros estudios tuvieron resultados similares⁸⁷. En un reciente estudio además se observó que la molécula CTLA-4, una molécula inhibidora, estaba aumentada en células T CD4+ VIH-específicas en todos grupos de individuos infectados excepto en los controladores de élite, indicando que este marcador específico de células T CD4+ está asociado con control viral¹⁰¹. La expresión de este receptor puede disminuir la capacidad de las células T CD4+ para proliferar en respuesta

a péptidos del VIH o el antígeno p24, una función que sin embargo se mantiene en individuos LTNP. No obstante, una importante proporción de controladores, casi el 50%, no tienen una actividad de células T CD4+ VIH-específicas detectable por producción de citocinas. Esto indicaría que hay otros mecanismos, además de la inmunidad celular, implicados en el control mantenido del VIH^{50,101}.

1.3.4.2.5 Inmunidad humoral

Uno de los objetivos importantes en el desarrollo de vacunas frente al VIH es el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Muchos opinan que la única manera de prevenir la infección por VIH será el desarrollo de una vacuna que estimule la producción de anticuerpos neutralizantes, ampliamente cross reactivos, que sean capaces de reconocer cepas circulantes¹⁰¹.

En primates no humanos, la presencia de anticuerpos dirigidos contra epítomos conservados de la proteína gp140 de la superficie del VIH¹⁸⁵, puede proteger frente a la infección por el virus quimérico de la inmunodeficiencia simia (SIV/HIV) en macacos y ejercer una presión selectiva sobre el virus^{101,136,197,216}. Por tanto se piensa que estos anticuerpos serían importantes componentes en cualquier vacuna^{100,135,232}.

Durante la infección por VIH en humanos, se han encontrado respuestas autoinmunes y aloinmunes que podrían jugar un papel protector en la infección^{28,47,88,89,226}. Algunos pacientes desarrollan altos títulos en suero de anticuerpos ampliamente neutralizantes. Estudios ya

antiguos sugirieron que en algunos individuos LTNP se encontraban anticuerpos capaces de neutralizar al virus³¹. Sin embargo, a pesar de un estudio intensivo durante más de dos décadas, sólo se ha encontrado un número muy reducido de anticuerpos monoclonales ampliamente neutralizantes. Por ejemplo, los anticuerpos 2F5 y 4E10, que se producen durante la infección natural, tienen la capacidad de neutralizar al VIH. Reconocen epítomos conservados de la proteína gp41 y pueden unirse a los fosfolípidos de la membrana con cinéticas comparables a las de las inmunoglobulinas anticardiolipina generadas en enfermedades autoinmunes⁴.

Estudios recientes, que analizaron la capacidad del suero de pacientes para neutralizar virus autólogos y heterólogos⁵⁰, indicaron que altos títulos de anticuerpos neutralizantes son raros en personas que mantienen carga viral baja en ausencia de tratamiento. Además, las secuencias *env* en controladores tienen pocos loops variables y pocos sitios de glicosilación en N predichos, lo que sugiere una escasa presión de anticuerpos neutralizantes *in vivo*.

1.3.4.2.6 Inmunidad innata intracelular.

Muy recientemente se han descrito algunos factores intracelulares que limitan la replicación viral, aunque aún está por determinar si juegan un papel en el control de la infección en individuos controladores. Uno de ellos es APOBEC3G (*tesis doctoral H. Oliva Mayegas, 2008*), un enzima celular que restringe potentemente la replicación del VIH. Esta citidin deaminasa funciona principalmente a

través de la producción masiva de hipermutación dG a dA en los DNA del virus sintetizados *de novo* durante la retrotranscripción. El VIH actúa frente a esta forma de defensa del huesped a través de su proteína accesoria Vif, la cual se une a APOBEC3G para su degradación acelerada⁵⁰.

1.3.4.2.7. Virus atenuados.

Existe una clara evidencia de que la patogenicidad de los distintos aislados virales puede diferir, como se mostró en un grupo de individuos infectados en 1995 a través de una transfusión sanguínea de un donante común⁴⁸. Todos los receptores contrajeron un virus con una delección en el gen *nef* y mantuvieron bajas viremias durante años y décadas. Sin embargo, muchas de estas personas han progresado a SIDA desde entonces³⁸, mostrando que la atenuación viral a través del gen *nef* no conduce necesariamente al control mantenido del VIH *in vivo*. Otros numerosos estudios han indicado que mutaciones o delecciones en los genes funcionales o accesorios del VIH pueden llevar a control viral o no progresión⁵⁰.

En conjunto, todos estos estudios indican que un control casi completo de la replicación viral es posible y que es necesario continuar con el estudio de aquellos individuos capaces de controlar la infección de manera espontánea, ya que proporcionan información importantísima para comprender cómo actúa el sistema inmune y encontrar así nuevas dianas y estrategias terapéuticas.

2. CÉLULAS DENDRÍTICAS.

Las células dendríticas (DC) son células especializadas en la captura, procesamiento y presentación de antígenos a las células T, iniciando así la respuesta inmune adaptativa, por lo que se han denominado células presentadoras de antígeno *profesionales*^{14,205}. Se encuentran estratégicamente localizadas en los tejidos para la captura de antígenos en la periferia, tras la captura, los antígenos son procesados en péptidos y las DC migran a los ganglios linfáticos, donde los péptidos pueden ser presentados a células T naive. De este modo, la función de las DC permite a las células T naive entrar en contacto con antígenos periféricos que de otro modo no podrían haber encontrado.

Las DC, al igual que todas las demás células, presentan péptidos a las células T CD8 en sus moléculas de HLA de clase I¹⁷⁵, provenientes fundamentalmente de proteínas citosólicas. Además, sus moléculas HLA de clase II presentan péptidos a las células T CD4, al igual que hacen otras células presentadoras de antígeno, y estos provienen sobre todo de antígenos del medio extracelular que capturan por fagocitosis y endocitosis. Sin embargo, las DC tienen además la habilidad especial de presentar antígenos extracelulares en sus moléculas de HLA-I, lo que se ha denominado "presentación cruzada"^{171,176}. Esta función de las DC proporciona al sistema inmune un mecanismo esencial para generar inmunidad frente a patógenos que eluden a las células presentadoras de antígeno.

2.1 Subpoblaciones de DC.

Uno de los rasgos más enigmáticos de la biología de las DC es la complejidad de las subpoblaciones celulares. Al contrario que otros tipos celulares, las DC pueden tener un origen tanto mielóide como linfóide^{13,124}. Además las DC son relativamente raras, tanto en sangre como en tejidos. Las DC se pueden clasificar teniendo en cuenta la distribución anatómica, la función inmunológica y la expresión de marcadores de superficie.

Las principales poblaciones de DC son las DC mieloides y plasmacitoides en sangre y, en tejidos, las interdigitadas en la paracorteza o zona T de los órganos linfoides, las dérmicas y las células de Langerhans de la epidermis. Las DC mieloides y plasmacitoides se encuentran en una frecuencia muy baja, constituyendo un 0.5-2% del total de células mononucleares de sangre periférica¹²⁴. En general, las DC mieloides se caracterizan por secretar grandes cantidades de IL-12 mientras que las plasmacitoides se caracterizan por producir grandes cantidades de IFN de tipo I. Las células de Langerhans se encuentran fundamentalmente en la piel donde constituyen un 2-3% de las células epidérmicas¹³. Este tipo de células expresan langerina (CD207), una lectina de tipo C específica de las células de Langerhans.

2.2 DC e infección por VIH.

Durante años, el papel de las células presentadoras de antígeno (DC, monocitos/macrófagos y células B) fue ampliamente ignorado a la hora de definir los parámetros inmunes de la infección por VIH¹⁷⁴. Sin

embargo, hace ya más de una década que se sabe que las DC pulsadas con VIH facilitan la infección de células T en cocultivo^{29,163}. Estudios más recientes de las interacciones entre DC y VIH resaltan el importante papel de las DC en la transmisión del VIH en las superficies mucosas y en la patogénesis del VIH^{79,99}.

Como se comentó anteriormente, la transmisión sexual es la principal vía de transmisión del VIH a lo largo de todo el mundo, constituyendo hasta el 80% de las infecciones^{163,164}. Debido a su localización en las mucosas y tejidos linfoides, se ha propuesto a las células dendríticas (DC) como una de las primeras células en encontrarse con el VIH durante la transmisión sexual²⁰⁴. Se ha sugerido, además, que las DC serían las mediadoras del paso del VIH a las células T CD4+ (principales células para la replicación y diseminación del VIH) en los tejidos linfoides *in vivo*. Así que el entendimiento de los mecanismos de la interacción del VIH con las DC y otros factores celulares facilitará posiblemente intervenciones más efectivas frente a la infección por VIH y podría ayudar en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Las DC mieloides, plasmacitoides y LC son susceptibles de ser infectadas por el VIH²²¹. Todas ellas expresan cantidades relativamente bajas del receptor del VIH CD4 y de los correceptores CCR5 y CXCR4. Aunque tanto las DC mieloides como las plasmacitoides pueden ser infectadas por las cepas adaptadas de laboratorio R5 y X4, las DC

mieloides son más susceptibles que las plasmacitoides. Además la infección por cepas R5 es más eficiente que por cepas X4.

La replicación del VIH en DC es menos productiva que la que se produce en células T CD4+, y la frecuencia de DC infectadas por VIH *in vivo* es de 10 a 100 veces menor¹³⁷. Un estudio en células de un donante sano indicaba que aproximadamente sólo un 1-3% de la población de DC mieloides y plasmacitoides podía ser productivamente infectada *in vitro*²⁰¹. Una frecuencia similar se encontró en LC de donantes sanos infectadas *in vitro*. Se han propuesto diversas explicaciones para la baja infección de las DC, como bajos niveles de expresión del receptor y co-receptores del VIH, la rápida y extensa degradación de VIH internalizado en compartimentos intracelulares o la existencia de factores innatos que bloquean la replicación viral en las DC²²¹. Aún así, son necesarios muchos más estudios para dilucidar este tema, que es de gran importancia para entender cómo las DC limitan la infección productiva por el VIH.

2.3 Células dendríticas derivadas de monocitos como modelo *in vitro*.

Las células presentadoras de antígeno más potentes son las DC de origen mieloides⁸⁴. Estas DC están geográficamente posicionadas como centinelas, son capaces de detectar “señales de peligro” y enlazan inmunidad innata y adaptativa. Debido a la excepcional capacidad de las DC mieloides de activar a las células T en respuesta a patógenos, estas células han sido ampliamente utilizadas como herramientas *in vivo* y *ex vivo* para inmunoterapia frente a la infección por VIH^{171,174}.

Debido a la baja abundancia de DC *in vivo*, las DC derivadas de monocitos (MDDC) son comúnmente utilizadas para modelar la función inmunológica de las DC y estudiar las interacciones entre DC y VIH en estudios experimentales¹⁷⁴. Notablemente, hay una gran plasticidad en las propiedades y funciones de las DC mieloides *in vivo* que pueden ser reproducidas *in vitro*. A partir de monocitos de sangre periférica, tras 5-6 días en cultivo con las condiciones de cultivo que más adelante se detallan en el apartado de material y métodos, se obtienen MDDC inmaduras. Estas MDDC inmaduras tienen características similares a las DC mieloides, DC dermales inmaduras y DC intersticiales. Las MDDC inmaduras pueden convertirse en MDDC maduras tras exposición a distintos estímulos madurativos, como por ejemplo LPS, CD40 ligando, IFN o distintas combinaciones de citocinas. Se ha observado que usando distintos estímulos para promover la maduración pueden generarse DC con distinta capacidad para transmitir el VIH²²¹.

2.4 Transmisión del VIH por las DC.

Las DC juegan un papel fundamental en el inicio de la respuesta inmune adaptativa frente a las infecciones^{182,205}. Las DC inmaduras recorren los tejidos mucosos en busca de “intrusos no deseados”. Una vez localizado, el patógeno es capturado e internalizado, y las DC sufren entonces un proceso de maduración y migran a los ganglios linfáticos regionales. Mientras tanto, los patógenos internalizados son procesados en antígenos peptídicos y se expresan moléculas coestimuladoras en la superficie celular, encontrándose en este

momento estas células presentadoras de antígeno profesionales listas para una estimulación T efectiva.

Para desarrollar su función clave de centinelas¹⁷⁴, las DC expresan un repertorio de receptores para el reconocimiento de patógenos, incluyendo receptores de tipo Toll (TLR) y receptores de lectinas de tipo C. Los TLR desencadenan señales de alerta a través de vías de señalización intracelular que culminan en la maduración celular y la producción de citocinas. Los receptores de lectinas de tipo C reconocen estructuras específicas de carbohidratos en los patógenos y los internalizan para su degradación en compartimentos lisosomales, iniciando así el proceso de presentación antigénica.

Los patógenos, por otro lado, han desarrollado diversos mecanismos de escape a la respuesta inmune del huésped aprovechándose de la función de las DC, especialmente el VIH²²¹. Al igual que muchos otros patógenos, el VIH interfiere la señalización a través de TLR, alterando la secreción de citocinas proinflamatorias y antivirales necesarias para el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. El VIH, además, usa probablemente a las DC como medio de transporte para alcanzar su diana principal, las células T CD4+, localizadas profundamente en la mucosa o en los nódulos linfáticos. Además, se ha descrito que el VIH es capaz de infectar y replicarse directamente en células de Langerhans (LC) y otras DC mieloides²²¹, aunque este proceso infectivo es mucho menos robusto que el que se produce en células T CD4+ y parece ser que requiere una mayor

cantidad de virus. Además de los bajos niveles de replicación en DC, se ha propuesto que el virus utiliza estas células para dispersar la infección de una forma “novedosa,” consistente en captura e internalización de viriones intactos, seguido por una transferencia de estos viriones a través de la sinapsis inmunológica. Este mecanismo de transmisión viral se ha denominado “infección en trans”. Aunque no existe una evidencia directa *in vivo* de este mecanismo, numerosas observaciones *in vitro* sugieren que esta captura y transferencia de viriones a células permisivas es ventajosa para el virus, especialmente cuando la cantidad de partículas infecciosas es limitada. En estudios tempranos realizados en explantes de tejido ex-vivo, la mayoría de la replicación de VIH se observaba en conjugados DC-célula T. La adición de DC a PBMC aumentó considerablemente la replicación del VIH. En estos cocultivos, la mayoría de viriones se originaban en las células T, sugiriendo que las DC contribuían de forma indirecta a la producción viral^{84,95,99}.

3. DEFENSINAS.

Los animales están constantemente expuestos a una miríada de microorganismos y, aún así, raramente se infectan, gracias a la función de barrera de la piel y los epitelios, que previenen la entrada de microbios, debido a la obstrucción mecánica y a la presencia de sustancias antimicrobianas. Si la barrera se rompe, los patógenos son contenidos y eliminados por el sistema inmune del huésped.

Los mamíferos han desarrollado dos tipos de inmunidad: innata, no clonal y no específica, y adaptativa, inducible y antígeno-específica^{92,141}. La inmunidad innata representa la primera línea de defensa, constitutiva y pre-existente, que es rápidamente movilizada tras la detección de una invasión microbiana. La rama efectora de la inmunidad innata consiste en dos componentes principales: reclutamiento y/o activación de leucocitos (por ejemplo fagocitos, granulocitos, monocitos/macrófagos, etc...) capaces de combatir los patógenos invasores, y la liberación y/o activación de una variedad de mediadores humorales extracelulares (por ejemplo complemento, citocinas, sustancias antimicrobianas, etc.).

Recientemente se empieza a reconocer el papel de estos dos brazos de la inmunidad innata en el control de las infecciones virales. Los péptidos antimicrobianos, constituidos por las defensinas y las catelecidinas, son moléculas pequeñas producidas fundamentalmente por leucocitos y células epiteliales que poseen un amplio rango de acción frente a gran diversidad de microorganismos²²³.

En esta tesis nos enfocamos en el estudio de las defensinas. Aunque las defensinas se describieron por primera vez en 1983¹¹⁷, un número cada vez mayor de estudios recientes continúa describiendo los múltiples y complejos mecanismos a través de los cuales actúan estas moléculas.

3.1 Características generales de las defensinas.

Las defensinas son moléculas efectoras de la inmunidad innata, consistentes en péptidos pequeños (3-6 kDa) altamente básicos, ricos en cisteína, producidos por leucocitos y células epiteliales^{68,109,223}. Poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro que abarca bacterias, hongos y virus, incluido el VIH^{34,35}, además de capacidad para neutralizar toxinas^{104,214}. Se trata de moléculas muy conservadas, presentes en todos los vertebrados, existiendo también moléculas equivalentes en invertebrados e incluso en plantas²⁷.

3.1.1. Clasificación y estructura.

En humanos se diferencian dos grandes subfamilias de defensinas: α -defensinas y β -defensinas. En primates existen además las θ -defensinas, que no se expresan en humanos debido a un stop codon prematuro en la secuencia señal¹¹⁴. Los péptidos maduros de los distintos tipos de defensinas comparten diversas características, incluyendo secuencias polipeptídicas cortas (de 18 a 45 aminoácidos), tres puentes disulfuro intramoleculares, gran carga positiva y una estructura terciaria en la que predomina el plegamiento β . Las α - y β -defensinas se diferencian entre sí por el apareamiento de sus seis residuos de cisteína conservados, entre los que se forman tres puentes disulfuro intramoleculares. Las α -defensinas tienen un apareamiento entre los residuos 1-6, 2-4, 3-5 y las β -defensinas entre los residuos 1-5, 2-4, 3-6. Dado que las cisteínas 5 y 6 están siempre adyacentes, las dos familias son muy similares estructuralmente^{91,194,208}.

La base de la estructura terciaria de las α - y β -defensinas consiste en tres hojas antiparalelas, en plegamiento β , constreñidas por tres puentes disulfuro^{91,93,94,160,229,231}. Adicionalmente, la hoja se encuentra en ocasiones flanqueada por una o dos α -hélices, como se ve en las β -defensinas. En solución, la mayoría de las α y β -defensinas son monoméricas, aunque la α -defensina-1, α -defensina-3 y HBD3 forman dímeros y HBD2 puede formar incluso oligómeros. La estructura terciaria representativa de α y β -defensinas se muestra en la figura 5.

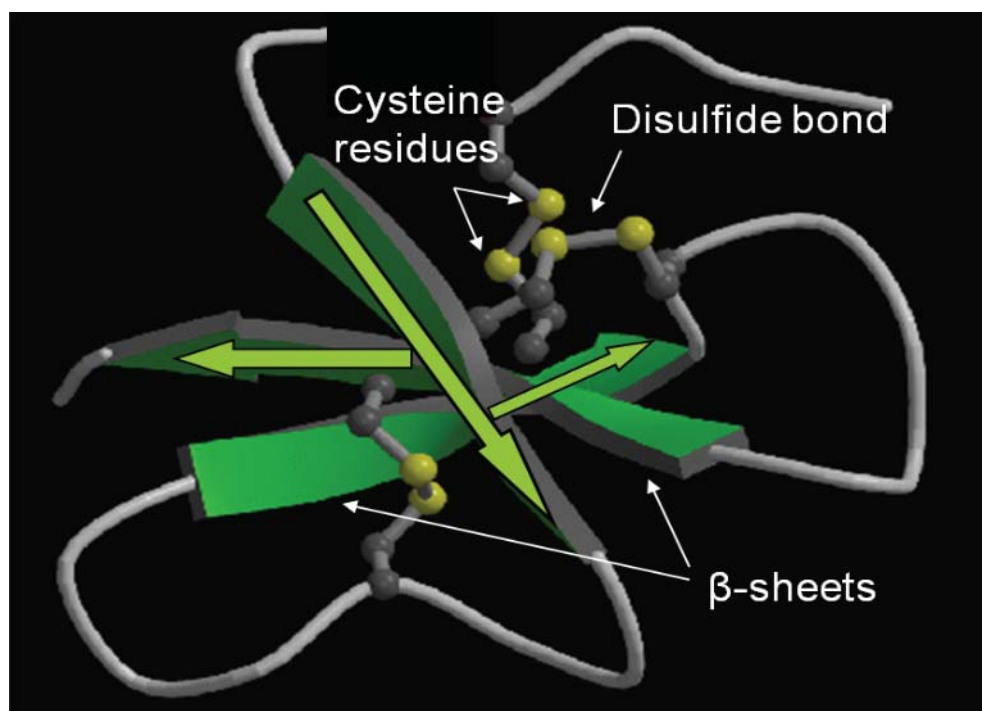


Figure 5. Estructura terciaria representativa de α y β -defensinas.

La contribución de la estructura de las defensinas a su función puede variar dependiendo de cuál sea la función considerada. Por ejemplo, los puentes disulfuro no son necesarios para la función antibacteriana de α -defensina-1 o HBD3^{128,222}. Sin embargo, el correcto apareamiento

de los puentes disulfuro es importante para la actividad quimiotáctica atribuida a la HBD3.

3.1.2. Estructura genómica.

Todas las defensinas se sintetizan como prepropéptidos y son procesados en distintos grados dependiendo de su lugar de expresión^{68,223}.

Los genes que codifican las defensinas se localizan en el cromosoma 8²⁰³. El gen de la α -defensina-1, DEFA1, y el de la α -defensina-3, DEFA3, son prácticamente idénticos excepto por una mutación puntual en el genoma que da lugar a la conversión del primer residuo aminoacídico de alanina en α -defensina-1 a ácido aspártico en α -defensina-3¹²¹. El gen para la α -defensina-2 no se ha encontrado, por lo que es probable que ésta se genere a partir de la 1 o la 3 por procesamiento proteolítico (figura 6).

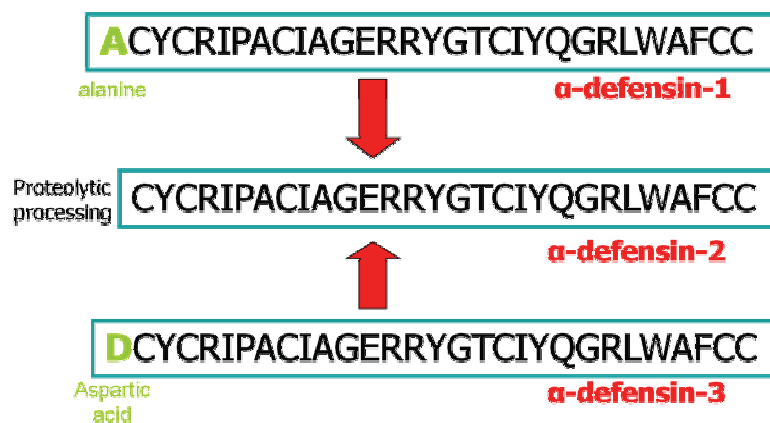
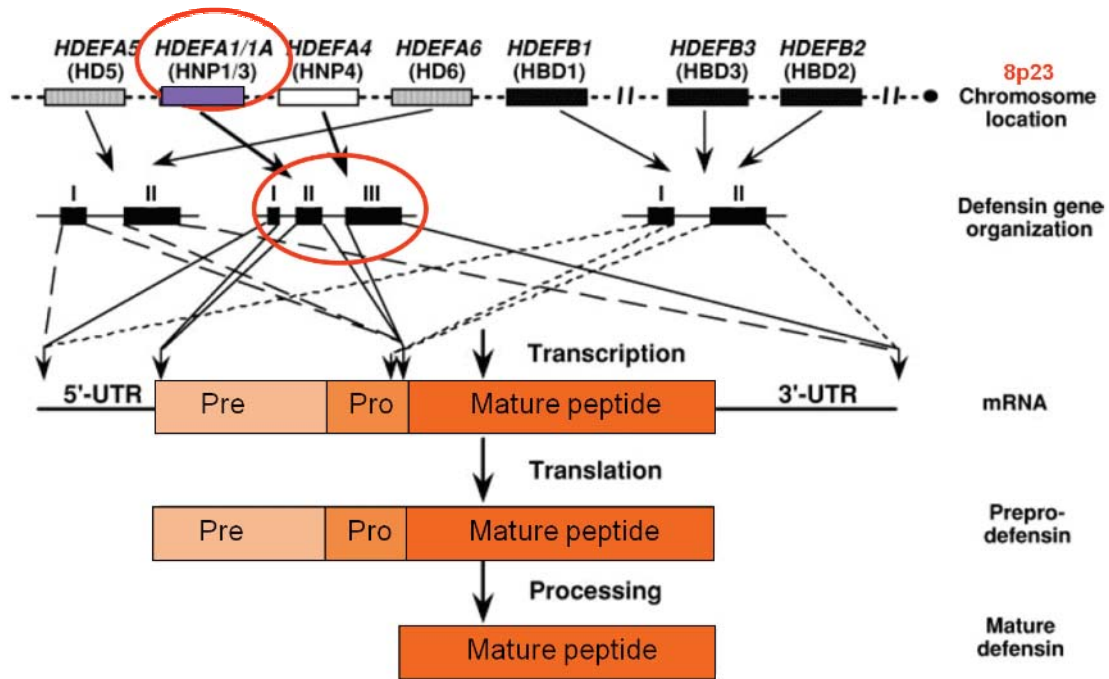


Figura 6. Esquema de las α -defensinas 1, 2 y 3.

Los genes para las α -defensina-4, HD5 y HD6 y las β -defensinas 1 y 2 también se localizan en el cromosoma 8. La estructura genómica de las α -defensinas 1, 3 y 4 consiste en 3 exones, exones I, II y III, que

codifican la región no traducida 5' (5'-UTR), la preproregión y el péptido maduro más la 3'-UTR, respectivamente. Los genes para la HD5 y HD6 tienen dos exones²²³. En la figura 7 se muestran las estructuras genómicas para α - y β -defensinas.



Adapted from Yang et al. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:181-215

Figura 7. Localización, transcripción y traducción de las defensinas. Adaptado de Yang et al, 2004.

Una característica peculiar muy importante de los genes que codifican para algunas de las defensinas es la presencia de variaciones en el número de copias, algo no común para otros genes que codifican importantes efectores de la inmunidad innata o para otros genes de defensinas, ya que se ha visto que los genes DEFA4, DEFA5, DEFA6 y DEFB1 tienen una única copia^{123,223}. Se ha descrito que los genes que codifican para varias β -defensinas y para la α -defensina1-3 poseen variaciones en el número de copias, que se heredan de forma desigual,

creando diferencias genéticas entre los distintos individuos^{5,12,122,223}. El rango en el número de copias de cada gen varía entre 4-11 para DEFA1/3 y entre 1-4 para DEFB4 y DEFB103A según distintos artículos, y se ha visto que las variaciones en el número de copias de DEFA1/3 son independientes de las variaciones en DEFB4 y DEFB103A. Además se ha descrito que el gen DEFA3 puede estar incluso ausente en un 10-37% de la población. Asimismo, es importante destacar que se observó que la cantidad de α -defensinas 1-3 encontrada en neutrófilos era proporcional al número de copias de DEFA1/3 detectadas.

3.1.3. Fuentes celulares y distribución en los tejidos.

Leucocitos y células epiteliales son las principales fuentes de defensinas en mamíferos^{69,223}. Hasta el momento se han descrito seis tipos de α -defensinas. Las α -defensinas-1, 2, 3 y 4 se encuentran fundamentalmente en los neutrófilos (por lo que también se denominan HNP, *human neutrophil peptides*⁷⁰). Como se explicó en el apartado anterior, las tres primeras se diferencian en un solo aminoácido y constituyen el 5-7% del total de proteína en los neutrófilos, mientras que la α -defensina-4 tiene una secuencia aminoacídica diferente y constituye únicamente menos del 2% del total de defensinas en neutrófilos. Aunque los neutrófilos son la fuente principal de α -defensinas-1, 2 y 3, se ha descrito que otros subtipos de leucocitos también las producen, como monocitos, macrófagos, células NK, células B o células T $\gamma\delta$ ^{2,127}. Las α -defensinas 5 y 6 (HD5 y HD6) son producidas fundamentalmente por las células de Paneth del intestino¹⁶⁶,

aunque se han encontrado también en otros tejidos^{74,165}, como glándulas salivares, tracto genital femenino o secreciones uretrales asociadas a infección por *Neisseria gonorrhoeae* o *Chlamydia trachomatis*.

Por otro lado, se han identificado 28 β -defensinas humanas mediante búsquedas basadas en genes, aunque solamente seis (HBD1, 2, 3, 4, 5 y 6) se expresan fundamentalmente en células epiteliales^{190,191}. La HBD1 se expresa de manera constitutiva en células epiteliales, mientras que la expresión de las HBD2 y 3 puede ser inducida por virus, bacterias, productos microbianos (como LPS) y citocinas pro-inflamatorias. La expresión constitutiva de HBD4 parece estar restringida a testes y antro gástrico, aunque su expresión puede ser inducida por PMA en células del epitelio respiratorio. HBD5 y HBD6 se expresan específicamente en epidídimo.

Tanto α -defensinas como β -defensinas se han encontrado además en la leche materna, indicando un posible papel en proteger a los recién nacidos frente a las infecciones.

En la tabla 3 se presenta un resumen de las células productoras, tejidos y espectro antiviral de las distintas defensinas.

Tabla 3. Características generales de las principales α y β defensinas.

Defensinas	Distribución tisular	Células productoras	Síntesis y regulación	Efecto antiviral
α-defensinas 1-3	Placenta, mucosa intestinal y cervical, moco cervical, líquido amniótico. Plasma.	Neutrófilos , monocitos, macrófagos, NK, células B, células $\gamma\delta$	Constitutiva	VIH-1 VHS-1, VHS-2, VSV, CMV, virus influenza, adenovirus, papilomavirus.
α-defensina-4	Sin determinar	Neutrófilos	Constitutiva	VIH-1
HD5 y HD6	Glándulas salivares, estómago, intestino, ojos, tracto genital femenino (HD5)	Células de Paneth del intestino. Células epiteliales vaginales (HD5)	Constitutiva o inducible (por infecciones de transmisión sexual)	papilomavirus
HBD1	Mucosa oral y nasal, pulmones, glándulas salivares, estómago, intestino, piel, ojos, tracto urogenital, riñones. Plasma.	Células epiteliales , monocitos, macrófagos, MDDC, queratinocitos.	Constitutiva o inducible en respuesta a IFN- γ y LPS y peptidoglicano.	
HBD 2 y 3	Mucosa oral y nasal, pulmones, glándulas salivares, estómago, intestino, piel, ojos, tracto urogenital, riñones. Plasma.	Células epiteliales , monocitos, macrófagos, MDDC, queratinocitos.	Inducible en respuesta a virus, bacterias, LPS, peptidoglicano, lipoproteínas, citocinas (IL-1 β , TNF) y factores de crecimiento.	VIH-1 , adenovirus, rinovirus y virus vaccinia.
HBD4	Antro gástrico y testículos.	Células epiteliales.	Constitutivo o inducible en respuesta a PMA y bacterias.	

3.1.4 Defensinas como moléculas efectoras y reguladoras de la inmunidad innata.

3.1.4.1 Efecto antimicrobiano directo.

Las defensinas tienen múltiples funciones defensivas^{34,68,114,223}. Hasta el momento, todas las defensinas caracterizadas tienen efecto antimicrobiano directo. Se ha demostrado su capacidad para matar, *in*

in vitro, un rango amplio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, virus con y sin envoltura, hongos y algunos parásitos, especialmente cuando las defensinas se encuentran en condiciones de baja concentración de sal y proteínas plasmáticas. Este efecto antimicrobiano directo es dependiente de dosis y se observa normalmente en un rango micromolar.

No se conoce completamente el mecanismo o mecanismos por los que se desarrolla esta actividad microbicida. La interacción entre las defensinas y los microorganismos diana da lugar a una desestabilización y disrupción de la membrana, provocando un aumento de la permeabilidad y salida de pequeñas moléculas. La topología polar de las defensinas, con regiones cargadas e hidrofóbicas separadas les permite insertarse en la membrana microbiana, que contiene mayor cantidad de fosfolípidos cargados negativamente que la membrana celular de los mamíferos. Esta interacción se cree que provoca la formación de múltiples poros en la membrana microbiana^{115,116}.

La actividad antimicrobiana directa de la mayoría de las defensinas *in vitro* desaparece con concentraciones fisiológicas de sales (por ejemplo 150 mM de NaCl), concentraciones crecientes de cationes divalentes y proteínas del suero, aunque la magnitud de la inhibición depende del microorganismo diana. Por lo tanto, se ha especulado que la actividad microbicida de las defensinas puede estar restringida a ambientes secuestrados donde se encuentren bajas concentraciones

de sal y proteínas séricas, como puede ser la superficie de las mucosas²²³.

3.1.4.2 Defensinas como agentes quimiotácticos.

Algunas α y β -defensinas han mostrado tener actividad quimiotáctica y ser capaces de inducir la producción de citocinas en distintos tipos celulares. Por tanto, las defensinas tienen la capacidad de modular el sistema inmune además de actuar como efectores directos.

La mayoría de defensinas examinadas hasta la fecha son quimiotácticas para leucocitos a concentraciones nanomolares. La α -defensina-1 es quimiotáctica para monocitos, linfocitos CD8, linfocitos CD4 naive y DC inmaduras, pero no para linfocitos CD45RO memoria ni para DC maduras^{82,209,224}. Por otro lado, HBD1 y 2 atrae células T memoria y DC inmaduras a través de la unión al receptor CCR6 (receptor para la quimiocina CCL20)^{192,225}. Además, HBD2 puede atraer e inducir degranulación de mastocitos. HBD3 y 4 atraen monocitos/macrófagos. Más recientemente, HD-5 y α -defensina-1 y 3 han mostrado ser quimiotácticas para macrófagos, células mastoides y linfocitos.

Aunque los receptores específicos responsables de la actividad quimiotáctica de las α -defensinas-1-3 no han sido identificados aún, se ha visto que la actividad quimiotáctica puede ser bloqueada por la toxina pertúsica^{37,225}, indicando que deben estar involucrados receptores acoplados a proteínas $G_{i\alpha}$.

Cada vez un mayor número de estudios muestran nuevas funciones biológicas de las α - y las β -defensinas que deberían estar mediadas a través de la interacción con receptores y activación de vías de señalización intracelulares. Sin embargo, estos receptores y vías de señalización aún no han sido descubiertos.

3.1.4.3 Inducción de mediadores inflamatorios.

Las α -defensinas-1-3 y las HBD2 han mostrado la capacidad de inducir degranulación de mastocitos y liberación de histamina y prostaglandina D₂²²³. Además, las α -defensinas-1-3 aumentan la producción de IL-8 en células epiteliales bronquiales y en monocitos³⁷. Dado que IL-8 es un potente agente quimiotáctico para neutrófilos, es muy probable que las defensinas de forma indirecta atraigan a neutrófilos a los focos inflamatorios mediante la inducción de IL-8. La degranulación de neutrófilos genera a su vez más α -defensinas-1-3 y se produciría así un ciclo de retroalimentación positiva²²³.

Por otro lado, también se ha descrito que las α -defensinas-1-3 pueden incrementar la producción de TNF- α e IL-1 y disminuir la producción de IL-10 en monocitos³².

3.1.5 Defensinas como potenciadores de la inmunidad adaptativa.

3.1.5.1 Reclutamiento de DC.

El reclutamiento de DC a los lugares de entrada de microorganismos, y su posterior maduración, son eventos críticos para la inducción de una respuesta inmune adaptativa. Como se mencionó anteriormente, las α -defensinas-1-3 y las HBD1 y HBD2 tienen la

capacidad de atraer a DC inmaduras selectivamente, pero no DC maduras. Además de atraer DC inmaduras, HBD3 es además quimiotáctica para monocitos/macrófagos. Dado que las defensinas se liberan en grandes cantidades en respuesta a estímulos inflamatorios y microbianos, es muy posible que contribuyan al reclutamiento de DC inmaduras a los sitios de entrada microbiana.

3.1.5.2 Maduración de DC.

La capacidad de las defensinas para inducir la maduración de las DC fue descrita por primera vez en el modelo murino^{21,32}. La mBD2 tiene la capacidad de inducir la maduración fenotípica y funcional en DC de ratón. El tratamiento de las DC murinas con mBD2 produjo la up-regulación de moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 y CD86), MHC clase II y el receptor de quimiocinas CCR7. Además, las DC murinas tratadas con mBD2 desarrollaban la capacidad de activar células T naive ya que inducían una mayor reacción mixta linfocitaria que las células no tratadas. Adicionalmente se demostró que este efecto madurativo era mediado a través del receptor TLR-4.

En modelo humano, se describió recientemente la capacidad de la HBD3 para producir la maduración de células presentadoras de antígeno a través de los receptores TLR1 y TLR2^{32,65}.

3.2. Defensinas y VIH.

Tanto las α como las β -defensinas han mostrado tener actividad inhibitoria frente al VIH *in vitro*. Del mismo modo, la retrociclina, una θ -defensina sintética basada en secuencias codificadas en los

pseudogenes humanos también posee una muy importante actividad inhibidora del VIH *in vitro*, incluso mayor que las otras dos subfamilias^{34,109,114,169}.

En esta tesis nos centraremos en el estudio del efecto anti-VIH de las α -defensinas1-3.

3.2.1 Actividad anti-VIH de las α -defensinas-1-3.

La capacidad de las α -defensinas1-3 para inactivar al VIH-1 fue demostrada por primera vez en 1993^{34,109,152}, sin embargo, estos hallazgos no tuvieron gran relevancia hasta que en 2002 las α -defensinas1-3 fueron asociadas al CAF (*cellular antiviral factor*) secretado por los CD8²²⁸. Esta asociación fue controvertida y reinterpretada y finalmente se vio que, aunque las α -defensinas1-3 sí que tienen efecto anti-VIH, éstas no eran secretadas por los CD8, si no por otras células contaminantes en el cultivo, y no se correspondían con el CAF^{127,228}.

La actividad anti-VIH de las α -defensinas 1, 2 y 3 ha sido posteriormente demostrada en diversos artículos y, aunque los mecanismos exactos por los que ejercen su acción no son del todo conocidos, parecen demostrar que actuarían tanto directamente sobre los viriones inactivándolos extracelularmente, como inhibiendo pasos posteriores a la entrada del virus en la célula diana. Igualmente las α -defensinas1-3 podrían ejercer un efecto antiviral indirecto modulando la expresión de los receptores y correceptores del VIH.

3.2.1.1 Efecto inhibitor directo de las α -defensinas1-3 sobre el VIH.

La capacidad de las α -defensinas1-3 de inactivar directamente al VIH se ha demostrado en distintos trabajos, a una concentración micromolar y en ausencia de suero, y la adición de suero al medio elimina este efecto. Estudios iniciales mostraron que la incubación del VIH con α -defensinas1-3 a 200 $\mu\text{g/ml}$ durante una hora daba lugar a una inhibición de la replicación viral en un 70-98%, y este efecto era abolido en presencia de un 5% de FCS¹²⁷.

Más recientemente, el efecto inhibitor directo fue también estudiado utilizando concentraciones menores de α -defensinas1-3. Así, concentraciones de α -defensinas1-3 de 1, 5 y 20 $\mu\text{g/ml}$ mostraron un efecto inhibitor directo sobre el VIH (a una MOI de 0.01) y, al igual que en el estudio anterior, este efecto fue abolido por la presencia de suero. Por otro lado, al incrementar el número de partículas virales en diez veces (MOI de 0.1), el efecto antiviral era también abolido, incluso en ausencia de suero³³.

El mecanismo involucrado en esta inhibición directa del VIH no ha sido determinado en estos estudios, pero se piensa que podría deberse, en parte, a la interacción y alteración de la envuelta lipídica viral, de forma similar a lo que ha sido descrito para el virus herpes simple 1 (VHS-1)⁴⁴. No obstante, la inhibición directa del VIH por las α -defensinas1-3 no puede ser explicada únicamente por la alteración de la envoltura lipídica, dado que la interacción de las α -defensinas1-3 con los viriones no es enteramente inespecífica y, además, no son capaces de suprimir

la infección causada por algunos virus con envoltura mientras que sí inhiben a algunos virus sin envoltura, como el adenovirus⁴⁴.

En esta línea, algunos estudios han abordado la capacidad de las α -defensinas¹⁻³ de actuar como lectinas e interactuar con glicoproteínas. Así, mediante surface plasmon resonance se demostró cómo las α -defensinas se unían a los residuos carbohidratos de la gp120 de la envoltura del VIH y del receptor CD4 de las células²¹⁵. Posteriormente, Furci *et al* mostraron en un ensayo de fusión celular cómo las α -defensinas 1-2 eran capaces de inhibir la fusión celular mediada por tres envueltas del VIH con distinta especificidad de correceptor⁶⁶, demostrando así que las α -defensinas podrían bloquear la infección en los pasos más tempranos, antes de la entrada del virus en la célula. Asimismo, demostraron la unión de las α -defensinas¹⁻² a gp120, en una región que se solapa, es contigua o bien influencia la conformación del receptor CD4 y las regiones de unión de los correceptores, ya que se observó una disminución en la unión con anticuerpos dirigidos directamente contra la región de unión de gp120 a CD4 (F105, IgG1b12) y frente a epítopos que se solapan con la zona de unión del correceptor (17b, 48d). Del mismo modo, las α -defensinas¹⁻² se unían al receptor CD4 en una región directamente involucrada en la interacción con la gp120, el dominio D1, y eran capaces de bloquear la interacción entre CD4 y gp120. Esto sugeriría que las α -defensinas poseen un perfil de unión peculiar posiblemente a través del reconocimiento de uno o más motivos carbohidratos específicos.

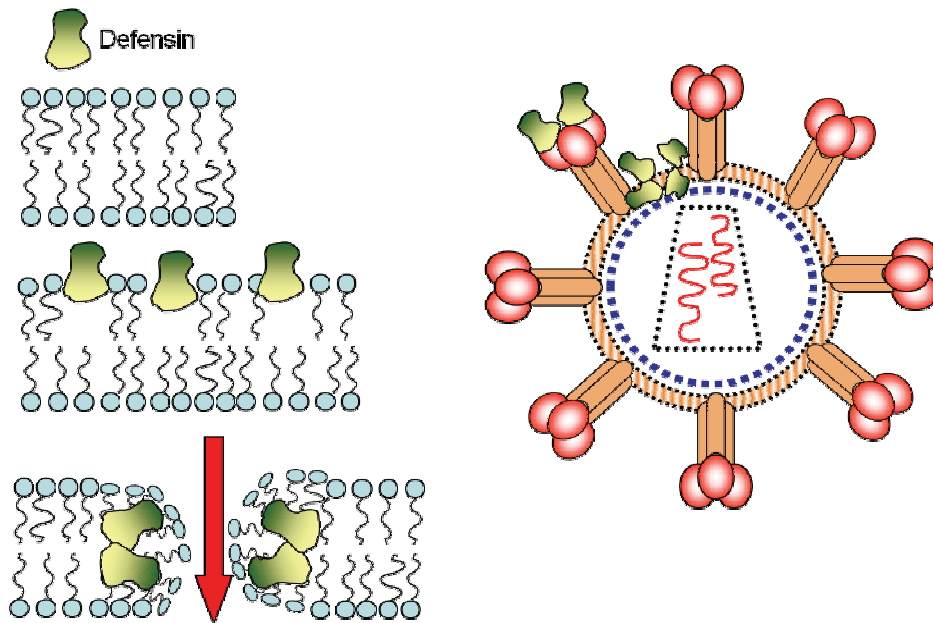


Figura 8. Efecto inhibitor directo de las α -defensinas sobre las membranas bacterianas y sobre el VIH.

3.2.1.2 Efecto de las α -defensinas1-3 sobre las células diana del VIH.

Un efecto muy importante de las α -defensinas1-3 sobre las células diana mostrado *in vitro*, que también ocurre en ausencia de suero, es su capacidad para disminuir considerablemente la expresión de CD4 en la superficie celular⁶⁶, el principal receptor del virus, así como de CXCR4, un correceptor, lo que podría tener importantes implicaciones en el efecto antiviral de las α -defensinas1-3 secretadas *in vivo*.

Por el contrario, según distintos trabajos, en presencia de suero y a concentraciones no citotóxicas, las α -defensinas no parecen actuar sobre el virus o sus receptores, sino sobre la célula infectada bloqueando la infección por VIH en los pasos posteriores a la entrada.

En ensayos de infección de ciclo único con linfocitos T CD4 activados se mostró que la α -defensina 1 era capaz de inhibir la

infección por VIH a concentraciones tan bajas como 0.25 µg/ml, aunque el efecto óptimo se obtuvo con una concentración de 1 µg/ml, capaz de inhibir al virus tanto en células T CD4 activadas como en ensayos de infección de macrófagos³³. Este efecto inhibitorio de la α -defensina 1 fue observado incluso cuando las células eran pretratadas con la defensina, lavadas y luego infectadas con el VIH, indicando que la inactivación directa de los viriones no era necesaria para el efecto inhibitorio observado^{33,127}. Más aún, se demostró que el tratamiento con α -defensina 1 de los linfocitos T CD4 16 horas después de la infección por VIH, era capaz de reducir en un 70% la expresión de genes del VIH a concentraciones de 0.25 o más µg/ml³³.

La capacidad inhibitoria de la α -defensina 1 fue también demostrada posteriormente utilizando aislados primarios del VIH X4, R5 y X4R5 e infectando células T CD4 primarias³⁵. En este mismo trabajo se demuestra que la α -defensina 1 afectaría más de un punto del ciclo de replicación del VIH, que ocurriría después de la transcripción inversa y que incluiría un efecto postintegración, y se demuestra que la vía de señalización de la protein cinasa C (PKC) estaría implicada en la inhibición del VIH mediada por la α -defensina 1. Ya había sido demostrada previamente la importancia que la PKC juega en la infección por VIH⁶⁰ y que las α -defensinas son capaces de inhibir esta vía de señalización³⁶. En este estudio³⁵ muestran además que la α -defensinas 1 bloquearía probablemente los puntos de importación

nuclear y transcripción del virus. Sin embargo, es muy posible que otras vías de señalización estén también implicadas.

Otro posible mecanismo de las α -defensinas¹⁻³ para inhibir la infección por VIH en presencia de suero ha sido descrito en macrófagos. La incubación de los macrófagos con α -defensinas¹⁻² incrementó considerablemente la expresión de RNA y la producción de proteína de las CC-quimiocinas MIP-1 α y MIP-1 β (MIP, *macrophage inflammatory protein*) que son capaces de inhibir la infección mediante competición con las cepas M-trópicas del VIH por el receptor CCR5 en los macrófagos. Este efecto fue además confirmado mediante la utilización de anticuerpos frente a CC-quimiocinas que abolían completamente la acción anti-VIH de las α -defensinas¹⁻² en macrófagos⁸⁵.

Tanto el efecto directo sobre el VIH, como el indirecto sobre la célula diana, pueden tener relevancia *in vivo* en una respuesta inmune innata frente al VIH. En la superficie de las mucosas, en ausencia de suero, las α -defensinas¹⁻³ podrían actuar directamente sobre los viriones, inhibir la unión entre la gp120 y el CD4, así como disminuir considerablemente la expresión del receptor y correceptores del VIH. En cambio, en presencia de suero, el efecto inhibitor se ejercería sobre la célula diana, actuando probablemente en los puntos de importación nuclear y transcripción del virus.

En la figura 9 se muestra un modelo resumen de los mecanismos por los que las defensinas podrían ejercer su efecto inhibitor del VIH.

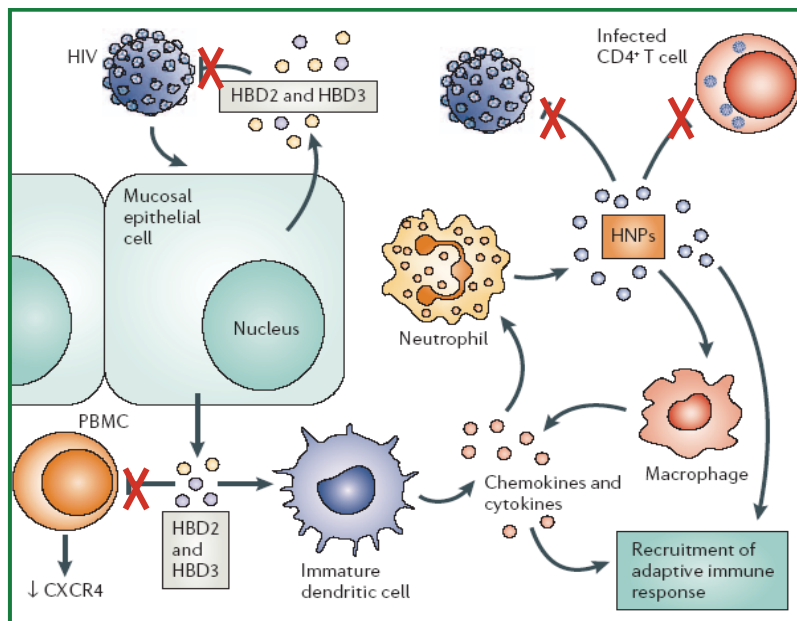


Figura 9. Resumen de los mecanismos anti-VIH directos e indirectos de las defensas. (Adaptado de Klotman et al, 2006)

3.2.1.3 Evidencias del efecto anti-VIH de las α -defensinas1-3 *in vivo*.

Pocos trabajos han abordado el estudio de las α -defensinas1-3 en pacientes infectados por VIH y la importancia *in vivo* del efecto anti-VIH de las α -defensinas1-3.

Trabattoni *et al* estudiaron la producción de α -defensinas1-3 en individuos expuestos al VIH pero no infectados (ENI), individuos infectados por VIH y controles sanos en PBMC y biopsias cervicales²¹⁰, encontrando una mayor expresión de defensinas en ENI. Estos resultados estarían a favor de un posible papel protector de las α -defensinas1-3 frente a la infección por VIH.

Otros trabajos analizaron la presencia de α -defensinas1-3 en tejidos linfoides de los pacientes infectados por VIH^{61,62}, el mayor punto

de replicación del VIH, encontrándose una mayor expresión en pacientes infectados por VIH que en no infectados.

La presencia de α -defensinas1-3 en la leche materna también ha sido demostrada en diversos artículos^{15,23} aunque su papel en la transmisión vertical del VIH no está del todo claro. Niveles mayores de α -defensinas1-3 han sido encontrados en mujeres VIH-positivas no tratadas con HAART frente a las mujeres tratadas y una correlación positiva con el RNA viral fue encontrada. Se especula que podrían estar implicadas en reducir la infectividad del virus en la leche materna o en aumentar la resistencia del recién nacido¹⁵.

Finalmente diversos estudios han analizado la presencia de α -defensinas1-3 en secreciones mucosas vaginales y moco cervical, demostrándose la presencia de niveles que varían a lo largo del ciclo menstrual y el embarazo, por lo que muy probablemente estarán influenciados por las concentraciones de hormonas sexuales⁴¹. Las α -defensinas1-3 encontradas en estas secreciones fueron capaces de inhibir al VIH *in vitro*, no obstante, debido a que las α -defensinas1-3 también aumentan frente a infecciones de transmisión sexual o vaginosis bacteriana^{41,120}, se hace muy difícil determinar si estarían o no implicadas en la adquisición del VIH.

4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

Durante los últimos años, cada vez más autores apuntan hacia la necesidad de encontrar nuevas estrategias para luchar contra la

pandemia por VIH, y va ganando cada vez mayor relevancia el papel que juega la inmunidad innata en la lucha frente a la infección, especialmente durante los primeros contactos entre el virus y las células del sistema inmune. La capacidad de las defensinas para inhibir al virus tanto antes de que éste infecte a la célula, como después de su entrada en la célula diana, así como su amplia distribución por los tejidos y, en particular, en las mucosas que sirven como puntos de entrada del virus, sus propiedades inmunomoduladoras y su capacidad para regular la expresión del receptor y correceptores del VIH, hacen de las defensinas moléculas muy prometedoras en el futuro de la lucha frente al VIH.

Por otro lado, la mayoría de estudios de α -defensinas¹⁻³ hasta el momento, se han basado sobre todo en el análisis de la capacidad inhibidora del VIH *in vitro* y muy pocos trabajos se han enfocado en el estudio de cohortes de pacientes infectados por VIH. Particularmente, ningún estudio se ha centrado en las DC, células clave en la infección por VIH, debido a su localización en los puntos de entrada del virus y a su papel fundamental en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa, a través de la presentación antigénica, y en la transmisión del virus a las células T CD4 a través de la sinapsis inmunológica e infecciosa.

Por tanto, las peculiaridades biológicas de las defensinas, que hacen de ellas unas moléculas efectoras de la inmunidad innata únicas, al mismo tiempo que son capaces de iniciar y modular la respuesta

inmune adaptativa, unido al hecho de la ausencia de estudios sobre α -defensinas humanas y DC, y la escasez de trabajos que aborden el estudio de las α -defensinas1-3 en pacientes infectados por VIH, nos llevó a concentrarnos en el estudio de la posible influencia de las α -defensinas1-3 sobre la infección por el VIH.

ii. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

ii. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

I) Las células dendríticas inmaduras presentes en mucosas, epitelios y otros territorios serían capaces de producir y secretar α -defensinas¹⁻³, lo que tendría una gran lógica para facilitar su función frente a los distintos patógenos, incluido el VIH, con los que se encontraran en dichos tejidos.

II) Cuanto mayor y/o más efectiva fuera la producción y secreción de α -defensinas¹⁻³ por las DC, mayor sería su capacidad para “lesionar” al VIH antes y después de capturarlo, lo que reduciría su infectividad y favorecería un procesamiento eficiente del virus inactivado sin que las DC se infectasen, así como la inactivación de las partículas virales unidas a la membrana de la DC, evitando de este modo que el virus pudiera infectar a la célula T CD4 durante la presentación antigénica.

III) Esta hipótesis predice que existiría una expresión diferencial interindividual de defensinas en las células dendríticas, lo que constituiría un factor de resitencia/susceptibilidad a la infección por VIH y su progresión a SIDA.

2. OBJETIVOS.

I) Investigar si las DC producen y secretan α -defensinas¹⁻³ y si esta producción se ve modificada tras la maduración de estas células.

II) Determinar los distintos factores que serían capaces de modular la producción de α -defensinas¹⁻³ por las DC.

III) Estudiar los niveles de producción de α -defensinas¹⁻³ por DC en individuos sanos y en distintos grupos de individuos infectados por VIH y

iV) Cuantificar los niveles plasmáticos de α -defensinas¹⁻³ en distintos grupos de individuos infectados por VIH.

V) Analizar posibles asociaciones entre indicadores de evolución de la enfermedad y los niveles de α -defensinas¹⁻³ encontrados en pacientes infectados por VIH.

iii. MATERIALES Y MÉTODOS

iii. MATERIAL Y MÉTODOS.

1. Generación de células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC).

1.1 Selección por adherencia.

El procedimiento de diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos de sangre periférica se realizó como está descrito en Garcia, F. *et al.* con modificaciones⁷¹ (Figura 10). El protocolo de obtención fue el mismo para sangre obtenida a partir de concentrados leucocitarios de donaciones del banco de sangre (buffy coats), sangre periférica de donantes sanos o individuos infectados por VIH, según se especifica en cada sección de los resultados.

Mediante un gradiente de ficoll estándar (sigma) se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, peripheral blood mononuclear cells). Estas células se resuspendieron en medio cultivo XVIVO-15 (Bio-Whittaker, Walkersville, MD, USA) suplementado con 1% de suero AB humano, 50 µg/ml de gentamicina y 2,5 de µg/ml fungizona, y fueron cultivadas a una concentración de 3 millones de células/ml durante dos horas a 37°C y 5% de CO₂. Durante este periodo, las células CD14⁺ (monocitos) se adhieren al plástico, mientras que los linfocitos quedan en suspensión. Seguidamente se eliminaron las células no adherentes mediante 4 lavados y las células adherentes se cultivaron con el mismo medio descrito suplementado con 1000 U/ml de GM-CSF e IL-4 (Prospec-tany) en los días 0, 3 y 5 de cultivo. Tras 5 días se obtuvieron células dendríticas inmaduras (imMDDC). Para obtener DC maduras

(mMDDC), las imDC de 5 días fueron cultivadas 2 días adicionales en presencia de distintos agentes madurativos según el experimento: cóctel de citocinas (1000 U/ml de TNF- α , 10 ng/ml IL-1 β , 1000 U/ml IL-6 (Strathmann Biotec AG, Hamburg, Germany), LPS (500 ng/ml, sigma), IFN- α .

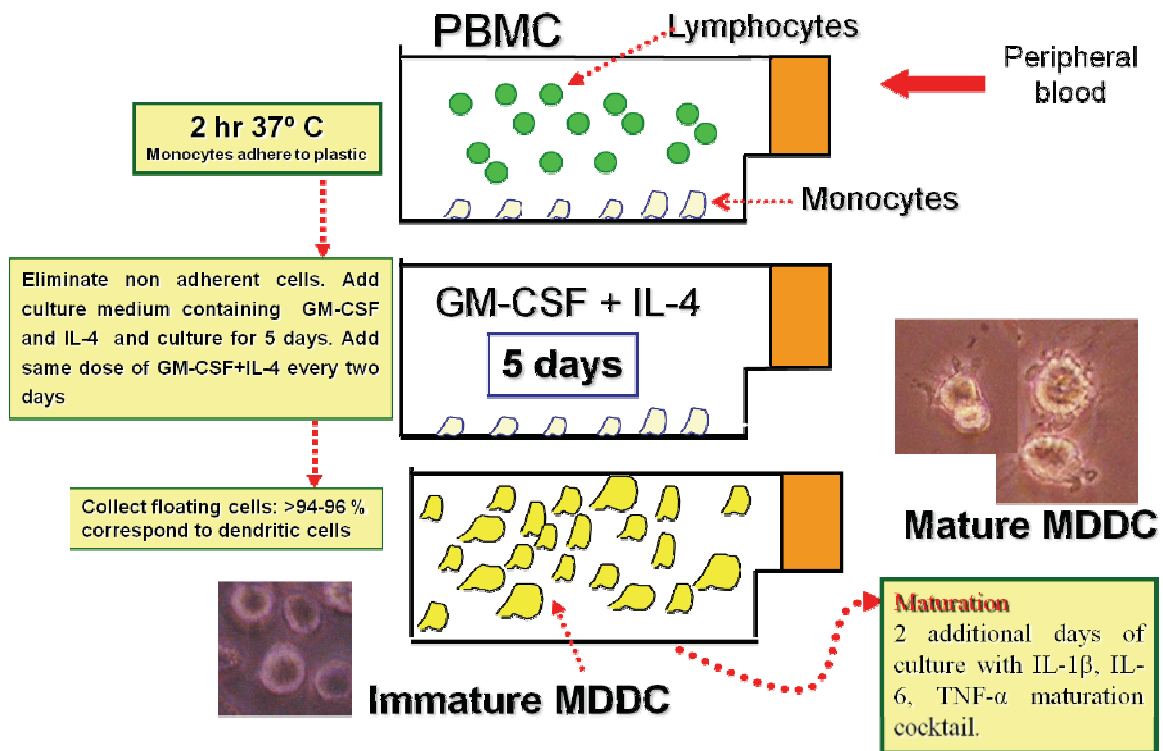


Figura 10. Protocolo de diferenciación de las DC derivadas de monocitos.

1.2 Selección por bolitas magnéticas.

De manera alternativa, para algunos de los experimentos, según se especifica, las células CD14⁺ fueron seleccionadas positivamente a partir de las PBMC por bolitas magnéticas unidas a un anticuerpo anti-CD14 y columnas (Midimacs LS columns) (Milteny Biotec). Tras elución de las columnas las células fueron cultivadas a 0.7×10^6 cells/ml en medio suplementado con 1% de suero AB, IL-4 y GM-CSF.

El inmunofenotipo y pureza de las MDDC fue determinado mediante citometría de flujo utilizando combinaciones de mAbs conjugados con FITC y PE contra HLA-DR y CD14, CD80, CD83, CD86, CD40, CD11c, CD3, CD19 y CD56 (BD Biosciences). Como control negativo, se utilizaron mAbs conjugados a FITC y a PE de igual isotipo y especificidad desconocida (BD Biosciences).

2. Aislamiento de células dendríticas mieloides (myDC) circulantes de sangre periférica.

El aislamiento de myDC fue realizado utilizando concentrados leucocitarios de donaciones del banco de sangre. Las myDC fueron seleccionadas inmunomagnéticamente usando bolitas magnéticas (Miltenyi Biotec) unidas al anticuerpo anti-human CD1c (BDCA-1) a través de columnas MiniMacs LS columns. Previo a esta selección positiva se realizó una depleción de células B con bolitas unidas a anti-CD19 (Miltenyi Biotec). Tras elución de las columnas, las células fueron cultivadas a 0.7×10^6 cel/ml.

3. Aislamiento de linfocitos totales y linfocitos naïve.

Los linfocitos totales fueron obtenidos tras adherencia a placa de las PBMC, recuperando las células no adheridas. Estas células fueron lavadas y se emplearon en cocultivos alogénicos.

Alternativamente, para la obtención de una población de células T CD4 naïve, se utilizó el kit naïve CD4 isolation kit (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de PBMC se realizó una selección negativa, de forma que quedaron retenidas en la

columna las células con marcadores CD8, CD16, CD19, CD14, CD45RO, y se emplearon las células que pasaron a través de la columna para realizar luego el cocultivo.

4. Análisis mediante citometría de flujo.

4.1 Análisis de moléculas de superficie.

Para el análisis de moléculas de superficie, las células de estudio (MDDC, myDC o células T) fueron primero bloqueadas con PBS más suero AB humano al 20% durante 30 min en hielo. A continuación se incubaron con los anticuerpos monoclonales de interés según el caso, unidos a FITC, PE o PerCP según es específica en cada caso. Las células fueron incubadas durante 20-30 min con el anticuerpo, a 4 °C protegidas de la luz. Tras esta incubación las células fueron lavadas y fijadas para ser leídas por el citómetro de flujo FACscan (BD Biosciences). Las poblaciones celulares fueron seleccionadas mediante parámetros de FSC y SSC.

4.2 Análisis de defensinas intracelulares.

Para la tinción intracelular de las α -defensinas1-3 en MDDC, las células fueron incubadas o no (según el experimento) con monensina (Golgi Stop, BD Biosciences) durante 8h, lavadas, y marcadas primero en su superficie por anticuerpos anti-HLA-DR (BD Biosciences) conjugados con FITC, con el protocolo que se ha explicado en el apartado 4.1. Posteriormente fueron fijadas y permeabilizadas utilizando el kit Cytofix-Cytoperm Plus kit (BD Biosciences) siguiendo las instrucciones indicadas. Se incubaron entonces con el anticuerpo

monoclonal biotinado mouse anti-human defensins 1-3 (clone D21, Hycult Biotechnology) durante 30 min y luego con estreptavidina conjugada con PE (1/100, BD Biosciences) durante otros 30 min. El control negativo para el marcaje de membrana fue un control de isotipo conjugado con FITC (BD Biosciences) y para el anticuerpo anti-defensinas un control de isotipo mouse IgG1 conjugado con biotina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA)

Para la tinción de α -defensinas 1-3 intracelulares en DC mieloides se utilizó el mismo protocolo, excepto que la membrana celular fue marcada con anti-CD1c FITC (Miltenyi Biotech) y las células fueron incubadas durante 4h con la monensina.

Los datos fueron analizados con el software FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR).

5. Inmunotinción para análisis mediante microscopia confocal.

Los cubreobjetos fueron incubados con poli-L-Lisina (Sigma) durante 30 min a 37°C, y luego lavados dos veces con PBS. Las células, tras incubación o no con monensina durante 8h, fueron lavadas dos veces con PBS, ajustadas a $2 \times 10^5 / 50 \mu\text{l}$, en PBS, y luego incubadas en los cubreobjetos durante 30 min. Después, las células ya adheridas fueron lavadas suavemente dos veces con PBS. La superficie celular de las MDCC fue marcada con anti-CD40 conjugado con FITC, durante 30 min a 4°C. Las células fueron entonces lavadas, fijadas y permeabilizadas de acuerdo a las instrucciones del kit "Cytifix & Cytoperm". Para detectar las defensinas intracelulares, se utilizó el anticuerpo monoclonal

biotinado mouse anti-human defensins 1-3 (clone D21, Hycult Biotechnology), durante 30 min a 4°C. Tras este marcaje, las células fueron lavadas e incubadas con estreptavidina TRITC (BD Pharmigen) durante 30 min, a 4°C. Los controles negativos fueron realizados con un mAB mouse IgG1 conjugado con biotina (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) en lugar del anticuerpo anti-HNP. Durante los últimos 10 min de este tratamiento los núcleos de las células fueron teñidos con TO-PRO3 (Molecular Probes, dilución 1/1000).

Finalmente, las células fueron lavadas dos veces en PBS, y los cubreobjetos fueron montados en un porta objeto con “immunoFluor mounting médium” (ICN Biomedical inc., Costa mesa, CA.). Las imágenes de microscopía confocal fueron adquiridas con el equipo “Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope” (Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany) con Lasers de Argon y de HeNe unidos a un microscopio invertido Leica DMIRE2. Las emisiones de TRITC, FITC y To-pro3 fueron adquiridas secuencialmente mediante un *triple dichroic beam-splitter* (TD 488/543/633nm) con rangos de detección de emisión de: 500- 535 nm, 555- 625 nm, 650- 750 nm, respectivamente. Las imágenes de contraste de fase fueron obtenidas con la luz transmitida del fotomultiplicador. Todas las imágenes fueron obtenidas utilizando un objetivo de inmersión en aceite 63x (NA 1.32) equipado con ópticas de contraste de fase y un *pinhole* confocal calibrado a *1 Airy uni*”. Debido al pequeño tamaño de las imágenes de las células fue necesario realizar un zoom electrónico para realizar una

mayor magnificación y mejor resolución de las éstas. El montaje y edición de las imágenes fue realizado utilizando el Software “Image Processing Leica Confocal”.

6. ELISA.

Para cuantificar los niveles de α -defensinas1-3 presentes en los sobrenadantes de los cultivos celulares y los plasmas, se utilizó el ELISA comercial HNP 1–3 ELISA test kit (Hycult Biotechnology, Uden, The Netherlands) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las placas fueron leídas a 450 nm, después de detener la reacción con H_2SO_4 1N, en un lector Microplate Reader 2001 (BIO WHITTAKER). Los resultados enseñados corresponden a la media de la densidad óptica (OD) de duplicados.

7. Expresión relativa de mRNA mediante RT-PCR en tiempo real.

Para evaluar la expresión relativa de mRNA de α -defensinas1-3 se optimizó una RT-PCR a tiempo real.

El RNA total fue extraído de las células utilizando el reactivo de TRIzol (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante y el kit Total RNA purification system (Invitrogen Corp., Paisley, Scotland). Alícuotas de 1 μ g de RNA total, 0.5 μ g de oligo-(dT) (Sigma) como cebadores y 2 μ l de dNTPs (mezcla de, 5 mM cada uno; Sigma) se disolvieron en agua destilada estéril libre de RNAsas hasta completar un volumen de 12 μ l, luego se calentaron a 65°C durante 5 min y enfriaron a 4°C. Posteriormente, se añadieron 4 μ l de *First Strand Buffer 5X* (Tris-HCl 250 mM, KCl 375 mM, MgCl 15 mM, pH 8,3; Invitrogen), 2 μ l de ditiotreitól 100

mM (DTT, Invitrogen SA, Barcelona, España) y 1 μ l de inhibidor de RNAsas (RNasa OUT; Invitrogen SA) y se incubaron a 42°C durante 2 min. La reacción fue iniciada con la adición de 1 μ l (200 unidades) de transcriptasa reversa SuperScript II RT (Invitrogen), incubación a 42°C durante 50 min y finalizada a 70°C durante 15 min. Los cDNAs fueron amplificados con el kit comercial *LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I* (Roche, Penzberg, Germany). Cada reacción fue llevada a cabo con 2 μ l de cDNA, 4 μ l de mezcla de reacción 5X (FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I), 0.5 μ M de cada cebador y agua destilada estéril libre de RNAsas hasta completar un volumen final de 20 μ l. La PCR en tiempo real fue llevada a cabo durante 45 ciclos utilizando el termociclador LightCycler (Roche). Los primers específicos fueron seleccionados de acuerdo con la base de datos de GeneBank y las condiciones de temperaturas y tiempos para la amplificación fueron las siguientes: α -defensins 1–3, amplímero 105 bp, sentido: 5'-CTT GGCTCCAAAGCATCC-3', antisentido 5'-GAACCTGCATCTACCAGGGA-3'; (desnaturalización 5 s a 95°C, hibridación 5 s a 66, extensión 4s a 72° y adquisición de fluorescencia por 4s a 82); β -2-microglobulina: amplímero 107 pb, sentido: 5'-ACACA ACTGTGTTCACTAGC-3', antisentido: 5'-CAACTCATCCACGTCACC-3', (desnaturalización 5 s a 95°C, hibridación 10 s a 58°C, extensión 4 s a 72°C, y adquisición de fluorescencia por 4 s a 85 °C).

Para calcular la expresión relativa de α -defensinas1-3 se utilizaron los niveles de mRNA de la β -2-microglobulina¹⁵⁶ como control de carga

para normalizar las cantidades de mRNA. Los niveles relativos de mRNA fueron calculados utilizando la siguiente fórmula⁹⁸: Expresión relativa de mRNA de α -defensinas1-3 = $2^{- (Ct \text{ de } \alpha\text{-defensinas1-3} - Ct \text{ del control de carga})} \times 10^3$. Todas las muestras de cDNA fueron amplificadas por duplicado, y se muestran las medias aritméticas \pm 1SD.

8. Secuenciación

Para validar los primers se secuenció el producto de la PCR. Ambos primers fueron específicamente seleccionados para localizarse en diferentes exones, asegurándose así la amplificación de cDNA y no DNA genómico.

9. Tratamientos celulares.

9.1 Ensayos de estimulación con α -defensinas1-3.

Para los ensayos de maduración, tras 5 días en cultivo, las imMDDC fueron lavadas y cultivadas por dos días adicionales en el mismo medio descrito anteriormente (X-VIVO15 suplementado con 1% de suero humano AB) en presencia de α -defensinas1-3 (human purified HNP1-3, Hycult biotechnology, endotoxin-free) a las siguientes concentraciones: 0.25 $\mu\text{g/ml}$ (7.3×10^{-8} M), 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (1.4×10^{-7} M), 1 $\mu\text{g/ml}$ (2.9×10^{-7} M), 10 $\mu\text{g/ml}$ (2.9×10^{-6} M) y 20 $\mu\text{g/ml}$ (5.8×10^{-6} M). En paralelo, las imMDDC fueron también cultivadas durante dos días en presencia del cóctel de maduración de citocinas y las mismas dosis de α -defensinas1-3 descritas, de manera simultánea. En algunos de los experimentos, las imMDDC se cultivaron durante estos dos días con las mismas

condiciones pero en presencia de una mayor concentración de suero humano (X-VIVO15 suplementado con 5% suero AB humano).

Para los ensayos de diferenciación, las células CD14+ fueron inmunomagnéticamente seleccionadas y cultivadas durante 5 días en el mismo medio descrito (X-VIVO15 con 1% suero AB humano) en placas de 6 pocillos. Desde el día 0 hasta el día 4 de cultivo se fueron añadiendo α -defensinas 1-3 a cada pocillo, a las dosis de 20 o 0.5 $\mu\text{g/ml}$ en paralelo, y las células y los sobrenadantes fueron analizados en día 5. Como células control, en uno de los pocillos las MDDC fueron diferenciadas en ausencia de α -defensinas 1-3. El esquema del diseño del ensayo se muestra en la figura.

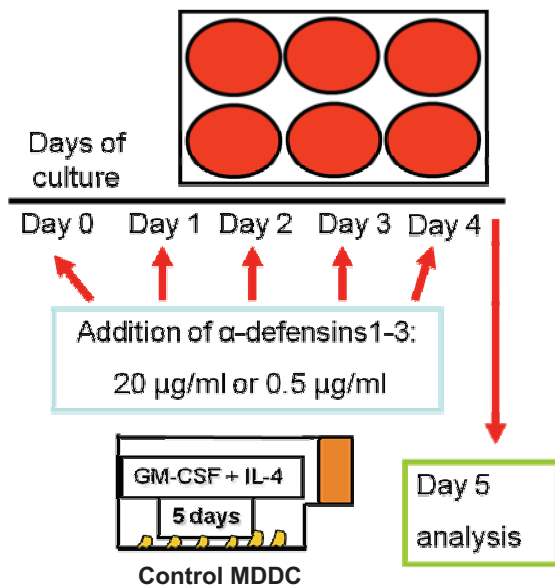


Figura 11. Esquema del diseño del ensayo de diferenciación.

A lo largo del estudio, al menos tres batches diferentes de α -defensinas 1-3 fueron utilizados y no se detectaron diferencias en los resultados.

9.2 Tratamientos hormonales.

MDDC inmaduras o myDC aisladas directamente de sangre, fueron lavadas e incubadas durante 24h con 17 β -estradiol (E2, Sigma) o con progesterona soluble en agua (water soluble progesterone; PG, Sigma) a distintas dosis: 0.1, 1 y 10 μ g/ml. Tras estas incubaciones las células se analizaron o se utilizaron en co-cultivo o ensayos de infección.

9.3 Ensayos de infección con NDV-B1 y NDV-NS1

Células con o sin pretratamiento estrogénico, fueron infectadas con los virus NDV-B1 o NDV-NS1 (NewCastle Disease Virus) a una MOI (multiplicity of infection) de 0.5 durante 40 min en medio RPMI libre de suero. Tras los 40 min, se añadió medio suplementado con suero, para dejar las células a 1×10^6 cel/ml al 1% de suero AB humano. Las células fueron entonces incubadas durante 2h, 8h y 18h y los sobrenadantes y las células fueron recogidos para su análisis.

10. Medición de citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes.

Los niveles de citocinas y quimiocinas en los sobrenadantes fueron analizados mediante ELISA para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-10, IL-8 y TGF- β 1 como parte de un ensayo multiplex siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron por Luminex, y los datos se analizaron con el software Luminex xPONENT.

11. Detección de apoptosis y necrosis.

Se emplearon Annexin V (ApoDETECT™ Annexin V-FITC kit; Zymed Laboratories, San Francisco, CA) y 7AAD (7-aminoactinomycin D) para detectar células apoptóticas y necróticas respectivamente. Tras la

incubación con α -defensinas1-3 durante 48h, las MDDC tratadas y no tratadas con el cóctel de maduración, fueron lavadas con PBS frío y resuspendidas en AnV-binding buffer. Las células fueron entonces marcadas siguiendo las instrucciones del fabricante y se analizaron por citometría de flujo.

12. Cultivo mixto leucocitario.

12.1 Cultivo alogénico tras incubación con defensinas.

Las células respondedoras fueron PBMC depletadas de monocitos por adherencia a placa. Estas células fueron marcadas con CFSE (Cell Trace CFSE Cell Proliferation kit for flow cytometry, Invitrogen) tal y como indicaban las instrucciones. Tras la incubación con CFSE las células fueron lavadas y resuspendidas en medio X-VIVO-10 y puestas en cocultivo con las células estimuladoras, es decir, MDDC alogénicas, en placas de 96 pocillos a una razón estimuladoras/respondedoras de 1:10, en triplicados. Las MDDC habían sido tratadas con o sin α -defensinas1-3 a las dosis de 1 o 20 $\mu\text{g/ml}$ durante 48h, lavadas y fenotipadas antes de ser puestas en cocultivo. Tras 6 días de incubación, las células en cocultivo fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD3 perCP y anti-CD4 PE (Beckton Dickinson) y analizadas por citometría de flujo.

12.2 Cultivo alogénico para la medición de defensinas en sobrenadante.

MDDC tratadas con o sin E2 o PG a las dosis de 10, 1 o 0.1 $\mu\text{g/ml}$ durante 24h, fueron puestas en cocultivo con células CD4 naive

alogénicas (naïve CD4 isolation kit, Miltenyi Biotec), a diferentes razones (1:1, 1:3 y 1:5) en placas de 96 pocillos, en triplicados. Tras 1, 2 y 3 días en cocultivo, los sobrenadantes fueron analizados para detectar α -defensinas1-3 por ELISA.

13. Estudio de la producción de α -defensinas1-3 en individuos infectados y no infectados por VIH.

13.1 Cohortes de individuos incluidos en el estudio.

Todos los individuos fueron reclutados en el Hospital Clínico de Barcelona. Los grupos de pacientes incluidos en el estudio fueron:

Controladores de élite (n=4): Individuos infectados por VIH, con niveles de células T CD4 mayores de 450 células/microlitro y carga viral plasmática (PVL, *plasmatic viral load*) bajo los límites de detección (menos de 50 copias), en todas las determinaciones y en ausencia de tratamiento antirretroviral.

Controladores (VC; n=15): Mismas características que el grupo anterior, pero con PVL entre 50 y 5000 copias.

No controladores virémicos (VNC; n=11): Se seleccionaron pacientes con niveles de CD4 mayores de 450 cél/microl y carga viral mayor que 5000 copias en ausencia de tratamiento antirretroviral.

Pacientes con tratamiento antirretroviral (HAART; n=9): Pacientes con tratamiento antirretroviral y niveles de CD4 mayores de 450 y sin infecciones oportunistas.

Individuos no infectados por VIH (n=15): individuos control, sanos, voluntarios, no infectados y no expuestos.

13.2 Muestras necesarias para el estudio.

Obtención de células:

Se extrajeron 50 ml de sangre periférica anticoagulada con EDTA mediante venopunción, y de esta sangre se obtuvieron las MDCC siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

Plasmas:

Se emplearon plasmas criopreservados y se utilizaron al menos dos plasmas de cada paciente, extraídos en momentos diferentes, para estudiar posibles variaciones a lo largo del tiempo. La determinación se realizó con el mismo kit de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante para la detección de defensinas en plasma.

13.3 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Un valor de p menor que 0.05 se consideró como estadísticamente significativo.

Las comparaciones entre dos grupos se realizaron utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas. Para comparaciones múltiples se utilizó el test de Kruskal-Wallis seguido de un post-test (Dunbar). Las correlaciones se estudiaron aplicando el test de correlación de Spearman. Y, finalmente, se utilizaron curvas de mortalidad y el test de Log-Rank (Mantel-Cox) para estudiar diferencias significativas entre las distintas curvas.

iv. RESULTADOS

iv. RESULTADOS.

1. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANAS

PRODUCEN Y SECRETAN α -DEFENSINAS-1-3.

1.1 Expresión relativa de mRNA de α -defensinas-1-3 en MDDC.

Para determinar si las MDDC producían α -defensinas1-3 se estudiaron los niveles de expresión de mRNA por RT-PCR convencional y a tiempo real, tanto en MDDC inmaduras y maduras como en monocitos, sirviendo estos como control, ya que son las células de las que se derivaron las DC. Además, como control positivo se utilizaron PBMC totales, ya que había sido previamente descrita la presencia de α -defensinas1-3 en estas células⁵⁶.

Tanto en imMDDC como en monocitos se encontraron transcritos de α -defensinas1-3 (fig.1A), pero la expresión relativa de RNA de α -defensinas1-3 en imMDDC fue mayor que en los monocitos (fig.1B). Por el contrario, no se detectaron o se detectaron niveles muy bajos de α -defensinas1-3 en mMDDC (fig 1A y 1B). Es importante destacar que la viabilidad de las MDDC maduras e inmaduras fue similar (>90%).

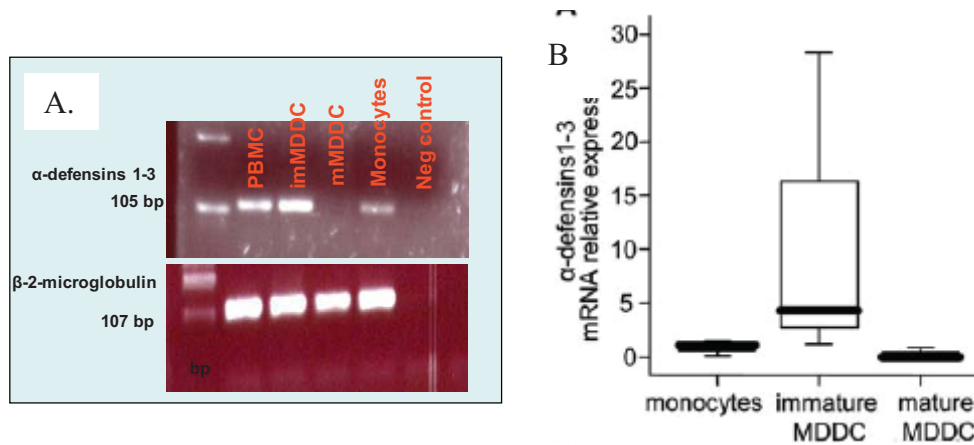


Figura 1. Expresión relativa de mRNA por RT-PCR convencional (A) y a tiempo real (B). Los niveles de expresión relativa de mRNA fueron normalizados frente a β -2-microglobulina. Las cajas representan 3 experimentos independientes con donantes diferentes. La línea horizontal dentro de las cajas representa la mediana. Los límites representan los percentiles 10 y 90.

1.2 Detección intracelular de α -defensinas-1-3 en MDDC.

Tras estos resultados se investigó la presencia de α -defensinas1-3 intracelulares por citometría de flujo, con resultados negativos iniciales en MDDC inmaduras y maduras (fig2A). Ya que las defensinas han sido descritas como péptidos de secreción⁶⁷, el ensayo se repitió tras tratamiento con monensina durante 8h, para acumular los péptidos de α -defensinas1-3 en el interior de la célula dendrítica. El análisis por citometría de flujo tras tratamiento con monensina reveló que el 9,18% de las imMDDC contenía α -defensinas1-3 intracelulares, mientras que esto sólo ocurría en un 1,03% de las mMDDCs (fig2B). Aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov a las diferencias en los histogramas entre MDDC inmaduras y maduras, estas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas ($P < 0,001$).

Así mismo, mediante microscopía confocal, se pudieron observar las α -defensinas 1-3 intracelulares (fig.2C).

Estos datos sugerían que las defensinas podrían haber sido secretadas a los sobrenadantes de los cultivos.

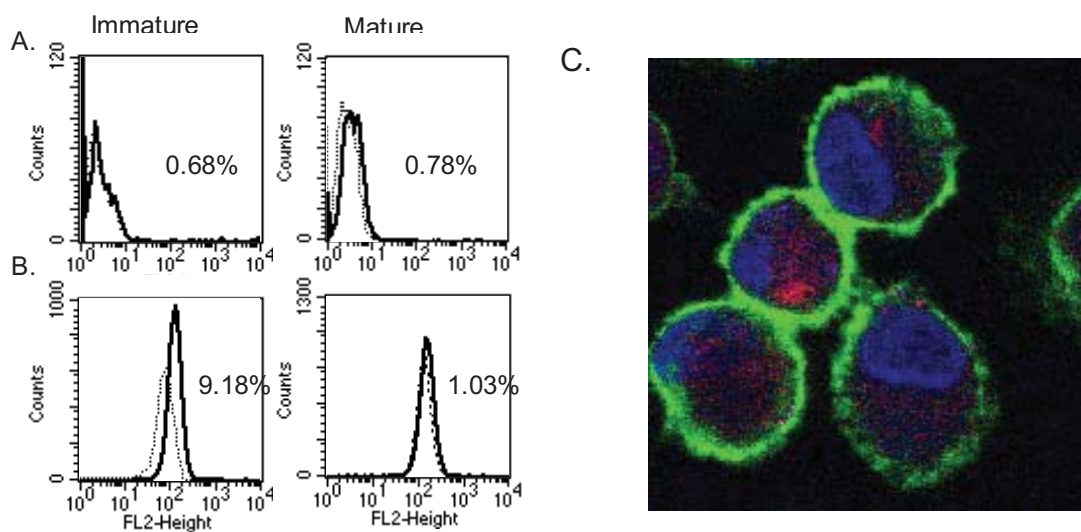


Figura 2. Detección intracelular de α -defensinas 1-3 por citometría de flujo (A y B) y microscopía confocal (C). (A) En ausencia de tratamiento con monensina no se detectaron defensinas intracelulares. (B) Detección tras tratamiento de las MDDC inmaduras y maduras con monensina durante 8h. Se realizó un doble marcaje para HLA-DR y α -defensinas 1-3, las células positivas para HLA-DR fueron seleccionadas y los histogramas corresponden a las células positivas para α -defensinas 1-3. Más de 100.000 eventos fueron analizados en cada histograma. Experimento representativo de 3 experimentos independientes. (C) Microscopía confocal de MDDC inmaduras marcadas en superficie con anti-CD40 FITC e intracelularmente para α -defensinas 1-3.

1.3 Secreción de α -defensinas 1-3 por las MDDC.

Así pues, el próximo paso fue analizar los sobrenadantes de los cultivos de las MDDC inmaduras (5 días en cultivo) y las MDDC maduras (7 días en cultivo) mediante ELISA, para investigar la presencia de α -defensinas 1-3. Como control, los monocitos de los que las MDDC se derivaron también se cultivaron en paralelo, y las α -defensinas 1-3 se midieron a día 5 y 7 para MDDC inmaduras y maduras respectivamente.

En los sobrenadantes de imMDDC y monocitos se detectaron α -defensinas 1-3, aunque los niveles fueron claramente superiores en los

sobrenadantes de las imMDDC que en los de los monocitos (fig3A), mientras que en los sobrenadantes de las mMDDC los niveles tendían a disminuir, alcanzando unos niveles similares a los observados en los sobrenadantes de los monocitos, incluso a pesar de estar dos días más en cultivo (fig.3B)

Estos resultados concuerdan con los resultados encontrados en RNA y proteína intracelular. Además, hay que resaltar, que la disminución de α -defensinas1-3 en los sobrenadantes de las mMDDC comparado con las imMDDC no fue resultado de la adsorción a las placas de cultivo ya que sobrenadantes centrifugados de imMDDC, cultivados en paralelo durante 48h, en ausencia de células, con o sin cóctel de maduración, no mostraron diferencias significativas (fig3C). Este descenso es probablemente el resultado de la ausencia de síntesis de α -defensinas1-3, aunque cabe la posibilidad de que pudiera reflejar cierto grado de consumo por parte de la MDDC durante su proceso de maduración.

La variabilidad interindividual observada en la cantidad de α -defensinas1-3 producidas por las imMDDC es consistente con la expresión diferencial de mRNA en PBMC dependiendo de las variaciones en el número de copias de los genes de α -defensinas DEFA1 y DEFA3^{5,12}.

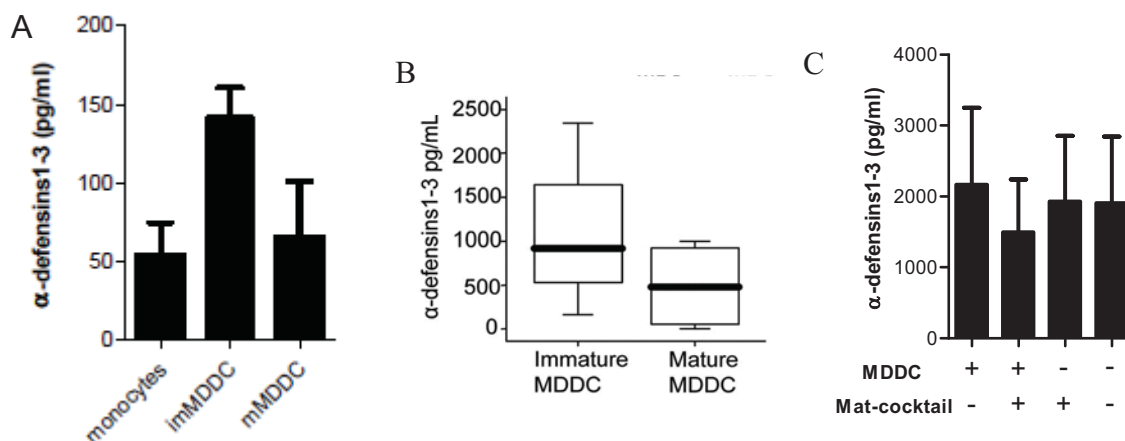


Figura 3. Detección de α -defensinas 1-3 en los sobrenadantes. (A) Cuantificación por ELISA de los niveles de α -defensinas 1-3 en sobrenadantes de monocitos, MDDC inmaduras y maduras de un mismo donante. (B) ELISA de los sobrenadantes de MDDC maduras e inmaduras de 4 donantes diferentes. (C) Detección de α -defensinas 1-3 en los sobrenadantes de las MDDC cultivadas según las condiciones indicadas, sólo hubo descenso de los niveles cuando las MDDC estuvieron en presencia de cóctel de maduración. Las barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos independientes.

1.4 Producción de α -defensinas 1-3 tras estimulación de las MDDC con citocinas proinflamatorias.

También analizamos el efecto de cada una de las citocinas proinflamatorias del cóctel de maduración. Con este propósito, las MDDC fueron cultivadas en paralelo durante 48h con cada una de las citocinas que compone el cóctel de maduración por separado, IL-1 β , IL-6 y TNF- α , y con todas las citocinas juntas (cóctel de maduración típico). Como se muestra en la figura 4A, la expresión relativa de mRNA de α -defensinas1-3 aumentó tras la estimulación de las MDDC con IL-1 β durante 48h. IL-6 y TNF- α aumentaron ligeramente o mantuvieron los niveles de mRNA de α -defensinas1-3 comparado con las imMDDC. En todos los casos, tras la maduración con el cóctel completo, los niveles de mRNA de α -defensinas1-3 fueron indetectables o levemente

detectables (fig.4A). Estos datos fueron consistentes con los resultados observados por ELISA (fig.4B), que mostraron los mayores niveles de α -defensinas 1-3 secretadas en los sobrenadantes de las células estimuladas con IL-1 β y los menores valores tras la estimulación con el cóctel de maduración completo.

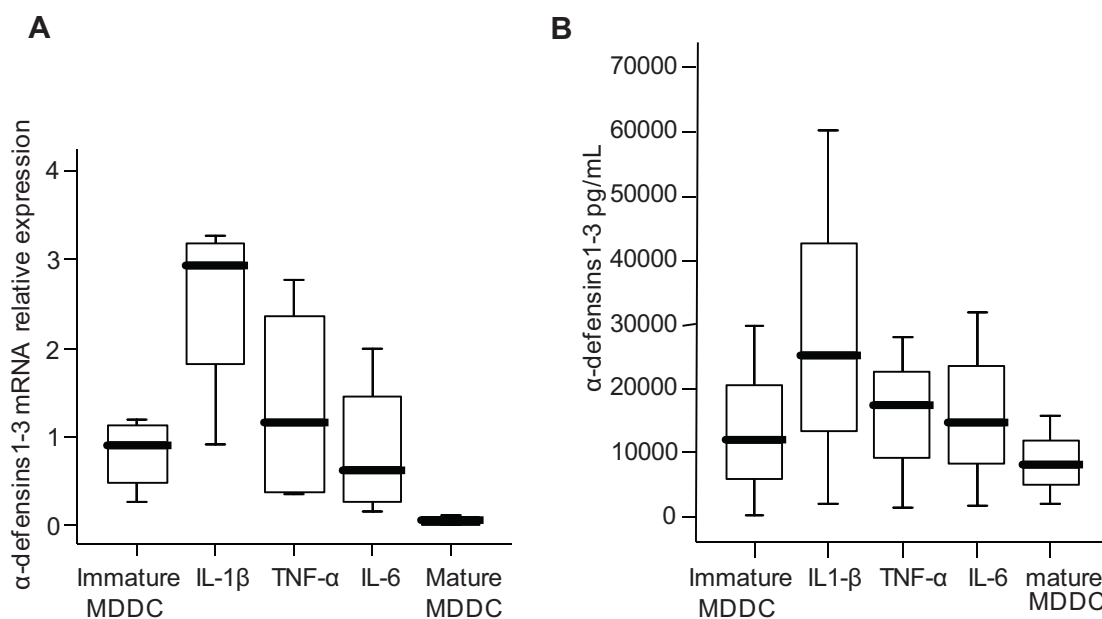


Figura 4. Regulación de la producción de α -defensinas 1-3 en MDDC tras estimulación con citocinas. (A) RT-PCR a tiempo real y (B) ELISA de 4 donantes diferentes. Las células fueron obtenidas de buffy coats y cultivadas durante 48h con las citocinas indicadas. MDDC maduras fueron cultivadas con las tres citocinas simultáneamente.

1.5 La completa maduración de las células dendríticas por distintos agentes madurativos disminuye la producción de α -defensinas 1-3.

Para determinar si la maduración de las MDDC con otros componentes distintos del cóctel de maduración de citocinas produciría el mismo efecto, usamos LPS, un ligando del TLR4, para madurar las MDDC. Los resultados fueron similares a los encontrados con el cóctel de maduración de citocinas. De hecho, tras la maduración

con LPS, los transcritos de α -defensinas 1-3 fueron indetectables (fig.5A) y los niveles de α -defensinas 1-3 en los sobrenadantes de las células maduras con LPS tendían a disminuir comparados con los sobrenadantes de las imMDDC (fig.5B)

Así mismo, como se muestra en la figura 5C, tras estimulación de las MDDC durante 24h con IFN- α , otro agente madurativo, los niveles de α -defensinas 1-3 detectados en los sobrenadantes también disminuyeron.

Ya que el LPS, el IFN- α y el cóctel de citocinas, pese a actuar a través de vías diferentes, indujeron los mismos efectos sobre la producción de defensinas, hipotetizamos que otros sistemas que promuevan la maduración completa de las DC darán como resultado una disminución en la producción de α -defensinas 1-3. Más adelante, en el apartado 2.3 se mostrarán más ensayos realizados para probar esta hipótesis.

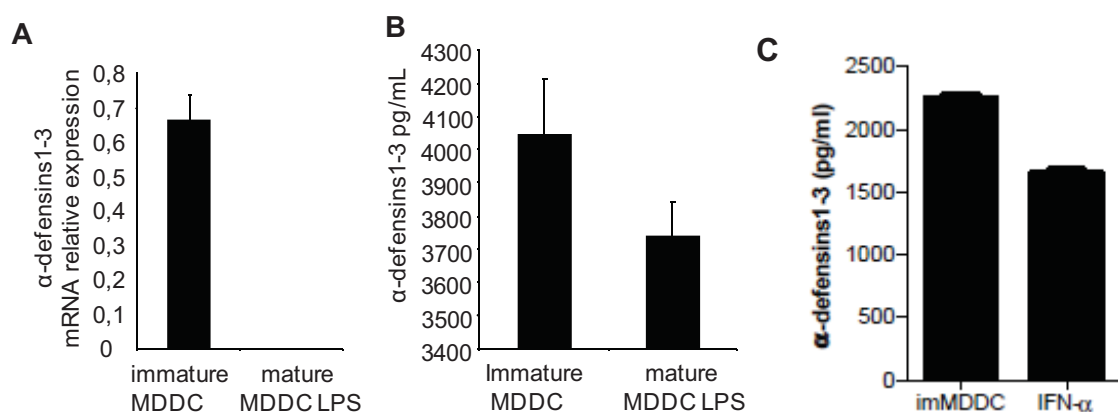


Figura 5. Producción de α -defensinas 1-3 tras maduración de las MDDC con distintos agentes. Detección de la producción de α -defensinas 1-3 por (A) RT-PCR a tiempo real y (B) ELISA tras maduración con LPS. (C) Detección de α -defensinas 1-3 en sobrenadantes tras incubación con IFN- α durante 24h. Las barras representan la media \pm SD.

2. LA INFECCIÓN VIRAL MODULA LA SECRECIÓN DE α -DEFENSINAS 1-3 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS Y EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MIELOIDES (CD1c+) CIRCULANTES. IMPORTANCIA DEL EFECTO ESTROGÉNICO.

2.1 Las DC mieloides (CD1c+) circulantes aisladas de sangre también, al igual que las MDDC, producen α -defensinas 1-3.

Dado que las MDDC se consideran un buen modelo *in vitro* de las DC mieloides, y en vista de los resultados observados con las MDDC, quisimos comprobar si las DC mieloides directamente aisladas de sangre también serían capaces de producir α -defensinas 1-3.

Para este propósito, en primer lugar analizamos comparativamente la secreción de α -defensinas 1-3 por las dos poblaciones de DC del estudio, DC mieloides circulantes directamente aisladas de sangre (myDC) y MDDC. Usando buffy coats de donantes sanos, se aislaron monocitos (CD14+) y se cultivaron durante 5 días en presencia de IL-4 y GM-CSF para inducir su diferenciación a MDDC. La pureza de la población celular se analizó por citometría de flujo y mostró ser 96.8% \pm 1.4 CD14- CD11c+ (fig.6A panel izquierdo). De los mismos donantes también se aislaron células CD1c+. La selección positiva de CD1c se realizó tras depleción de células CD19+. La pureza de esta población resultó ser 97.5% \pm 1.1 CD19-CD11c+ (fig.6A panel derecho).

La figura 6B muestra los niveles de α -defensinas 1-3 detectados mediante ELISA en los sobrenadantes de ambas poblaciones celulares,

provenientes de un mismo donante. Como se observa en la figura, los niveles de α -defensinas 1-3 tras 2 y 8 horas de cultivo son 10 veces mayores en los sobrenadantes de las myDC que en los de las MDDC.

Además, en la figura 6C, se muestra la presencia intracelular de péptidos de α -defensinas 1-3 en las myDC tras marcaje intracelular con anticuerpos monoclonales y análisis por citometría de flujo.

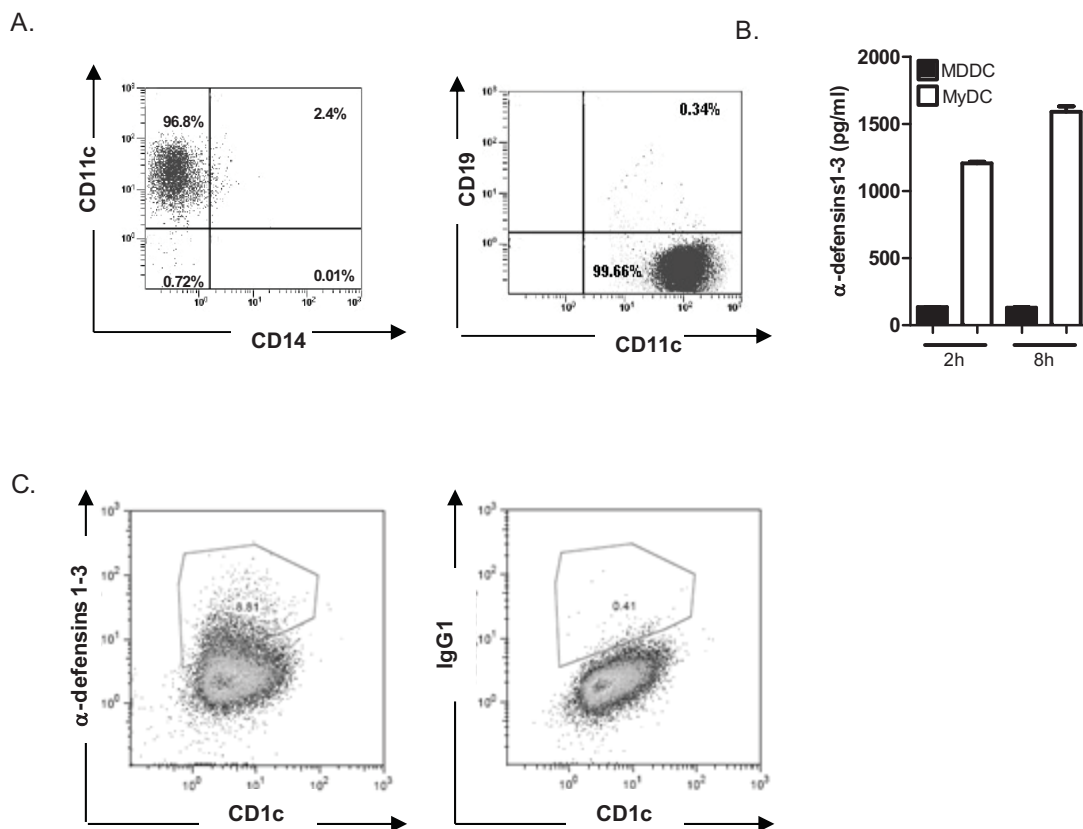


Figura 6. Producción de α -defensinas 1-3 por MDDC y myDC. (A) Pureza de la población de MDDC (panel izquierdo) y myDC (panel derecho) por citometría de flujo. (B) Secreción de α -defensinas 1-3 tras 2 y 8 h de cultivo en MDDC (barras negras) y myDC (barras blancas) de un mismo donante. Las barras representa la media \pm SD. (C) Detección intracelular de α -defensinas 1-3 en myDC tras tratamiento con monensina (panel izquierdo, 8.8% población positiva) y sin monensina (panel derecho, 0.41% de positividad).

2.2 Las DC mieloides (CD1c+) circulantes responden más robustamente a la infección viral que las MDDC.

Para estudiar la respuesta antiviral en las dos poblaciones de DC del estudio, las células fueron infectadas con NDV-B1, un virus que induce una potente respuesta caracterizada por la secreción de IFN de tipo I y otras citocinas inflamatorias y por la up-regulación de moléculas de superficie indicadoras de activación/maduración de DC¹²⁵. Además, en paralelo, también infectamos las células con NDV-NS1 que lleva la proteína antagonista NS1 del virus influenza e inhibe la respuesta antiviral⁵⁹.

Ambas poblaciones de DC (MDDC y myDC) produjeron IFN tipo I tras la infección con NDV-B1 determinado mediante la presencia de mRNA de IFN- α e IFN- β por qRT-PCR. En ambas poblaciones celulares los niveles de IFN aumentaron tras 2h de infección pero las en myDC los niveles de IFN- β e IFN- α fueron 10 y 3 veces mayores respectivamente que los niveles detectados al mismo tiempo post-infección en MDDC. Además, los niveles de estas citocinas en myDC alcanzaron su máximo a las 8h post-infección mientras que las MDDC lo alcanzaron a las 12h. En ambas poblaciones celulares NDV-NS1 suprimió la respuesta antiviral mediada por IFN de tipo I y sirvió como control negativo (datos no mostrados). Estos resultados muestran que las dos poblaciones de DC responden ante la infección viral activamente, produciendo y secretando IFN de tipo I, pero hay diferencias significativas entre la robustez de la respuesta desarrollada por cada una de ellas.

2.3 El desarrollo de una respuesta antiviral por las DC modula la secreción de α -defensinas1-3.

Para comprobar si la infección viral afectaría la secreción de α -defensinas1-3 en ambas poblaciones de DC, las células fueron infectadas con NDV-B1 o NDV-NS1 durante 2, 8 y 18 horas, y los sobrenadantes fueron analizados para la secreción de α -defensinas1-3.

Como se muestra en la figura 7A, hubo un comportamiento opuesto entre las células infectadas con NDV-B1 y las infectadas con NDV-NS1. En un tiempo corto tras la infección (2h), la infección por NDV-B1 indujo un incremento en los niveles de α -defensinas1-3 secretados por las MDDC mientras que la infección por NDV-NS1 redujo ligeramente estos niveles con respecto a las células no infectadas, sugiriendo que el incremento en la secreción de α -defensinas1-3 podría ser parte de la respuesta antiviral que es inhibida por NS1 (fig.7A, 2h pi). Así mismo, a las 8h tras infección, las diferencias desaparecieron y los niveles de α -defensinas1-3 fueron similares en todos los tratamientos celulares (fig7A, 8h pi). Sin embargo, en un tiempo largo tras la infección (18h), los niveles de α -defensinas1-3 detectados en los sobrenadantes de las MDDC infectadas por NDV-B1 fueron significativamente inferiores que los de las MDDC infectadas por NDV-NS1 y los de las células no infectadas (fig7A, 18h pi). Este descenso en α -defensinas1-3 podría ser el reflejo de la maduración inducida por el virus.

Además los resultados presentados en la figura 7B muestran que las DC CD1c+ circulantes directamente aisladas, infectadas por un

corto (2h) o largo (8h) periodo de tiempo con NDV-B1 redujo significativamente la secreción de α -defensinas1-3 comparado con los niveles basales secretados por células no infectadas. Este efecto también se observó tras infección con NDV-NS1, sugiriendo que el efecto puede provenir de la manipulación de la maquinaria de síntesis proteica por parte del virus.

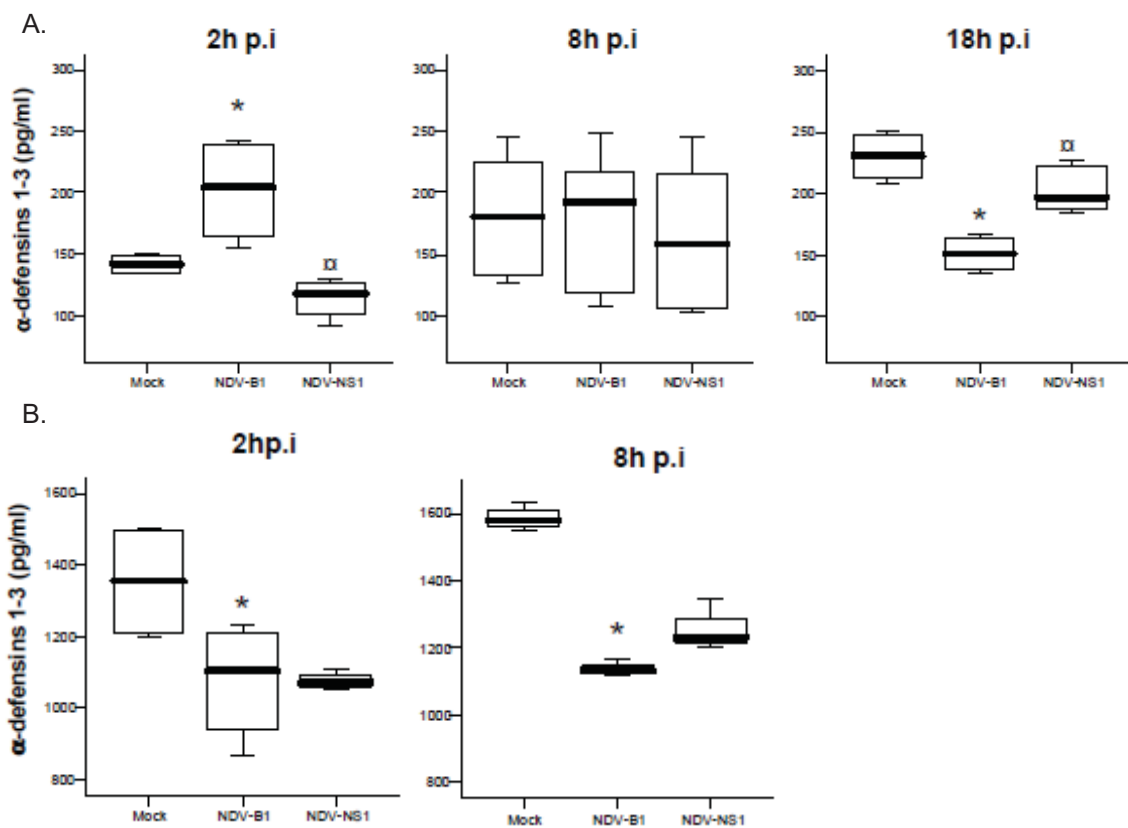


Figura 7. Producción de α -defensinas1-3 tras 2, 8 y 18 h de infección con virus NDV. (A) MDDC fueron infectadas con virus NDV-B1 o NDV-NS1 durante 2, 8 y 18h y los sobrenadantes analizados por ELISA. El mock proviene de MDDC no infectadas y cultivadas en las mismas condiciones y tiempo. Las cajas representan 6 experimentos independientes con distintos donantes. (B) MyDC fueron aisladas e infectadas con NDV-B1 y NDV-NS1 durante 2 y 8 h. Las cajas representan 4 experimentos con diferentes donantes. * $P < 0.05$ respecto a mock; ⊗ $P < 0.05$ respecto a NDB-V1

Así, en las MDDC, bajas productoras de α -defensinas1-3, la infección viral desencadena el aumento en la producción de α -

defensinas1-3, que a su vez puede ser bloqueada por NS1, pero en las myDC, altas productoras de α -defensinas1-3, ambos virus reducen la liberación de α -defensinas1-3.

2.4 El estrógeno, pero no la progesterona, reduce la secreción de α -defensinas1-3 en MDDC y myDC.

Estrógeno (E2) y progesterona (PG) juegan un importante papel en la modulación de la respuesta inmune en la mujer, tanto a lo largo del ciclo menstrual como durante el embarazo.

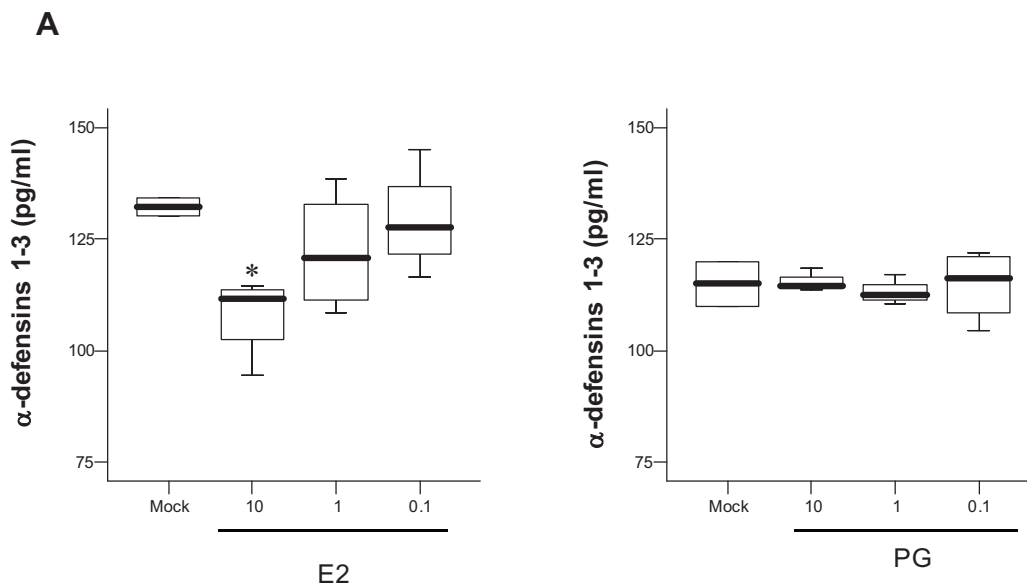
Para analizar el posible efecto de E2 y PG en la secreción de α -defensinas1-3 por las DC, MDDC y myDC fueron incubadas con y sin distintas dosis de E2 y PG (10, 1 y 0.1 $\mu\text{g/ml}$) durante 24h y luego se determinó la presencia de α -defensinas1-3 en los sobrenadantes. En la figura 8A (panel izquierdo) se muestra una disminución dosis dependiente de los niveles de α -defensinas1-3 en las MDDC tratadas con E2 con respecto a las no tratadas, de modo que cuanto mayor fue la dosis de E2, menores fueron los niveles de α -defensinas1-3 detectados. Sin embargo, en las MDDC tratadas con PG (fig8A, panel derecho) no se detectaron diferencias entre las distintas dosis ni con las MDDC control.

Por otro lado, el tratamiento de las myDC (fig8B, panel izquierdo) durante 24h con E2 disminuyó significativamente la liberación de α -defensinas1-3 a los sobrenadantes del cultivo a las dosis de 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$, mientras que la PG no tuvo un efecto claro (panel derecho en figura 8B), con gran variabilidad en los datos. Experimentos de citotoxicidad

con Calceim AM se realizaron para confirmar que los tratamientos hormonales de las células no indujeron citotoxicidad (datos no mostrados).

Para comprobar qué ocurriría con este efecto estrogénico ante una infección viral, las MDDC y myDC fueron infectadas con NDV-B1 tras las 24h de pre-incubación con E2 y los niveles de α -defensinas1-3 se midieron en los sobrenadantes. Como se muestra en la figura 8C y 8D, la disminución en la secreción de las α -defensinas1-3 mediada por el E2 ocurrió incluso cuando las MDDC (fig8C) y myDC (fig8D) fueron infectadas con virus.

Estos resultados ponen de manifiesto una regulación de la secreción de α -defensinas1-3 en MDDC y myDC por E2, pero no por PG, que es funcional incluso ante una posterior infección viral.



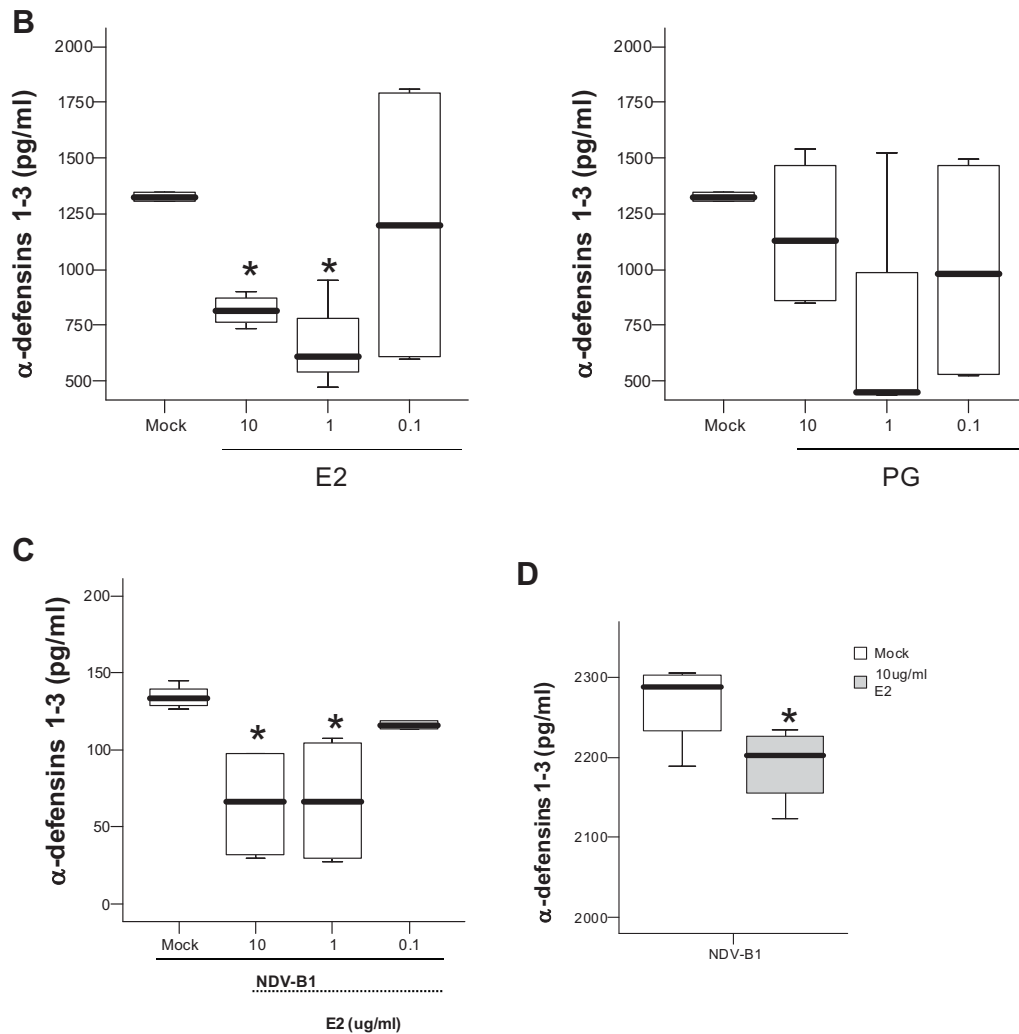


Figura 8. Efecto de las hormonas sobre la secreción de α -defensinas 1-3. Secreción de α -defensinas 1-3 en MDDC (A) y myDC (B) tratadas con E2 y PG durante 24h a las dosis indicadas (n=5). Secreción de α -defensinas 1-3 tras infección con NDV-B1 durante 9h en MDDC (C) y myDC (D) previamente pretratadas con E2 durante 24h a las dosis indicadas (n=3). *P<0.05 frente al mock.

2.5 El cocultivo alogénico de MDDC con células T indujo la secreción de α -defensinas1-3 y fue también susceptible de regulación hormonal.

Las DC interactúan con células T CD4 en su papel como iniciadores de la respuesta inmune adaptativa. Para evaluar el impacto de la interacción entre células T y DC en la producción de α -defensinas1-3, las MDDC fueron cultivadas con células T CD4 naive alogénicas purificadas, a distintos ratios (1:1, 1:3 y 1:5) durante 3 días.

Como se observa en la figura 9, los niveles de α -defensinas1-3 fueron aumentando progresivamente con el paso de los días (fig. 9A), con niveles máximos alcanzados a una ratio de 1 DC por cada 5 células T (fig. 9B). Así pues, este ratio fue elegido para el análisis del efecto del E2 y la PG en la secreción de α -defensinas1-3 en un co-cultivo. En la figura 9C se muestra cómo el E2, a todas las dosis, fue capaz de disminuir los altos niveles de α -defensinas1-3 secretadas por las células en co-cultivo, mientras que la PG sólo fue capaz de producir este efecto significativamente en su dosis más alta.

Estos resultados muestran que los niveles de α -defensinas1-3 se incrementaron de manera notable tras co-cultivo de las MDDC con células T CD4 naive con respecto a los niveles detectados en MDDC cultivadas solas. Además, el efecto inhibidor estrogénico es tan potente, que incluso en co-cultivo, los altos niveles de α -defensinas1-3 secretados pudieron ser disminuidos.

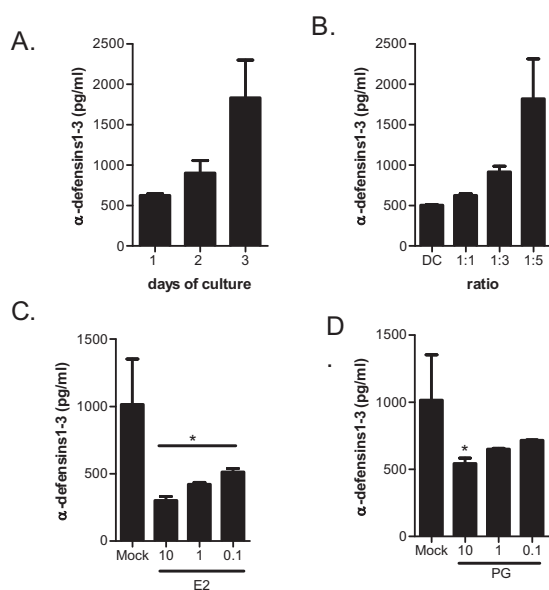


Figura 9. Secreción de α -defensinas 1-3 tras alocultivo de MDDC y células T naive a distintos días (A) y ratios (B). Efecto de las dosis indicadas de estrógeno (C) y progesterona (D) sobre la secreción de α -defensinas 1-3 en un cocultivo alogénico. Barras representan la media \pm SEM de 3 experimentos distintos. * $P < 0.05$ frente a mock.

3. IMPACTO DE LAS α -DEFENSINAS 1-3 SOBRE LA MADURACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS DC DERIVADAS DE MONOCITOS. EFECTOS OPUESTOS DEPENDIENTES DE LA CONCENTRACIÓN.

3.1 Las α -defensinas 1-3 modifican la morfología de las DCs.

Para estudiar el posible efecto que las α -defensinas 1-3 podrían tener sobre las MDDC, monocitos (células CD14+) obtenidos por adherencia a placa fueron cultivados en presencia de IL-4 y GM-CSF durante 5 días, dando como resultado su diferenciación en DC derivadas de monocitos (MDDC). Estas células fueron entonces lavadas y cultivadas durante dos días adicionales con IL-4 y GM-CSF en ausencia o presencia de α -defensinas 1-3 en dosis crecientes desde 0.25 hasta 20 $\mu\text{g/ml}$. Además, para medir el efecto que las α -defensinas 1-3 pudieran tener sobre la maduración inducida por el cóctel de maduración de citocinas (mat-cocktail), las MDDCs también se cultivaron en paralelo durante dos días con las mismas dosis de α -defensinas 1-3 descritas junto con el cóctel de maduración (IL1 β +IL-6+TNF- α) al mismo tiempo.

Como se muestra en la figura 10A, las dosis más altas de α -defensinas 1-3 (20 $\mu\text{g/ml}$) provocaron cambios morfológicos claros consistentes en una redistribución de las MDDC, dando lugar a la aparición de claros agregados celulares. Este efecto era incluso más evidente cuando las MDDC fueron cultivadas en presencia de las defensinas y el cóctel de maduración simultáneamente. Esta formación de agregados también se observó con la dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$, sin

embargo, las dosis bajas (0.25, 0.5 y 1 $\mu\text{g/ml}$) no produjeron ninguna modificación de la morfología (datos no mostrados).

Estos cambios morfológicos provocados por las α -defensinas 1-3 se detectaron también durante el análisis por citometría de flujo de los parámetros de FSC y SSC de las DC. Como se muestra en la figura 10B, la dosis más alta provocó la aparición de un mayor número de células con SSC incrementado, mientras que el FSC no se modificó.

El análisis de anexina-V y 7AAD no mostró una necrosis o apoptosis incrementada en las MDDC tratadas con α -defensinas 1-3 a 20 $\mu\text{g/ml}$, un hecho esperado dados los resultados publicados previamente en múltiples trabajos indicando la no citotoxicidad de las dosis utilizadas^{32,35,212,223}.

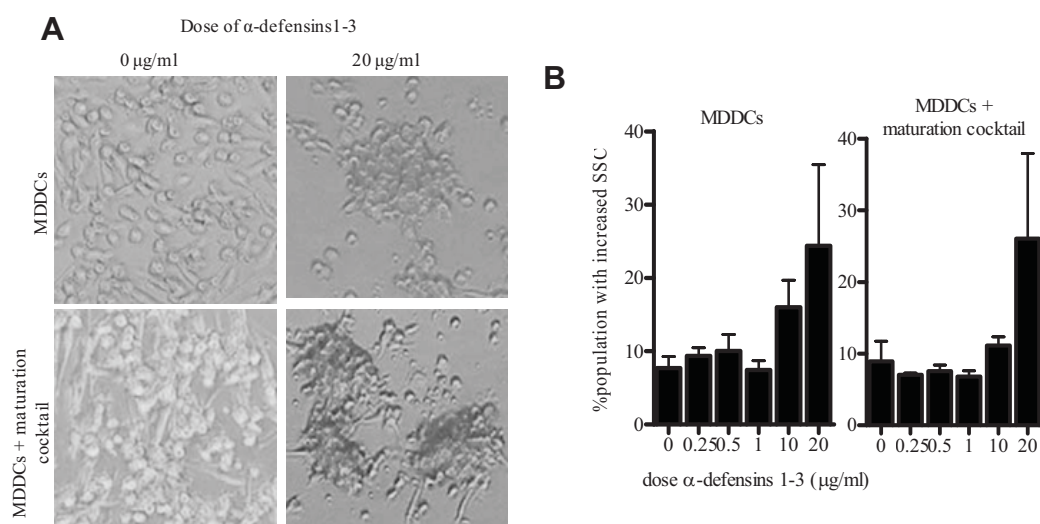


Figura 10. Morfología de las MDDC tras incubación con α -defensinas 1-3. (A) Microscopía óptica de MDDC incubadas con medio solo (0) o 20 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 (amplificación original 10x). Resultado representativo de 7 experimentos distintos. (B) El gráfico representa el porcentaje de población con el parámetro SSC incrementado con respecto a MDDC no tratadas con α -defensinas 1-3. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes.

3.2 El inmunofenotipo de maduración de las DC se vio modificado tras incubación con α -defensinas 1-3.

Teniendo en cuenta las modificaciones morfológicas que las α -defensinas 1-3 produjeron en las MDDC, a continuación continuamos investigando su posible impacto sobre la expresión de moléculas de superficie.

En MDDC inmaduras (5 días de diferenciación) incubadas durante 48h con α -defensinas 1-3 se observó un doble efecto sobre la expresión de moléculas de superficie (fig. 11A, panel superior). Como era esperable, las MDDC inmaduras expresaron altos niveles de CD86 y HLA-DR pero muy bajos niveles de CD83. La incubación con bajas dosis de defensinas (0.25, 0.5 y 1 μ g/ml) aumentó la expresión de CD86 y HLA-DR respecto de las MDDC incubadas únicamente con medio de cultivo. Por el contrario, la incubación con las dosis mayores de α -defensinas 1-3 (10 y 20 μ g/ml) dio lugar a una consistente disminución de la expresión de CD86 y HLA-DR con respecto a las MDDC control (fig.11B). Curiosamente la expresión de CD83 se aumentó con todas las dosis.

Este mismo efecto dual dependiente de dosis, se observó en MDDC incubadas al mismo tiempo con α -defensinas 1-3 y cóctel de maduración (fig. 11A, panel inferior). Como ya ha sido ampliamente descrito con anterioridad, la incubación de las MDDC con cóctel de maduración durante 48h produjo un aumento en la expresión de CD86, HLA-DR y CD83 respecto de las MDDC inmaduras, características de un fenotipo de MDDC maduras¹¹². La incubación con dosis bajas de α -

defensinas 1-3 simultáneamente con el cóctel, produjo un pequeño aumento en la expresión de CD86 y HLA-DR comparado con MDCC tratadas únicamente con el cóctel, mientras que las dosis altas disminuyeron la expresión de CD86 y HLA-DR. El CD83 aumentó con todas las dosis (fig.11B). Las diferencias calculadas con los datos acumulativos de los distintos experimentos con diferentes donantes no alcanzaron significación estadística, posiblemente debido a la gran variabilidad interindividual. Sin embargo, aplicando el test de Kolmogorov-Smirnov al análisis simple de los histogramas, la modulación en la expresión de los distintos marcadores fue estadísticamente significativa ($P < 0.001$).

Previamente ha sido publicado que algunas de las actividades de las defensinas pueden ser inhibidas por la presencia de alta concentración de suero^{32,35}. Por lo tanto, también quisimos investigar los efectos de las α -defensinas 1-3 sobre el inmunofenotipo de las MDCC en presencia de una concentración de suero mayor que 1%. Las MDCC fueron incubadas con y sin 1 o 20 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 en presencia de un 5% de suero humano durante 48h y luego las células fueron analizadas por citometría de flujo. Como se muestra en la figura 11C, la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ incrementó levemente los niveles de expresión de CD83, CD86 y HLA-DR, mientras que la dosis de 20 $\mu\text{g/ml}$ disminuyó la expresión de CD86 y HLA-DR pero incrementó CD83. Estos resultados fueron indistinguibles de los observados en presencia de una concentración de 1% de suero AB.

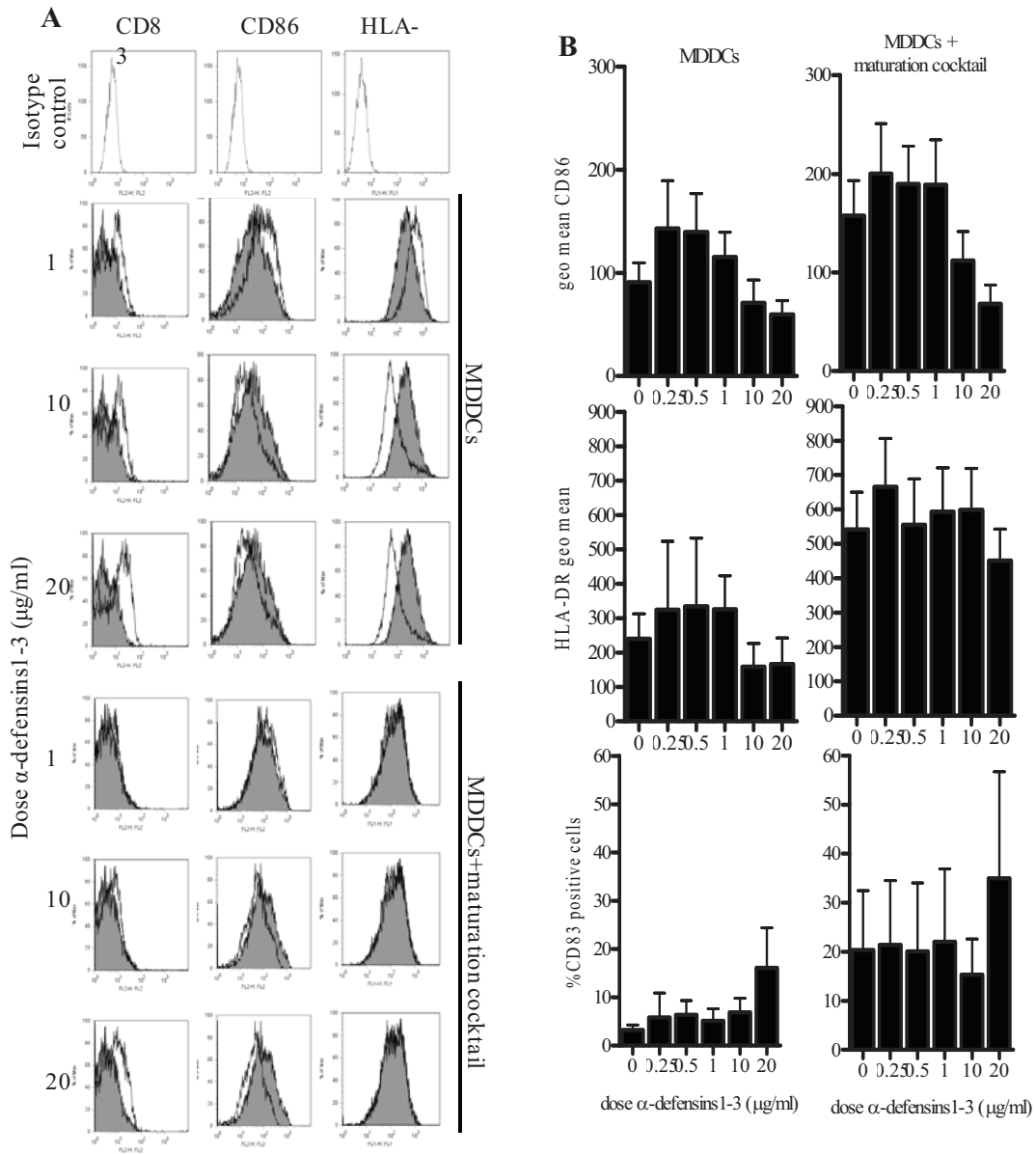


Figura 11. Efecto de las α -defensinas 1-3 sobre las moléculas de superficie. (A) Análisis por citometría de flujo de marcadores de superficie en MDDC incubadas con (histogramas blancos) y sin (control, histogramas grises) α -defensinas 1-3 en medio suplementado con 1% de suero AB humano. Resultado representativo de 5 experimentos independientes. (B) Las barras representan la geo mean o porcentaje de células positivas \pm SEM de los 5 experimentos. (C) Expresión de marcadores de superficie en células incubadas con 5% de suero AB humano. Los histogramas grises y los números en negrita representan las células control.

3.3 El patrón de producción de citocinas por las DC se ve alterado tras tratamiento con α -defensinas 1-3.

El posible impacto de las α -defensinas 1-3 en el patrón de producción de citocinas por las DC también fue analizado. Para estos experimentos, las MDDC fueron generadas usando células CD14+ aisladas con bolitas magnéticas para obtener una mayor pureza y excluir la presencia de posibles linfocitos contaminantes. Tras su diferenciación, las MDDC fueron lavadas y cultivadas durante 48h adicionales en ausencia o presencia de dosis crecientes de α -defensinas 1-3 y, en paralelo, fueron también cultivadas con las defensinas y el cóctel de maduración simultáneamente.

Los sobrenadantes de estos cultivos se analizaron para investigar la presencia de las citocinas proinflamatorias IL1 β , TNF- α , IL-6 y IL-12p40 así como la citocina anti-inflamatoria IL-10.

En MDDC cultivadas únicamente en medio de cultivo, los niveles de TNF- α y IL1- β fueron indetectables o casi indetectables y la incubación con α -defensinas 1-3 no alteró estos niveles (fig.12, barras blancas). En el caso de la IL-12p40, los bajos niveles observados en ausencia de α -defensinas 1-3 fueron incrementados por la dosis de 1 μ g/ml y disminuidos por las dosis mayores (10 y 20 μ g/ml). Aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, presentaron una tendencia consistentemente repetida en los distintos experimentos.

La incubación de las MDDC durante 48h con el cóctel de maduración indujo la secreción de grandes niveles de TNF- α , IL1- β e IL-

IL-12p40 comparado con las MDDC con medio únicamente (fig.12, barras negras). Con respecto a los efectos de las α -defensinas 1-3 en la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-12p40 en células incubadas simultáneamente con el cóctel, encontramos que altas dosis de α -defensinas 1-3 (10 y 20 μ g/ml) disminuyeron los niveles de TNF- α IL-12p40 e IL-1 β ($p < 0.05$), mientras que las bajas dosis (0.25, 0.5 y 1 μ g/ml) no afectaron o aumentaron levemente (1 μ g/ml) los niveles de estas citocinas (fig.12, barras negras). Aunque las citocinas TNF- α y IL-1 β forman parte de los componentes del cóctel de maduración, los niveles de estas citocinas en los sobrenadantes, detectados tras 48h de cultivo, fueron mucho mayores que los añadidos inicialmente para inducir la maduración de las MDDC.

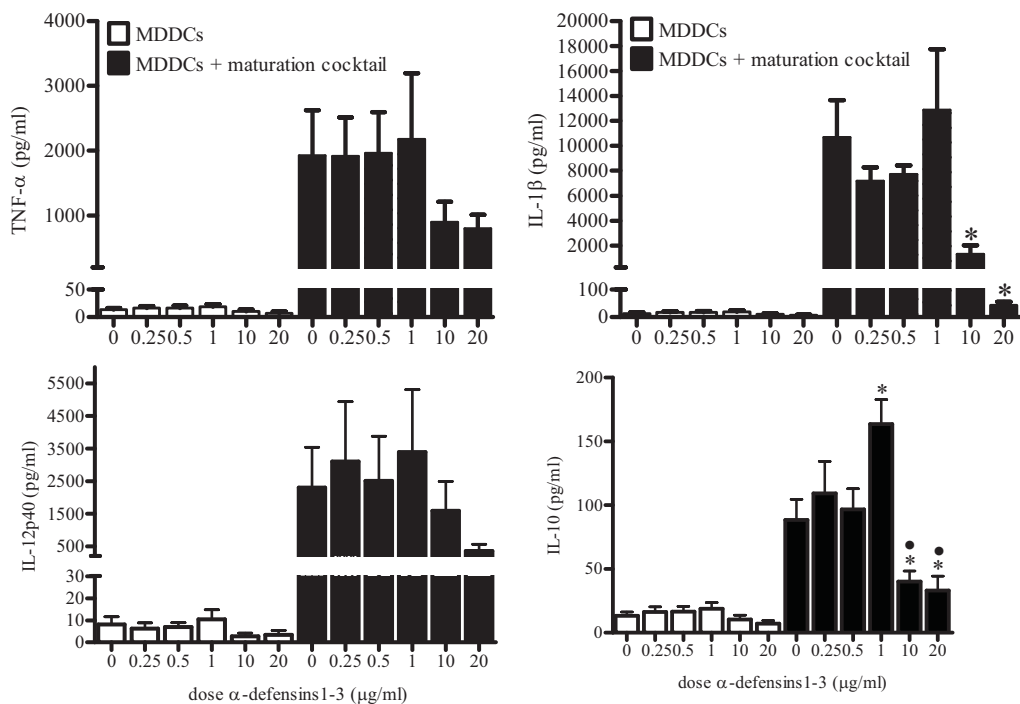


Figura 12. Secreción de citocinas tras estimulación con α -defensinas 1-3. MDDC (barras blancas) o MDDC estimuladas simultáneamente con cóctel de maduración (barras negras) y las dosis indicadas de α -defensinas 1-3. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos distintos. * $P < 0.05$ frente al control. • $P < 0.001$ frente a tratamiento con 1 μ g/ml.

En cuanto a la producción de IL-10, los bajos niveles secretados por las MDDC cultivadas únicamente con medio de cultivo no se vieron afectados por la presencia de α -defensinas 1-3 (fig.12, barras blancas). La incubación de las MDDC con el cóctel de maduración resultó en un incremento de los niveles de IL-10. Como se muestra en la fig.12, la incubación con α -defensinas 1-3 a 1 $\mu\text{g/ml}$ llegó incluso a incrementar aún más estos niveles ($p < 0.05$), mientras que los dosis altas (10 y 20 $\mu\text{g/ml}$) provocaron un gran descenso en los niveles de IL-10 respecto de las células incubadas en ausencia de α -defensinas 1-3 ($p < 0.05$) y respecto de la dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 ($p < 0.001$).

3.4 Las α -defensinas 1-3 inducen la producción de IL-8 por DCs.

En el mismo diseño experimental descrito anteriormente, con MDDC cultivadas con y sin cóctel de maduración y en ausencia o presencia de α -defensinas 1-3, también se investigaron los niveles de IL-8, un importante factor quimiotáctico que atrae neutrófilos al foco inflamatorio.

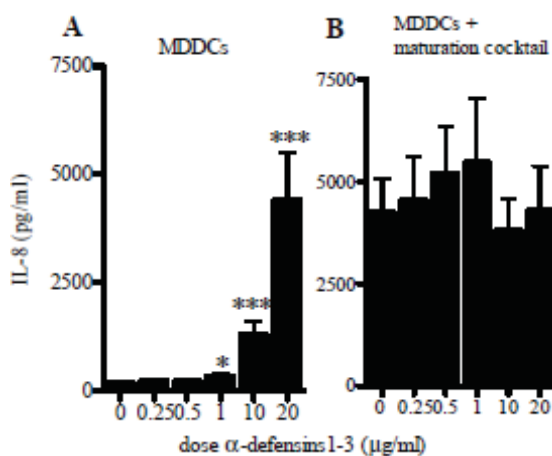


Figura 13. Secreción de IL-8 tras estimulación con α -defensinas 1-3. (A) En MDDC, la secreción de IL-8 aumentó de modo dosis dependiente ($P < 0.05$; Spearman $r = 0.91$). (B) MDDC cultivadas con defensinas y cóctel de maduración. * $P < 0.05$ frente a control. *** $P < 0.001$ frente a control. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos independientes.

Como se muestra en la figura 13A, la exposición de las MDDC a dosis crecientes de α -defensinas 1-3 dio lugar a un marcado incremento en la secreción de IL-8 con las dosis de 1, 10 y 20 $\mu\text{g/ml}$, comparado con las células cultivadas solamente con medio ($p < 0.05$, $p < 0.001$ y $p < 0.001$ respectivamente). El aumento de los niveles de IL-8 se correlacionó positivamente con las dosis de α -defensinas 1-3 ($r = 0.91$, $p < 0.05$). La exposición de las MDDC al cóctel de maduración en ausencia de α -defensinas 1-3 indujo la secreción de altos niveles de IL-8, los cuales no fueron significativamente afectados por la presencia de α -defensinas 1-3 (fig.13B). Cabe destacar que los niveles de IL-8 secretados por las MDDC incubadas con 20 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 en ausencia del cóctel de maduración, fueron de la misma magnitud que los inducidos por el cóctel (fig.13)

3.5 La capacidad aloestimuladora de las MDDCs se ve modificada tras incubación con α -defensinas 1-3.

Para determinar si los efectos descritos de las α -defensinas 1-3 sobre la maduración de las MDDC conllevarían también consecuencias funcionales, evaluamos la capacidad aloestimuladora de las MDDC tras el tratamiento con distintas dosis de α -defensinas 1-3 en un cultivo leucocitario mixto. En concreto probamos las dosis de 1 y 20 $\mu\text{g/ml}$, ya que mostraron ser las más efectivas para modular la expresión de moléculas de superficie y la producción de citocinas en las MDDC.

Así, al igual que en los experimentos anteriores, MDDC tratadas sin y con α -defensinas 1-3 a las dosis de 1 y 20 $\mu\text{g/ml}$ fueron puestas en cocultivo, durante 6 días, con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas depletadas de monocitos. Estas células respondedoras fueron marcadas con CFSE y las células T aloactivadas fueron identificadas por citometría de flujo como aquellas células $\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$ que mostraban una reducción en la intensidad de la señal de fluorescencia del CFSE ($\text{CFSE}^{\text{low}}\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$). Los resultados se muestran en la fig 14. El pretratamiento de las MDDC con 1 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 incrementó levemente el porcentaje de células T $\text{CD3}^+/\text{CD4}^+$ aloactivadas comparado con las MDDC no pretratadas. Por el contrario, la preincubación de las MDDC con 20 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 disminuyó el porcentaje de células T aloactivadas, un efecto negativo en concordancia con los datos obtenidos anteriormente. Las diferencias en la capacidad aloestimuladora entre las MDDC pretratadas con 1 y 20 $\mu\text{g/ml}$ fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

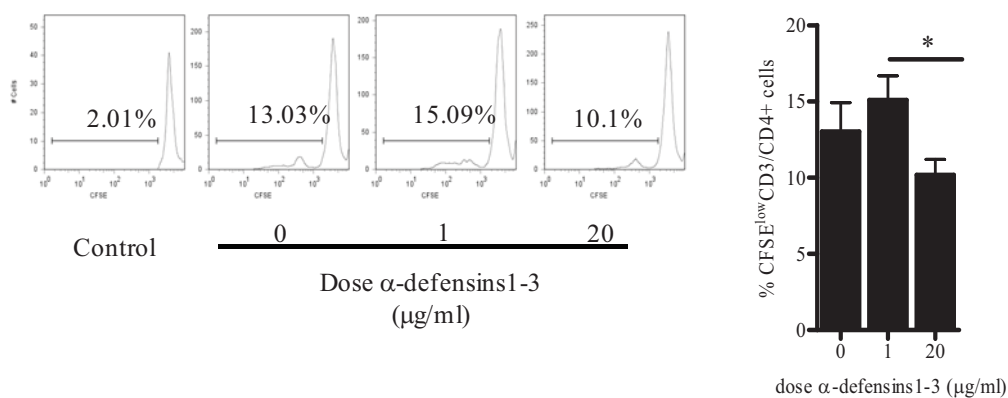


Figura 14. Efecto de las α -defensinas 1-3 sobre la capacidad aloestimuladora de las MDDC. Cocultivo alogénico de MDDC y PBMC depletadas de monocitos marcados con CFSE, en ausencia o presencia de las dosis indicadas de α -defensinas 1-3. Las células aloactivadas se midieron como el porcentaje de células CD3/CD4 con una reducción en la intensidad de la señal de CFSE. Las células control fueron PBMC sin monocitos marcadas con CFSE y sin estimular. (A) Histograma representativo de 3 experimentos con donantes distintos, (B) Las barras representan la media \pm SEM de los 3 experimentos independientes. * $P < 0.05$.

3.6 Las α -defensinas 1-3 interfieren el proceso de diferenciación de las MDDCs.

En vista del impacto que las α -defensinas 1-3 tuvieron sobre el fenotipo, la producción de citocinas y la capacidad aloestimuladora de las MDDC, quisimos analizar si las α -defensinas 1-3 podrían también interferir con el proceso de diferenciación de monocito a MDDC inmadura. Con este propósito, células CD14⁺ seleccionadas inmunomagnéticamente fueron puestas en cultivo durante 5 días en presencia de IL-4 y GM-CSF en placas de 6 pocillos. Desde el día 0 hasta el día 4, α -defensinas 1-3 se añadieron a cada pocillo y a día 5 se analizó el inmunofenotipo de las moléculas de superficie y los niveles de citocinas en los sobrenadantes de los cultivos. Los resultados se compararon con células cultivadas sin α -defensinas 1-3. Se probó una dosis alta (20 μ g/ml) y una dosis baja (0.5 μ g/ml).

Tras 5 días de cultivo sin defensinas, las MDDC control mostraban el inmunofenotipo típico de DC inmadura, es decir, CD14 negativo y alta expresión de CD11c, CD86 y HLA-DR. Este fenotipo permaneció inalterado cuando las MDDC fueron cultivadas con 0.5 μ g/ml de α -defensinas 1-3 (datos no mostrados). Por el contrario, la presencia de 20

$\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 produjo cambios en la expresión de moléculas de superficie. De hecho, en presencia de α -defensinas 1-3 durante 4 o 5 días de cultivo (es decir, añadidas a día 0 o 1 de cultivo) una considerable proporción de MDDC se mantenía positiva para CD14, mientras que la presencia de α -defensinas 1-3 durante los últimos dos días de cultivo apenas modificó la expresión de CD14 (fig 15A). Además, la presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 durante 4 o 5 días (añadidas a día 0 o 1 de cultivo) apenas alteró la expresión de CD11c, mientras que su presencia durante los últimos 2 o 3 días dio lugar a la aparición de una subpoblación de células CD11c negativas (fig.15A). Por último, las α -defensinas 1-3 disminuyeron la expresión de CD86 principalmente cuando fueron añadidas durante los últimos 2 o 3 días, mientras que no se encontraron alteraciones importantes en la expresión de HLA-DR.

Además del inmunofenotipo, también se analizaron los sobrenadantes de las células tras 5 días en cultivo para determinar posibles modificaciones en los niveles de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , TNF- α e IL-12p40, aunque no se encontró ninguna variación entre los diferentes días, ni con 0.5 ni con 20 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 (datos no mostrados). Los niveles de IL-6 también se evaluaron y se observó una tendencia no estadísticamente significativa a aumentar cuando las α -defensinas 1-3 (20 $\mu\text{g/ml}$) se añadieron durante los dos últimos días de cultivo (fig.15B).

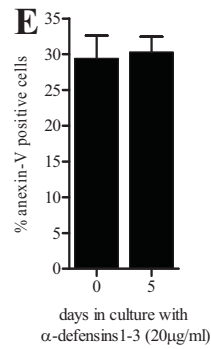
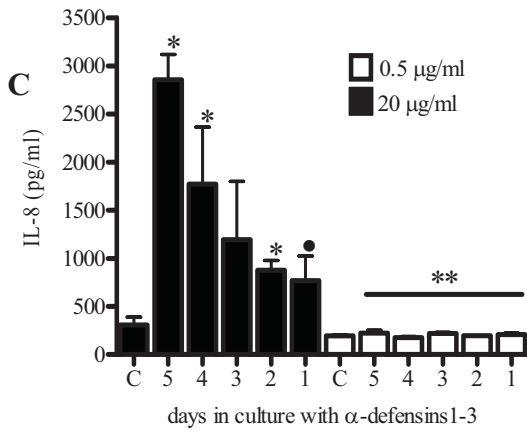
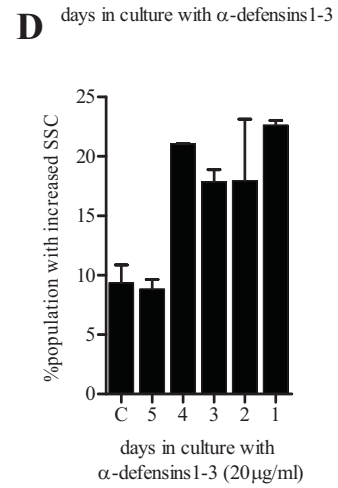
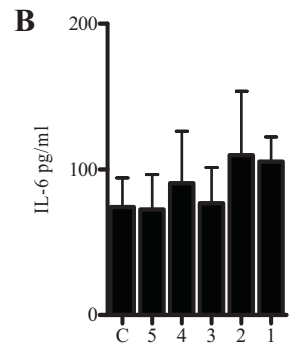
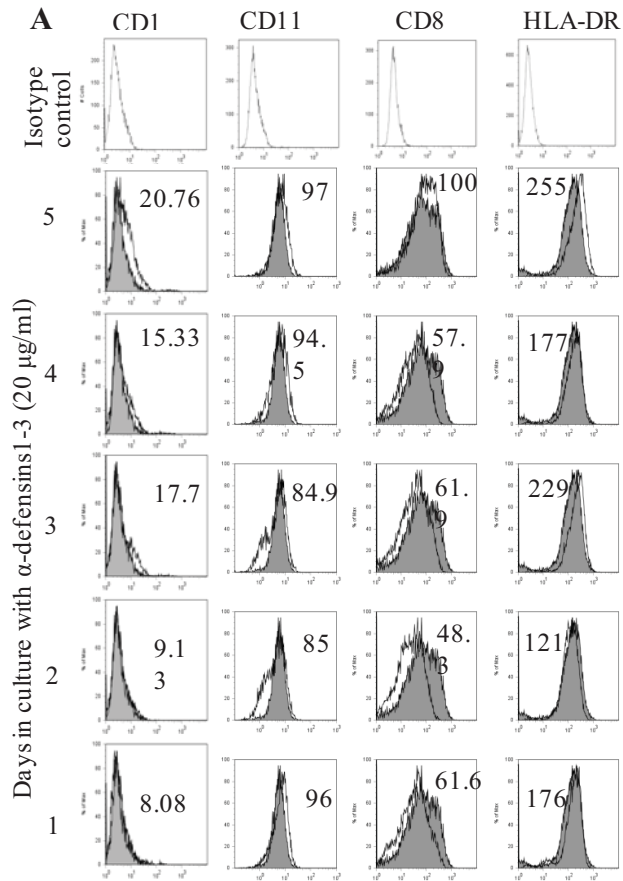
La secreción de IL-8 sin embargo, se vio claramente modificada por las α -defensinas (fig. 15C). La presencia de 20 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 en el medio indujo un aumento de IL-8 dependiente del tiempo. Cuando esta dosis de α -defensinas 1-3 fue añadida al medio desde el día 0 (5 días presente en el cultivo), se produjo un incremento de 10 veces en los niveles de IL-8 detectados, con respecto a los niveles detectados en los sobrenadantes de las MDDC control ($p < 0.05$). Estos niveles disminuyeron cuando las defensinas se fueron añadiendo en los días siguientes, pero aún así los niveles de IL-8 se mantuvieron significativamente aumentados en comparación con las MDDC control. Este aumento de IL-8 fue así mismo dependiente de dosis, ya que la adición de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ no tuvo ningún efecto y la diferencia en la producción de IL-8 entre las células estimuladas con 20 $\mu\text{g/ml}$ y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de α -defensinas 1-3 fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$) (fig.15C).

Los niveles de IL-10 y de la forma activa de TGF- β 1 fueron indetectables en los sobrenadantes de los cultivos de las MDDC generadas en presencia o ausencia de α -defensinas 1-3. Por lo tanto, los cambios detectados en el inmunofenotipo de las MDDC generadas en presencia de α -defensinas 1-3 (fig.15A) no pueden atribuirse a estas citocinas reguladoras.

Además, también se detectaron cambios morfológicos en las MDDC generadas en presencia de α -defensinas 1-3. El análisis por

citometría de flujo de los parámetros FSC y SSC mostró un número incrementado de células que poseían un SSC aumentado cuando éstas habían sido cultivadas en presencia de α -defensinas 1-3 (20 $\mu\text{g/ml}$) durante los últimos 1 a 4 días (fig.15D). Sin embargo, cuando las α -defensinas 1-3 estuvieron presentes durante los 5 días de cultivo este parámetro no se vio modificado. Por otro lado, no se encontró ninguna modificación del FSC entre los distintos días o distintas dosis. Como control de la viabilidad celular, el análisis de anexina-V no mostró ninguna diferencia entre las células cultivadas en presencia o ausencia de α -defensinas 1-3 (20 $\mu\text{g/ml}$) durante 5 días (fig.15E).

Figura 15. Efecto de las α -defensinas 1-3 sobre la diferenciación de las MDDC. (A) Marcadores de superficie. Histogramas grises y números en negrita representan el control negativo. Los histogramas blancos representan las células tratadas con α -defensinas 1-3 durante los días indicados. Los números indican la geo mean para CD86 y HLA-DR y porcentaje de células positivas para CD14 y CD11c. (B) Niveles de IL-6 detectados en los sobrenadantes. (C) Niveles de IL-8 detectados tras estimulación con 20 $\mu\text{g/ml}$ (negro) o 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (blanco). * $P < 0.05$ frente a control negativo. • $P < 0.05$ frente a 5 días de estimulación. ** $P < 0.01$ dosis de 20 frente a 0.5 $\mu\text{g/ml}$. Las barras representan la media \pm SEM. (D) Alteraciones en el SSC. (E) Mortalidad celular tras estimulación cultivo con α -defensinas 1-3 durante 5 días o ninguno.



4. ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE α -DEFENSINAS 1-3 POR LAS MDDC DE PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH Y SU INFLUENCIA SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.

4.1 Determinación de los niveles fisiológicos de α -defensinas 1-3 producidos por las MDDC de individuos sanos no infectados por el VIH.

En primer lugar se analizaron los niveles de α -defensinas 1-3 secretados por las DC derivadas de monocitos, a partir de sangre periférica de 15 individuos voluntarios sanos, no infectados por VIH. De los 15 individuos, 8 eran hombres y 7 mujeres, con una media de edad de 30.13 ± 9.17 .

Para la obtención de las MDDC inmaduras, las células adherentes (CD14+) fueron cultivadas durante 5 días en presencia de IL-4 y GM-CSF. Para la obtención de MDDC maduras, tras estos 5 días de cultivo se añadió un cóctel de maduración compuesto de IL1 β , TNF- α e IL-6. Tras 5 y 7 días de cultivo para las MDDC inmaduras y maduras respectivamente, se recogieron los sobrenadantes para análisis por ELISA de las α -defensinas 1-3 secretadas, y las células, para el análisis del fenotipo de las DC y para análisis de la expresión relativa de mRNA de α -defensinas 1-3 por RT-PCR a tiempo real.

Los resultados del análisis de los sobrenadantes se muestran en la figura 16B (cajas blancas). Los niveles de α -defensinas 1-3 detectados en los sobrenadantes de las MDDC inmaduras tenían una mediana de

248.2 pg/ml, con una variabilidad interindividual que comprendía un rango desde 52.93 a 1019.2 pg/ml. La mediana de los niveles alcanzados en MDDC maduras fue de 187.7 pg/ml, con un rango interindividual desde 0 a 686.3 pg/ml. La diferencia entre los valores encontrados en los sobrenadantes de MDDC inmaduras y maduras fue estadísticamente significativa ($p < 0.04$).

El análisis del mRNA por RT-PCR confirmó los datos obtenidos en sobrenadantes, con una mayor expresión en MDDC inmaduras que maduras ($p < 0.02$), siendo en la mayoría de los casos el indetectable en MDDC maduras (fig.16A, barras blancas).

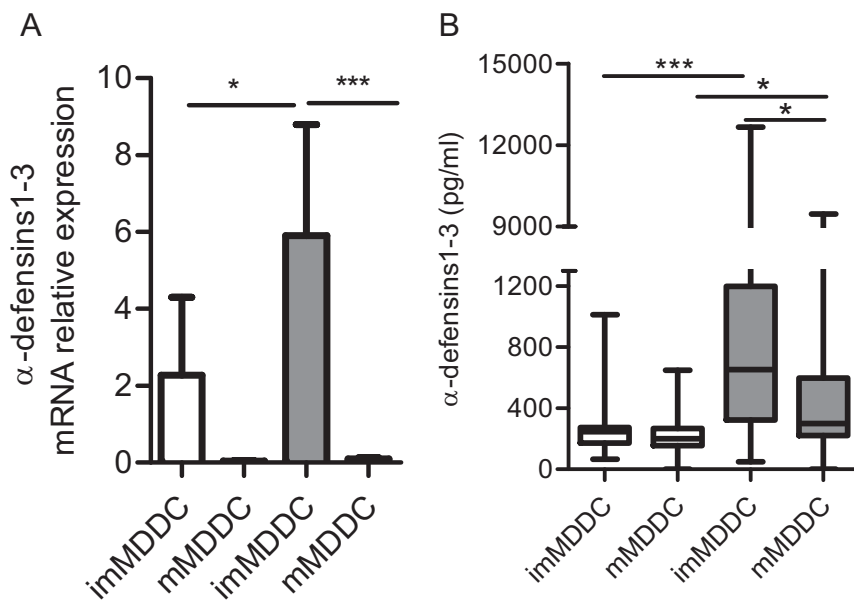


Figura 16. Producción de α -defensinas 1-3 por MDDC inmaduras y maduras. (A) Expresión relativa de mRNA por RT-PCR a tiempo real en individuos sanos ($n=15$; barras blancas) y VIH-positivos ($n=39$; barras grises). Las barras representan la media \pm SEM. (B) Niveles de α -defensinas 1-3 detectados en los sobrenadantes de los cultivos de individuos sanos ($n=15$; cajas blancas) y VIH-positivos ($n=39$ cajas grises). Las cajas representan los rangos intercuartílicos, las líneas horizontales dentro de las cajas indican la media y los extremos indican los valores máximo y mínimo.

4.2- Determinación de los niveles de α -defensinas 1-3 producidos por las MDDC de individuos infectados por el VIH.

Para el análisis de la producción de α -defensinas 1-3 en pacientes, se reclutaron 39 individuos infectados por VIH-1 (VIH), 32 hombres y 7 mujeres, con una media de edad de 39.53 ± 10.27 , cuyas características inmunológicas y virológicas se muestran en la tabla 4.

Characteristic	ELITE (n=4)	VC (n=15)	VNC (n=11)	HAART (n=9)
Sex (male/female)	3/1	9/6	11/0	9/0
CD4 T cell counts (cell/micr)	803 ± 275.6	741 ± 114	595 ± 170	780 ± 225
HIV load (log copies/ml)	1.69 ± 0	3.11 ± 0.41	4.23 ± 0.36	2.41 ± 1.11

Tabla 4. Características de los pacientes del estudio.

A partir de la sangre periférica de estos individuos se obtuvieron las MDDC inmaduras y maduras, de la misma manera y con el mismo protocolo exacto que el empleado en los controles sanos no infectados por VIH.

Como se muestra en la figura 16A (cajas grises), los niveles de α -defensinas 1-3 detectados en los sobrenadantes de las MDDC inmaduras tenían una mediana de 650 pg/ml, con una variabilidad interindividual que comprendía un rango desde 50 a 14977 pg/ml. La mediana de los niveles alcanzados en MDDC maduras fue de 270 pg/ml, con un rango interindividual desde 0 a 9971. La diferencia entre los niveles de α -defensinas 1-3 encontrados en los sobrenadantes de

MDDC inmaduras y maduras fue estadísticamente significativa ($p < 0.005$).

El análisis del mRNA por RT-PCR mostró una mayor expresión en MDDC inmaduras que en maduras ($p < 0.0001$), en las que, en la mayoría de los casos, los niveles fueron indetectables, al igual que ocurría en los controles sanos.

4.3 Comparación entre los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por individuos no infectados e individuos infectados por VIH.

En la figura 16A y 16B se muestra la comparación en la producción de α -defensinas 1-3 entre DC inmaduras y maduras, de individuos control no infectados por VIH (cajas blancas) e individuos infectados por VIH (cajas grises).

El análisis estadístico de los niveles de α -defensinas 1-3 detectados en los sobrenadantes y la expresión de RNA de ambos grupos, mostró una diferencia estadísticamente significativa, tanto entre los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por MDDC inmaduras ($p < 0.0001$), como entre los niveles producidos por MDDC maduras ($p < 0.0008$).

Hay que destacar que la supervivencia de las MDDC fue similar en ambos grupos.

4.4 Comparación entre los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por DC de individuos infectados por VIH.

Una vez observado que los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por las DC de individuos infectados por VIH eran mucho más elevados que los producidos por individuos no infectados, quisimos comprobar si

existían también diferencias dentro de los distintos tipos de pacientes VIH positivos. Para estos y los posteriores análisis de correlación sólo se tuvieron en cuenta las α -defensinas 1-3 producidas por MDDC inmaduras, dados los resultados de mRNA de las MDDC maduras.

Para el estudio se utilizaron cuatro grupos de pacientes, como se describió detalladamente en material y métodos, aquellos que son capaces de controlar espontáneamente el VIH, *controladores de élite* y *controladores*, y aquéllos que no son capaces de controlar al virus, *no controladores de la viremia* y *pacientes con tratamiento antirretroviral*.

La comparación entre los distintos grupos mostró niveles mayores de α -defensinas 1-3 en aquellos pacientes que controlan espontáneamente la infección que en aquellos que no la controlan (no controladores y pacientes con tratamiento) (fig. 17 A). Así mismo, dentro del grupo de controladores, las MDDC de los controladores de élite fueron las que produjeron mayores niveles de α -defensinas 1-3, mientras que los pacientes con tratamiento antirretroviral mostraron los niveles más bajos de producción dentro de los distintos grupos de individuos infectados por VIH. Cabe destacar que los niveles de α -defensinas 1-3 detectados en cualquiera de los grupos de individuos infectados por VIH fueron mayores que los encontrados en individuos control no infectados por VIH (fig.17B y 17C).

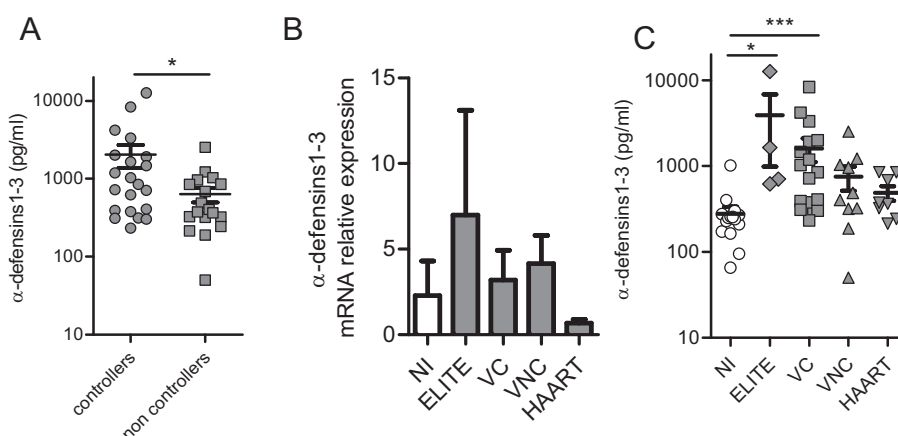


Figura 17. Producción de α -defensinas 1-3 en imMDDC de individuos infectados por VIH. (A) Comparación entre las α -defensinas 1-3 secretadas por imMDDC de controladores (elite y controladores de la viremia; n=19) y no controladores (pacientes con alta viremia y con HAART; n=20). (B) Expresión relativa de mRNA de α -defensinas 1-3 en no infectados (NI; n=15), controladores de elite (elite; n=4), controladores de la viremia (VC; n=15), no controladores de la viremia (VNC; n=11) y pacientes en tratamiento (HAART; n=9). Las barras representan la media \pm SEM. (C) Los puntos indican cada paciente de los grupos descritos. Las líneas representan la media \pm SEM.

Estos datos en conjunto indican una producción de α -defensinas 1-3 incrementada en MDDC de individuos infectados por VIH. Este aumento persiste incluso en presencia de bajos niveles de viremia y se mantiene algo elevada a pesar del control farmacológico de la carga viral.

4.5 Los niveles de α -defensinas 1-3 producidas por las MDDC inmaduras se correlacionan con los niveles de células T CD4+.

A raíz de los resultados obtenidos en individuos infectados por VIH, quisimos analizar una posible correlación con dos parámetros marcadores de la progresión de la enfermedad: niveles de células T CD4 y carga viral plasmática (PVL, *plasmatic viral load*). Para estas comparaciones se tuvieron en cuenta los niveles de células T CD4 y PVL

que cada paciente tenía en el momento de realizarse la extracción sanguínea para obtener las DC.

Los niveles de α -defensinas 1-3 secretados por las DC inmaduras de la cohorte completa de pacientes infectados por VIH no se correlacionaron con los niveles de células T CD4+ que cada individuo tenía en ese momento (fig.18 A). Sin embargo, sí que existía correlación cuando los individuos con tratamiento antirretroviral fueron eliminados del análisis (fig. 18B; r de Spearman=0.47; $p<0.009$). La cohorte fue entonces dividida entre controladores y no controladores, y esta correlación sólo se mantuvo y mejoró en el grupo de los controladores (fig.18C; r de Spearman=0.59; $p<0.009$), pero no se encontró en individuos no controladores (fig.18D). Este dato apoyaría fuertemente la hipótesis de un mejor estado inmunológico ante mayores niveles de defensinas producidas por las DC.

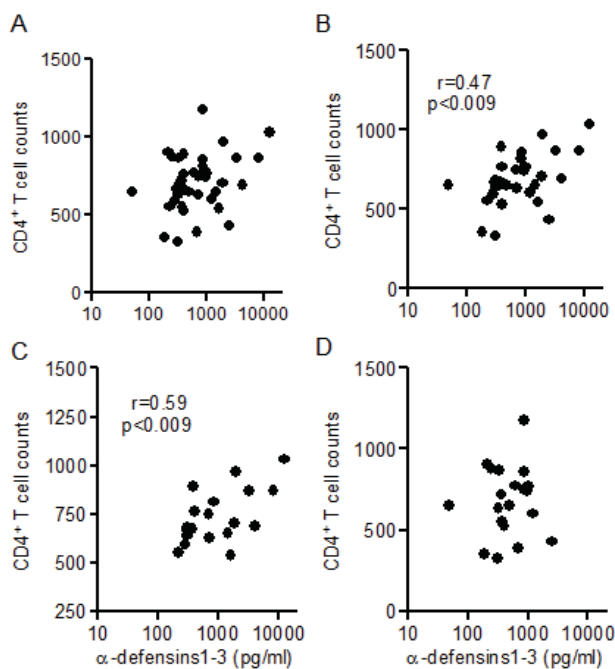


Figura 18. Correlación positiva entre las α -defensinas 1-3 secretadas por imMDDC y los niveles de células T CD4. (A) Pacientes HIV-positivos ($n=39$), (B) pacientes sin tratamiento ($n=30$), (C) controladores (elite y controladores de viremia, $n=19$), (D) no controladores (virémicos y HAART, $n=20$). Se empleó el test de correlación de Spearman.

Sin embargo, no se encontró ninguna correlación con la carga viral plasmática, ni en el grupo completo (fig.19 A), ni en individuos sin tratamiento (fig.19B), ni en individuos controladores (fig.19C) ni en no controladores (fig.19D).

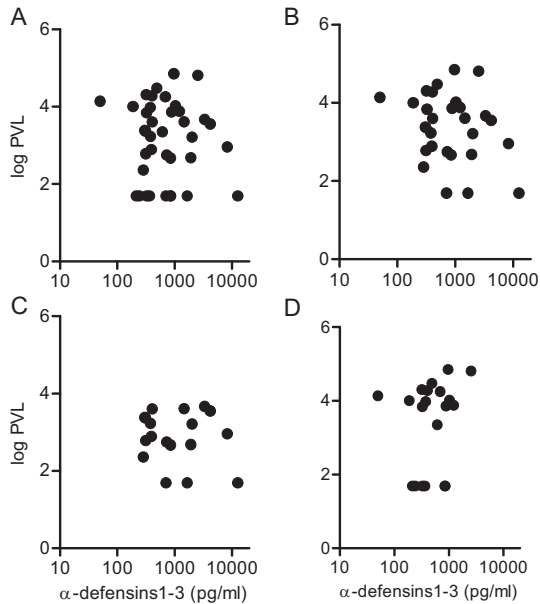


Figura 19. Ausencia de correlación entre las α -defensinas 1-3 secretadas por imMDDC y la carga viral plasmática (PVL). (A) Pacientes HIV-positivos (n=39), (B) pacientes sin tratamiento (n=30), (C) controladores (elite y controladores de viremia, n=19), (D) no controladores (virémicos y HAART, n=20). Se empleó el test de correlación de Spearman

4.6 Análisis de los niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3 en los individuos infectados por VIH.

Ya que no pudimos encontrar una correlación entre los niveles de α -defensinas 1-3 secretadas por las DC y las PVL, analizamos entonces los niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3 para ver si existían diferencias, ya que estos provienen de los neutrófilos fundamentalmente⁶⁷, no de las DC. Los plasmas de 35 individuos infectados por VIH fueron analizados, realizándose dos mediciones separadas en el tiempo en cada individuo, en distintos momentos de la enfermedad.

Los niveles detectados estuvieron ligeramente elevados con respecto a los niveles normales descritos con anterioridad¹⁵⁹, hecho comparable a lo observado con las MDDC de individuos infectados por VIH, que producían mayores niveles de α -defensinas 1-3. Los niveles detectados en hombres (n=21) y mujeres (n=19) no mostraron diferencias significativas.

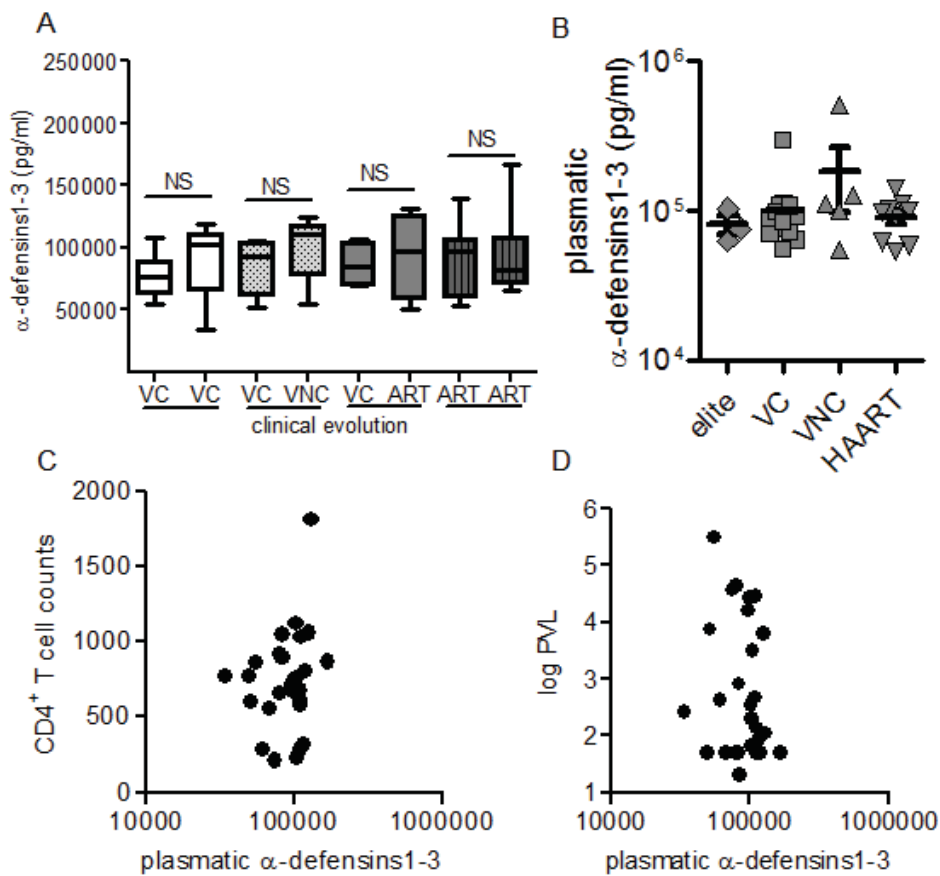


Figura 20. Análisis de los niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3. (A) Niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3 en dos determinaciones diferentes a lo largo del tiempo en pacientes que mantuvieron el control de la viremia (VC-VC; cajas blancas; n=13), pacientes controladores en la primera determinación pero virémicos en la segunda (VC-VNC; cajas grises punteadas; n=5), pacientes controladores en la primera determinación pero con HAART en la segunda (VC-HAART; cajas grises; n=8) y pacientes que recibían HAART en ambas determinaciones (ART-ART; cajas grises ralladas; n=9). Las cajas representan los rangos intercuartílicos, la línea horizontal en el interior la media y los extremos los valores máximo y mínimo. Se aplicó el test de Mann-Whitney a cada pareja y las diferencias fueron no significativas (NS). (B) Niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3 detectados en los distintos grupos de pacientes VIH. Los puntos indican cada paciente y las líneas la media \pm SEM. (C) No se encontró correlación con los niveles de células T CD4 ni con la carga viral plasmática (D).

La figura 20 muestra los resultados obtenidos. En la figura 20A se muestran las dos determinaciones que se realizaron en cada grupo de pacientes: aquellos que controlaban la infección en ambas determinaciones (cajas blancas), aquellos que eran controladores en la primera determinación, pero tenían alta viremia en la segunda (cajas grises punteadas), los que controlaban en la primera pero tenían HAART en la segunda (cajas grises) y finalmente los que tenían tratamiento en ambas determinaciones (cajas grises ralladas). No se encontraron diferencias en los niveles de α -defensinas 1-3 entre las dos determinaciones en ninguno de los grupos (fig.20 A). Igualmente, no se encontraron diferencias entre los distintos tipos de pacientes (fig.20 B), aunque los individuos con alta viremia mostraron una mayor variabilidad interindividual. Es importante destacar que el perfil encontrado en los niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3 (fig.20B) es completamente diferente al encontrado en los niveles secretados por DC (fig.17C). Así mismo, no se encontró ninguna correlación ni con los niveles de células T CD4+ ni con la carga viral plasmática (fig.20 D y E).

Por tanto, las diferencias de producción de α -defensinas 1-3 encontradas en DC son independientes de los niveles plasmáticos de α -defensinas 1-3.

4.7 Niveles mayores de producción de α -defensinas 1-3 por las DC se asociaron a un menor riesgo de progresión de la infección por VIH.

Para analizar si las α -defensinas 1-3 secretados por las DC de pacientes infectados por VIH podrían estar asociados a la progresión de

la enfermedad, la cohorte de individuos infectados fue dividida en dos grupos, según si los niveles de defensinas secretados por las DC se encontraban por encima o por debajo de la mediana de producción del grupo completo (650 pg/ml). Se eligió el valor de la mediana, en lugar de la media, por ser el primero menos influenciado por los valores extremos. Como indicadores de la progresión de la enfermedad se consideraron el descenso de células T CD4, el aumento de la PVL y la necesidad de iniciar tratamiento antirretroviral. Para todos estos análisis se eliminaron del estudio aquellos pacientes que estaban recibiendo tratamiento antirretroviral en el momento de la extracción para obtener DC.

El análisis de un descenso en los niveles de células T CD4 a lo largo del tiempo de seguimiento, mostró que sólo en el 20% de individuos con niveles de α -defensinas 1-3 superiores a la mediana bajó en algún momento por debajo de 450 cel/mm³ (fig.21A, línea continua negra) mientras que el evento ocurrió en el 100% de los individuos con niveles inferiores a la mediana (fig.21A, línea discontinua gris). La diferencia entre ambas curvas no fue estadísticamente significativa, pero estuvo muy cerca de la significación ($p < 0.07$). Se consideró entonces una caída más importante, el descenso de los CD4 por debajo de 350 cel/mm³, un punto importante para considerar el inicio de tratamiento¹⁰⁸ (fig.21 B). En este caso, el evento ocurrió aproximadamente en el 50% de individuos con menores niveles de α -defensinas 1-3 pero no ocurrió en ninguno de los individuos con niveles

de α -defensinas 1-3 superiores a la mediana. La diferencia entre ambas curvas fue significativa ($p < 0.03$) con un hazard ratio (HR) de 8.9 (1.2-65).

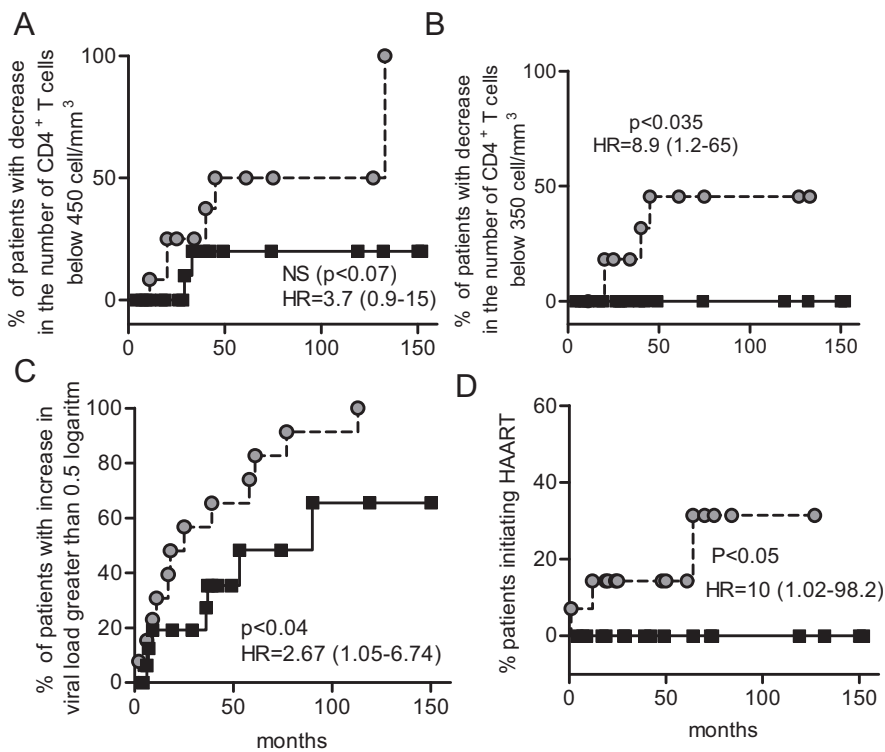


Figura 21. Los niveles de α -defensinas 1-3 secretados por imMDDC se asociaron con indicadores de progresión de la enfermedad. Los pacientes sin tratamiento en momento de la extracción sanguínea para obtener las MDDC fueron divididos en dos grupos, según que los niveles de α -defensinas 1-3 secretados por las imMDDC estuvieran sobre la mediana (cuadrados negros, n=18) o bajo la mediana (círculos grises, n=12) del grupo completo de pacientes. (A) Porcentaje de pacientes con un descenso en el número de células T CD4 por debajo de 450 cel/mm³ o (B) por debajo de 350 cel/mm³ durante el tiempo de seguimiento (meses). (C) Porcentaje de pacientes con un incremento en la carga viral plasmática de medio logaritmo y (D) porcentaje de pacientes que tuvieron que empezar tratamiento durante el seguimiento. Los valores de P y el Hazard Ratio con su intervalo de confianza están representados en la figura. Para determinar diferencias significativas entre las curvas se aplicó el test de Log-Rank.

El aumento de medio logaritmo en la PVL ocurrió en el 100 y 65% de los individuos con niveles de α -defensinas 1-3 inferiores y superiores a la mediana, respectivamente (fig. 21 C; $p < 0.04$; HR=2.67 (1.05-6.74)).

Finalmente, se estudiaron aquellos individuos que no tenían tratamiento en el momento de la extracción, pero tuvieron que iniciar

tratamiento antirretroviral posteriormente. Así, ninguno de los pacientes con niveles de α -defensinas 1-3 por encima de la mediana tuvo que iniciar tratamiento, mientras que un 31% de pacientes con niveles menores sí tuvieron que iniciarlo ($p=0.05$; HR=10 (1.02-98.2)).

v. DISCUSIÓN

V. DISCUSION.

1- LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS HUMANAS PRODUCEN Y SECRETAN α -DEFENSINAS-1-3.

El primer paso en nuestro estudio fue comprobar si las DC eran capaces de producir α -defensinas1-3, dado que no había sido descrito con anterioridad. Para nuestros estudios utilizamos DC derivadas de monocitos, un modelo válido y ampliamente utilizado para el estudio *in vitro* de las DC mieloides¹⁷⁴. Considerando que ya había sido reportado que los monocitos son capaces de producir α -defensinas1-3¹²⁷, era plausible pensar que las DC también producirían estos péptidos. Así, mediante RT-PCR a tiempo real, ELISA, y análisis de proteínas intracelulares por citometría y microscopía confocal pudimos demostrar por primera vez que las DC derivadas de monocitos inmaduras producen y secretan α -defensinas1-3¹⁷⁹. Es importante resaltar que los niveles detectados en MDDC inmaduras fueron mayores que los detectados en monocitos del mismo donante, usados como control.

Un hallazgo interesante consistía en el descenso de la producción de α -defensinas1-3 tras la maduración de las MDDC. Los niveles de mRNA fueron indetectables o casi indetectables en DC maduras y se hallaron menores niveles de α -defensinas1-3 en los sobrenadantes e intracelularmente. El descenso detectado en los niveles de α -

defensinas1-3 en los sobrenadantes es probablemente el resultado de la ausencia de síntesis de α -defensinas1-3, aunque cabe la posibilidad de que pudiera reflejar cierto grado de consumo por parte de la MDDC durante su proceso de maduración.

Otro hecho destacable, fue la variabilidad interindividual detectada en la cantidad de α -defensinas1-3 producidas por las imMDDC, consistente con un trabajo anterior donde se reportaba la expresión diferencial de mRNA en PBMC dependiendo de las variaciones en el número de copias de los genes de α -defensinas DEFA1 y DEFA3⁵⁶.

De especial importancia fisiopatológica podría ser el hallazgo del aumento de la producción de α -defensinas1-3 por la IL-1 β en MDDC. Se han descrito dos rangos de dosis distintos para las diferentes actividades de las α -defensinas1-3: micromolar para la actividad microbicida y nanomolar para la quimiotáctica²²³. De este modo, la up-regulación de la producción y secreción de α -defensinas1-3 en MDDC inmaduras mediada por la IL-1 β podría ser fisiológicamente relevante en un microambiente proinflamatorio. De modo similar, una producción incrementada por IL-1 β también se ha encontrado para las β -defensinas en PBMC y epitelio respiratorio^{56,200}.

Al igual que el cóctel de maduración de citocinas, el LPS y el IFN- α , pese a actuar a través de vías de señalización diferentes, produjeron los mismos efectos inhibidores sobre la producción de defensinas. Por tanto, hipotetizamos que otros sistemas que promuevan la maduración

completa de las DC darán como resultado una disminución en la producción de α -defensinas¹⁻³. A este respecto, los experimentos realizados con el virus NDV-B1 (que produce una fuerte respuesta de IFN de tipo I y la maduración de las DC tras su infección¹²⁵) y el virus NDV-NS1 (que posee la proteína NS1 del virus influenza, capaz de inhibir la respuesta de IFN, y que no produciría la maduración de las DC⁵⁹) vendrían a confirmar esta hipótesis.

Las DC inmaduras y maduras están programadas de forma diferente¹⁴. Las DC inmaduras están especializadas en capturar antígenos y procesarlos, y por tanto sería lógico que posean moléculas innatas capaces de protegerlas de posibles infecciones. Por otro lado, las DC maduras están determinadas para presentar antígenos a las células T y han perdido la capacidad de capturar antígenos y procesarlos. Así, es concebible, que la completa maduración de las DC conlleve también cambios en la producción de defensinas.

Se piensa que las DC son una de las primeras células diana para la infección por HIV en las superficies mucosas²²¹, y que el VIH aprovecha su papel de presentadoras de antígeno a las células T CD4+ para mediar la expansión del VIH a las células T. La producción de α -defensinas¹⁻³ por las DC inmaduras, contribuiría al reclutamiento de monocitos, células T naïve y otras DC inmaduras a los microambientes proinflamatorios en los lugares de infección mucosos. Además, el efecto antimicrobiano de las α -defensinas¹⁻³ favorecería un procesamiento eficiente de patógenos inactivados sin que las DC se infecten. La

variabilidad en la producción de α -defensinas1-3 por las imMDDC podría ser otro determinante del hospedador de la diferente susceptibilidad interindividual a las infecciones, un tema de particular interés en el campo de la infección por VIH.

Por otro lado, es posible que las defensinas secretadas pudieran inactivar las partículas virales unidas a la membrana de la DC y evitar así que durante la presentación antigénica el virus pudiera ser transmitido a la célula T CD4.

2- LA INFECCIÓN VIRAL MODULA LA SECRECIÓN DE α -DEFENSINAS 1-3 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS Y EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS MIELOIDES CD1c+ CIRCULANTES. IMPORTANCIA DEL EFECTO ESTROGÉNICO.

En vista de los resultados obtenidos con las DC derivadas de monocitos, un paso necesario en nuestro estudio fue comprobar si las DC mieloides circulantes directamente aisladas de sangre (myDC) también secretaban α -defensinas1-3, lo que mostraría así una mayor relevancia fisiológica.

Hasta el momento, la producción de α -defensinas1-3 no había sido estudiada en myDC y por tanto nosotros mostramos por primera vez que las myDC secretan α -defensinas1-3. Además, la comparación entre myDC y MDDC del mismo donante, algo que muy pocos estudios han abordado, mostró una producción mucho mayor en myDC.

Numerosos trabajos describen el amplio espectro antiviral de las α -defensinas1-3¹⁰⁹. Se ha descrito que son capaces de inactivar al virus herpes simplex, citomegalovirus, influenza A y VIH entre otros^{33,35,114,127,183}. Estos estudios, sin embargo, se basan en la adición de α -defensinas1-3 sintéticas al virus o a los cultivos celulares para probar su capacidad de neutralización. En nuestro estudio llevamos a cabo una aproximación diferente, intentando estudiar cuál sería la respuesta natural de las DC frente a una infección vírica. Para ello utilizamos un modelo infectivo bien establecido para el estudio de la respuesta innata antiviral (respuesta de IFN tipo I) en DC. El virus NDVB1 induce una fuerte respuesta antiviral en DC con producción de IFN tipo I⁵⁹ y la progresiva maduración de la DC. Por el contrario, el virus NDV-NS1 lleva la proteína NS1 del virus influenza, que inhibe la respuesta antiviral, impidiendo la producción de IFN tipo I, la liberación de citocinas e inhibiendo la maduración celular¹²⁵. De este modo, mostramos una relación entre la respuesta antiviral y la secreción de α -defensinas1-3 en DC. La infección viral provocó una liberación inmediata de α -defensinas1-3 en MDCC tras la infección con NDVB1. Es muy probable que este incremento se deba a la activación de mecanismos de respuesta antiviral, ya que no se observa cuando las células son infectadas por el virus con la proteína NS1. Esta observación sugiere que el aumento en la producción de α -defensinas1-3 es parte de la respuesta inflamatoria antiviral. Sin embargo, este incremento de α -defensinas1-3 no se observó en myDC a las dos horas tras la infección. Quizá debido a que los niveles

basales de α -defensinas1-3 en estas células fueron considerablemente mayores que los observados en MDDC y muestra diferencias en la acción del virus sobre estas células. También podría ser el reflejo de un distinto grado de maduración/diferenciación entre ambos tipos celulares.

Teniendo en cuenta la localización anatómica fundamental de nuestras células de estudio, es decir, las mucosas, donde las DC patrullan y ejercen su labor de vigilancia y captura de antígenos para ser luego presentados a las células T⁸⁴, y el papel fundamental que se atribuye a las α -defensinas1-3 como efectores innatos en las mucosas, no podíamos olvidar el análisis de la influencia de las hormonas sexuales femeninas, especialmente la influencia estrogénica, tan importante durante el ciclo menstrual y el embarazo.

Con anterioridad han sido descritas interacciones entre el sistema endocrino y el sistema inmune^{41,220}. Los niveles de hormonas sexuales esteroideas fluctúan a lo largo del ciclo menstrual y se incrementan considerablemente a lo largo de los tres trimestres del embarazo, alcanzando sus valores máximos en los últimos tres meses. De igual modo, se han descrito variaciones en los niveles de defensinas detectados a lo largo del tracto urogenital^{41,90,105-107}. Las α -defensinas1-3 han sido encontradas en amnion, corion y placenta y en líquidos amnióticos de embarazos de más de 37 semanas. Además, se describieron que las concentraciones de α -defensinas y β -defensinas en lavados cervicovaginales de mujeres sanas no embarazadas podían

variar en hasta 50 veces. Por otro lado, se mostraró que la concentración de α -defensinas1-3 aumentaba significativamente durante el parto cuando los niveles de estrógeno caen bruscamente¹⁵⁵.

Se ha sugerido por tanto, que existiría una regulación hormonal de los niveles de defensinas. De hecho, hay algunos artículos en los que se describe el efecto del E2 y PG sobre la producción y secreción de defensinas humanas por las células epiteliales^{41,184}. Sin embargo, hasta el momento, el efecto de estas hormonas sobre la secreción de α -defensinas1-3 en DC no había sido descrito. Nosotros demostramos cómo el E2, pero no la PG, reduce significativamente los niveles de α -defensinas1-3 en ambas poblaciones de DC de manera dosis dependiente, de modo que la mayor inhibición se observa con la dosis más alta. Además, según nuestros resultados parece que las myDC serían más susceptibles a esta inhibición por estrógeno. Estos resultados estarían por tanto a favor de una regulación hormonal de las α -defensinas1-3 y de acuerdo con las observaciones anteriores sobre la reducción de α -defensinas1-3 ante niveles elevados de E2. El estrógeno tiene sus picos máximos durante la ovulación y el embarazo. En estas dos situaciones, la regulación de la inmunidad innata es particularmente importante^{41,107} para permitir la entrada de los espermatozoides y la supervivencia del feto, inmunológicamente distintos. Lo contrario ocurriría durante la menstruación, cuando los niveles de E2 caen bruscamente, un aumento en los niveles de α -defensinas1-3 contribuiría a proteger el tracto urogenital de las infecciones.

Según nuestros resultados, el pretratamiento estrogénico de las DC fue capaz de inhibir la respuesta de α -defensinas1-3 frente a una posterior infección. Existen numerosos trabajos sobre la susceptibilidad incrementada a infecciones durante el embarazo, incluyendo el VIH, sugiriendo un importante papel de las hormonas sexuales en este proceso^{42,80,219}. Quizá, esta inhibición de la producción de α -defensinas1-3 podría contribuir a esta incrementada susceptibilidad a ciertas infecciones durante el embarazo.

Por último, el cultivo mixto entre las MDDC y células T CD4 *naive* alogénicas produjo un gran incremento de los niveles de α -defensinas1-3 y el E2 fue capaz de inhibir esta secreción. Por tanto, el efecto inhibitor del estrógeno sobre la secreción de α -defensinas1-3 en cocultivo, apuntaría hacia la capacidad del E2 de inhibir la respuesta inmune innata. Las α -defensinas1-3, además de su papel directo en la inmunidad innata, son capaces de atraer otras células a los focos inflamatorios y de inducir la secreción de citocinas y es posible que el E2 pudiera alterar también el papel quimiotáctico de estos péptidos.

En conclusión, demostramos que las myDC producen α -defensinas1-3 en mayor cantidad que las MDDC, lo que da un mayor peso fisiopatológico a nuestros hallazgos. Demostramos que el E2, pero no la PG, disminuye significativamente los niveles de α -defensinas1-3 en ambas poblaciones de DC, tanto en situación basal como tras una infección o en cocultivo. Esta inhibición estrogénica de las α -

defensinas1-3 podría tener una gran importancia para explicar la mayor susceptibilidad a infecciones virales, como el VIH, durante el embarazo.

3. IMPACTO DE LAS α -DEFENSINAS 1-3 SOBRE LA MADURACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE LAS DC DERIVADAS DE MONOCITOS. EFECTOS OPUESTOS DEPENDIENTES DE LA CONCENTRACIÓN.

Otra aportación novedosa de nuestro trabajo consiste en la demostración de que las α -defensinas1-3 son capaces de modular la maduración y diferenciación de las MDDC humanas normales *ex vivo*¹⁷⁸. Este efecto inmunomodulador sobre la maduración se reflejó en términos de morfología, cambios inmunofenotípicos, producción de citocinas y capacidad aloestimuladora. Así mismo, este efecto mostró un comportamiento bifásico, dependiente de la dosis. A nuestro entender, ningún otro estudio ha abordado estas actividades de las α -defensinas1-3 sobre las DC humanas.

Las DC son células clave en la iniciación y regulación de la respuesta inmune, jugando un papel central en la unión entre inmunidad innata y adaptativa^{14,205}. Así, el reclutamiento de DC y la maduración de estas células a los sitios de infección son eventos críticos para el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa^{139,140,157}. Probablemente las DC interactúan con las α -defensinas1-3 *in vivo* en los sitios de infección pero sus efectos sobre la maduración y diferenciación de las DC continúa siendo ampliamente desconocida.

En el presente estudio analizamos estos efectos utilizando MDDC cultivadas en medio suplementado con dos concentraciones diferentes de suero AB humano (1 y 5%) para reproducir tanto los espacios fisiológicos libres de suero o con bajas concentraciones, como las mucosas, como las condiciones fisiológicas con alta concentración de suero, respectivamente. Aunque ha sido descrito que las proteínas del suero interfieren algunas actividades de las defensinas³⁵, nosotros no encontramos diferencias entre ambas concentraciones, lo que sugiere que los efectos observados sobre el fenotipo de las DC se mantendrían en presencia de suero y son probablemente consecuencia de la entrada de las α -defensinas1-3 en las células. Además, nuestro sistema de cultivo GMP evita la presencia de sustancias contaminantes, como el LPS.

Como ya se ha mencionado anteriormente, se han descrito dos rangos diferentes de concentración para las distintas actividades de las α -defensinas1-3 descritas hasta el momento, la actividad antimicrobiana a un rango micromolar y la quimiotáctica a rango nanomolar^{209,223,224}. Por tanto, la dosis de defensinas presente en el medio de cultivo debería ser un factor importante a tener en cuenta para determinar la actividad de las defensinas. Así, nosotros analizamos los efectos de un amplio rango de dosis de α -defensinas1-3 en ausencia o presencia de mat-cocktail, que simula un ambiente proinflamatorio, para comprobar respectivamente su posible efecto sobre la maduración-activación de las MDDC y su posible efecto para modular

el efecto madurativo del cóctel de citocinas. Las concentraciones de α -defensinas1-3 utilizadas se eligieron según lo descrito en artículos previos sobre activación de monocitos o actividad antimicrobiana^{33,35,127,223}, sin llegar a ser citotóxicas. En nuestros resultados, claramente encontramos un efecto dual opuesto dependiendo de la concentración utilizada. De este modo, bajas concentraciones (7.3×10^{-8} a 2.9×10^{-7} M) de α -defensinas1-3 indujeron la maduración de las MDSC. Previamente, Biragyn *et al* ya habían descrito²¹ la inducción de maduración fenotípica y funcional en DC de ratón con la β -Defensin-2 murina. Así mismo también fue previamente descrita la up-regulación de moléculas coestimuladoras y activación de células presentadoras de antígeno por β -defensinas humanas^{21,65}.

Por el contrario, encontramos el efecto opuesto con altas concentraciones de α -defensinas1-3 (2.9 a 5.8×10^{-6} M) que disminuyeron la expresión de CD86 y HLA-DR y fueron capaces de contrarrestar la secreción de citocinas inducida por el mat-cocktail. Además, se observó una consistente tendencia a disminuir la capacidad aloestimuladora de las MDSC. Un interesante y paradójico hallazgo fue la up-regulación de CD83 con todas las dosis de α -defensinas1-3 en ausencia y presencia de mat-cocktail, una observación consistentemente repetida. A parte de su uso instrumental para caracterizar DC maduras^{21,24,167}, la molécula CD83 continúa siendo una molécula enigmática. Sin embargo, una hipotética posibilidad es que α -defensinas1-3 actúan de algún modo up-regulando CD83, de forma

directa o indirecta. La posible relación entre α -defensinas1-3 y la expresión de CD83 merece mayor investigación.

Niveles altos y bajos de α -defensinas1-3 se encuentran probablemente *in vivo* en los focos inflamatorios y por tanto nuestros resultados *ex vivo* podrían tener relevancia fisio-patológica. Se sabe que los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3 oscilan entre prácticamente indetectables en individuos sanos hasta 170 $\mu\text{g/ml}$ en pacientes con sepsis¹⁵⁹. Aunque la concentración exacta de α -defensinas1-3 en el foco inflamatorio *in vivo* no se conoce, hay evidencias que muestran que las α -defensinas1-3 se liberan en grandes cantidades por los neutrófilos en los focos infecciosos^{37,67}, así que las DC inmaduras residentes en los tejidos serían probablemente rodeadas por altas concentraciones de α -defensinas1-3.

En esta situación de respuesta temprana, la actividad fagocítica e inflamatoria es más urgente que el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa. En este contexto, nuestros resultados sugieren que las α -defensinas1-3 podrían tomar parte en esta respuesta inmune temprana inhibiendo la maduración de las DC inmaduras residentes en los tejidos y además interferir con la diferenciación de monocitos a DC, una noción consistente con un trabajo reciente que describe cómo la exposición de macrófagos a secreciones de polimorfonucleares (PMN), específicamente α -defensinas1-3 y HBP (heparin-binding protein) aumenta considerablemente la fagocitosis²⁰². Por otro lado, en la periferia del foco infeccioso, el gradiente de α -defensinas1-3 y otras

quimiocinas podría atraer DC inmaduras^{172,224} que, llegando en una fase más tardía del proceso inflamatorio, encontrarían bajos niveles de α -defensinas1-3. Nuestros resultados apoyarían que estos bajos niveles de α -defensinas1-3 potenciarían el fenotipo maduro y la producción de citocinas por las DC que probablemente daría lugar a una presentación a células T más eficiente.

Es importante destacar la interrelación entre IL-1 β y α -defensinas1-3. Como describimos (Apartado 1.3), la IL-1 β induce la producción de α -defensinas1-3 en DC. Según nuestros resultados tras estimulación de DC con α -defensinas1-3, las concentraciones bajas de α -defensinas1-3 aumentan la producción de IL-1 β , que a su vez aumentaría la producción de α -defensinas1-3, produciéndose así una retroalimentación positiva. Sin embargo, las grandes concentraciones de α -defensinas1-3 causaron una marcada inhibición de la producción de IL-1 β , lo que podría suponer un posible mecanismo de autocontrol de la propia producción de α -defensinas1-3.

Asimismo, nuestros datos también muestran por primera vez que las α -defensinas1-3 inducen la producción de IL-8 en MDDC inmaduras de manera dosis dependiente. Más aún, las altas concentraciones de α -defensinas1-3 (5.8×10^{-6} M) también indujeron la producción de IL-8 cuando estuvieron presentes durante el proceso de diferenciación de monocitos a DC. De este modo, mediante la inducción de la producción de IL-8, las α -defensinas1-3 promoverían el reclutamiento de más neutrófilos al foco inflamatorio, con la consiguiente liberación de

más α -defensinas1-3. Otros trabajos mostraron anteriormente cómo las α -defensinas1-3 también estimulan la secreción de IL-8 en monocitos humanos^{32,102,212} y en células epiteliales de pulmón, considerando la producción de IL-8 como un medidor biológico de la respuesta ante la estimulación con α -defensinas1-3²⁰⁷.

Aparte de los efectos en la maduración de las MDDC, también se investigó si las α -defensinas1-3 podrían de algún modo interferir con la diferenciación de monocito a MDDC inmadura durante el clásico periodo de cultivo de 5 días. Se comprobaron los efectos de una dosis alta (20 $\mu\text{g/ml}$) y una dosis baja (0.5 $\mu\text{g/ml}$) de α -defensinas1-3 sobre el inmunofenotipo y la producción de citocinas. Únicamente la dosis alta tuvo efectos y el más significativo y remarcable fue el que había sobre la producción de IL-8. Este efecto fue dependiente del tiempo y los máximos niveles se alcanzaron cuando las α -defensinas1-3 estuvieron presentes durante los 5 días de cultivo. Sin embargo, no podemos descartar que este incremento aparentemente dependiente del tiempo se deba simplemente a la acumulación de IL-8 en los sobrenadantes.

Resulta curioso, sin embargo, que la incubación de las MDDC durante los últimos 4 días o menos con α -defensinas1-3 afectó a la expresión de CD86, mientras que la incubación desde el inicio (los 5 días de cultivo) no la afectó. La principal diferencia entre ambas circunstancias es probablemente que las α -defensinas1-3 que estuvieron presentes durante 5 días fueron añadidas al cultivo desde el inicio, al mismo tiempo que se añadieron IL-4 y GM-CSF, mientras que en los

demás casos las α -defensinas1-3 se añadieron al cultivo al menos 24h después de la adición de IL-4 y GM-CSF. Se ha demostrado anteriormente⁴⁵ que los monocitos cultivados únicamente durante 24h con IL-4 y GM-CSF ya muestran un inmunofenotipo de DC inmadura. Por lo tanto, una hipótesis concebible sería que el efecto de las α -defensinas1-3 es diferente cuando actúan sobre monocitos (5 días en cultivo, defensinas añadidas en día 0) que cuando actúan sobre células que ya han sido condicionadas para ser DC. Los resultados observados en esta última situación, serían congruentes con los efectos anteriormente descritos observados en DC diferenciadas durante 5 días y luego incubadas con α -defensinas1-3, donde se observó una disminución en la expresión de CD86 con la dosis de 20 μ g/ml.

Además del reclutamiento de DC inmaduras a los sitios de infección, también se ha demostrado el potencial de los monocitos para diferenciarse a DC *in vivo* durante los procesos infecciosos^{118,171}. En este marco, nuestros datos sugieren que la presencia de altas dosis de α -defensinas1-3 en un foco inflamatorio podría influenciar la diferenciación de monocito a DC inmadura y promovería quimiotaxis de más neutrófilos, y la subsiguiente liberación de más α -defensinas1-3, de acuerdo con una situación de infección temprana y la necesidad urgente de fagocitosis y la actividad microbicida directa de α -defensinas1-3.

Finalmente, las α -defensinas1-3 utilizadas para nuestros estudios fueron purificadas a partir de neutrófilos, por tanto, una mezcla de α -

defensinas1, 2 y 3 se utilizó simultáneamente en cada experimento, de igual modo que ocurre cuando los neutrófilos liberan α -defensinas1-3 almacenadas en sus gránulos. Es por esto que no se sabe cuál de las tres α -defensinas es la responsable de los efectos observados. Ya que se han descrito algunas diferencias en la actividad quimiotáctica de cada una de ellas^{82,224}, estudios futuros serían necesarios utilizando α -defensinas1, 2 y 3 sintéticas de forma individual para dilucidar cuál de ellas es principalmente responsable de los efectos observados con la mezcla natural de las tres.

En resumen, este estudio demuestra que las α -defensinas1-3 son capaces de modular la maduración y diferenciación de las MDDC. Estos efectos son complejos y dependiendo de la dosis pueden potenciar o inhibir la maduración de las DC, una característica que puede ser relevante *in vivo* para la regulación de la respuesta inmune en los focos de inflamación, donde es concebible encontrar un amplio rango de concentración de α -defensinas1-3.

4. LAS MDDC DE INDIVIDUOS INFECTADOS POR VIH PRODUCEN MAYORES NIVELES DE α -DEFENSINAS1-3 Y ESTOS NIVELES SE ASOCIAN CON UNA MENOR PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD.

Varios estudios han demostrado que las α -defensinas1-3 actúan como inhibidores naturales de la infección por VIH^{33-35,85,127}, sin embargo, los mecanismos que dan lugar a esta inhibición no son completamente

conocidos. Por los datos publicados, parece admitido que existiría un mecanismo dual de actuación frente al VIH mediado por las α -defensinas1-3^{35,66}, que inhibirían tanto la entrada del virus en la célula como pasos posteriores a la entrada. De este modo, en superficies mucosas y en ausencia de suero, las α -defensinas1-3 serían capaces de neutralizar los viriones VIH impidiendo la unión entre la envoltura viral (gp120) y su receptor (CD4)⁶⁶ y por tanto bloqueando la entrada del virus. Por otro lado, una vez que el virus ya ha entrado en la célula, independientemente de la presencia de suero, las α -defensinas1-3 suprimirían la replicación del VIH, presumiblemente mediante interferencia con vías de señalización intracelular³⁵. Ya que el efecto directo de las α -defensinas1-3 es inhibido en presencia de suero, se ha propuesto que las α -defensinas1-3 ejercerían su acción directa en las superficies mucosas y focos inflamatorios más que en sangre, donde serían rápidamente neutralizadas por las proteínas plasmáticas.

Asimismo, las α -defensinas1-3 son capaces de disminuir la expresión de CD4 en la superficie celular, a concentraciones superiores a 3.5 μ M, lo que podría tener importantes implicaciones en la potencia y duración de los efectos antivirales de las α -defensinas1-3 secretadas *in vivo*⁶⁶.

De igual modo, las propiedades inmunomoduladoras de las defensinas, como la quimiotaxis de DC inmaduras, linfocitos o monocitos²²⁴, así como la inducción de la secreción de citocinas³², o la

modulación de la maduración y diferenciación de las DC¹⁷⁸ podrían igualmente alterar la historia natural de la infección.

La importancia de las DC en la infección por VIH radica en su localización y función. Las DC habitan en las superficies mucosas (vaginal, anal, intestinal) donde ejercen su papel de vigilancia²²¹. Se ha especulado que serían las DC las primeras en contactar con el virus y, al presentarlo a las células T CD4+, transmitirían de esta forma la infección. Por lo tanto, las DC serían una de las células clave involucradas en las fases tempranas de la infección por VIH y la liberación a nivel local de α -defensinas¹⁻³ por las DC podría tener relevancia fisiopatológica. Un mecanismo innato, capaz de inactivar al virus antes de su presentación, podría dar lugar a una presentación sin infección y, por lo tanto, al desarrollo de una respuesta inmune adaptativa eficaz frente al virus.

En el presente estudio, analizamos por primera vez los niveles de α -defensinas¹⁻³ producidas por DC, tanto en individuos sanos no infectados por VIH, como en pacientes infectados por VIH con distintas características clínicas. Dos diferencias fundamentales de nuestro estudio con respecto a trabajos anteriores sobre defensinas e infección por VIH son, en primer lugar, el enfoque de investigar en DC: células localizadas en mucosas que contactan tempranamente con el virus y median su dispersión durante la presentación a células T CD4. En segundo lugar, el tipo de pacientes VIH+ utilizados: tanto pacientes capaces de controlar espontáneamente la infección, incluso manteniendo carga viral indetectable, como pacientes con altas

viremias o con tratamiento, constituyendo grupos con fenotipos extremos.

En nuestro análisis encontramos que las MDDC de individuos infectados por VIH producían mayores niveles de α -defensinas1-3 que el grupo de controles no infectados. Esta mayor producción ocurrió en ausencia de estimulación *in vitro*, una característica de los mecanismos de la inmunidad innata^{81,213}, que podría además ser un reflejo de la estimulación crónica del sistema inmune. Este hallazgo estaría además en acuerdo con un artículo en el que se describían mayores niveles de α -defensinas1-3 en pacientes HIV y expuestos no infectados que en el grupo control no expuesto no infectado²¹⁰.

La subdivisión de nuestro grupo de pacientes infectados en los distintos subgrupos clínicos, reveló que las MDDC de individuos que espontáneamente controlan la infección (es decir, controladores de élite y controladores) produjeron mayores niveles de α -defensinas1-3 que los no controladores (virémicos y pacientes con tratamiento). Es interesante notar que no se pueden atribuir a la viremia por si misma las diferencias en los niveles de α -defensinas1-3 secretados por las DC, ya que los pacientes con alta viremia y con viremia indetectable por tratamiento antirretroviral produjeron niveles similares de α -defensinas1-3. Es importante destacar que todos los pacientes seleccionados tenían niveles de células T CD4 conservados (>450 cel/mm³) y, por tanto, las diferencias halladas no fueron debidas a una disminución en el número de células CD4. Una posible explicación sería una predisposición

genética para la producción de α -defensinas1-3. Como ya se comentó en la introducción, existen variaciones en el número de copias de los genes que codifican para las α -defensinas1-3^{5,12,83,122,123} y quizá esto podría determinar distintas predisposiciones genéticas para la resistencia a la infección por VIH. De hecho, dos estudios muy recientes encontraron mayor número de copias de mRNA de HBD-2 y 3 en mucosa oral de ENI que en controles sanos²²⁷, así como menor número de copias del gen DEFB104 en niños VIH-positivos frente a niños expuestos no infectados¹⁴⁶.

El hecho de que las DC de los pacientes con alta viremia produjeran menores niveles de α -defensinas1-3, cuando lo intuitivo sería lo contrario, podría también reflejar una alteración de las DC y su incapacidad para hacer frente a grandes cantidades de virus o, incluso, podría deberse a mecanismos propios del VIH dirigidos a contrarrestar la respuesta de α -defensinas1-3, al igual que el virus es capaz de evadir muchos otros mecanismos de defensa del sistema inmune⁹. Los experimentos *in vitro* en los que se vió que el aumento en el número de partículas virales (aumento de MOI 0.01 a 0.1) abolía la capacidad de las α -defensinas1-3 para inhibir la infección de células T CD4 por VIH³⁵ estaría de acuerdo con esta hipótesis. Por otro lado, la baja producción de α -defensinas1-3 por DC de los pacientes con HAART podría ser debida a un efecto inhibitor del propio tratamiento.

Un interesante resultado fue la correlación positiva entre los niveles de α -defensinas1-3 secretadas por las MDCC y el número de células T

CD4, un parámetro de progresión de la enfermedad. Más aún, esta correlación solamente se mantuvo en el grupo de controladores, pero no en el de no controladores, incluso aunque todos los pacientes tenían similares niveles de CD4, mostrando quizá una afectación selectiva de la producción de α -defensinas1-3 en las DC de los individuos no controladores.

En contraste, el análisis de los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3 no mostró diferencias entre los distintos grupos de pacientes y sólo se detectaron niveles ligeramente superiores en pacientes con alta viremia. Además, no se halló ninguna correlación entre los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3 y el número de CD4. Esto constituye un hallazgo remarcable, ya que las α -defensinas1-3 detectadas en plasma provienen fundamentalmente de los neutrófilos⁶⁷, no de las DC, y esto indicaría que sólo las α -defensinas1-3 producidas por las DC, pero no por los neutrófilos, se correlacionan con un mejor control de la enfermedad. Este hecho además demuestra la importancia crítica de las DC para estudiar las α -defensinas1-3.

Curiosamente, sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre la carga viral plasmática y los niveles de α -defensinas1-3 producidos por las MDDC, ni con los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3. Aunque en un principio esto podría parecer contradictorio, en estudios previos realizados en humanos, solamente se encontraron alteraciones marcadas de los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3 durante procesos agudos, tales como sepsis, meningitis

bacteriana, infecciones intrauterinas o síndrome agudo de distrés respiratorio¹⁵⁹. Igualmente, en concordancia con nuestros resultados, no se encontró correlación entre la PVL y la expresión de α -defensinas1-3 en ganglios linfáticos⁶² ni entre PVL y niveles de α -defensinas1-3 en leche materna¹⁵. Además, en un estudio realizado por Baroncelli *et al*, donde se infectaban a macacos con VIH^S¹⁶, se describió un marcado aumento en los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3 solamente dos semanas después de la infección, coincidiendo con el pico de replicación viral, pero tras esta fase aguda de la infección, los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3 volvieron a disminuir. Por tanto, es plausible que no se encuentren diferencias en los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3 entre los diferentes grupos de pacientes de nuestro estudio, crónicamente infectados, y que no exista una correlación con la carga viral.

Las curvas de mortalidad encontradas en nuestro estudio apoyarían aún más el posible papel protector de las α -defensinas1-3 producidas por las DC, ya que bajos niveles de secreción de α -defensinas1-3 por las DC se asociaron con un descenso importante en los niveles de CD4, un marcado aumento en la carga viral y la necesidad de iniciar tratamiento antirretroviral, independientemente de la clasificación clínica de estos pacientes. Parece especialmente relevante el hallazgo de la asociación de menores niveles de α -defensinas1-3 con caída de los niveles de CD4 bajo 350 cel/mm³, dado

que se considera una cifra crítica a la hora de decidir el inicio de tratamiento¹⁰⁸.

Un problema inherente a nuestro estudio, y a muchos otros similares, sería el de determinar si la mayor producción de α -defensinas¹⁻³ por las DC de los individuos controladores sería causa o consecuencia de un mejor estado clínico inmunológico. Aunque no podemos responder a esta pregunta con certeza, los resultados obtenidos en el análisis de las curvas de supervivencia apoyaría fuertemente la hipótesis de que una mayor producción de α -defensinas¹⁻³ por las DC daría lugar a un mejor control de la infección por VIH.

A pesar de la demostrada actividad anti-VIH de las α -defensinas¹⁻³ *in vitro*, su posible papel protector *in vivo* durante el curso de la infección por VIH está aún por demostrar. Muy pocos estudios han analizado los niveles de α -defensinas¹⁻³ en individuos de bajo riesgo e individuos infectados por VIH para intentar determinar los niveles fisiológicos y patológicos de estas moléculas^{15,61,62,210}. Además, estos pocos estudios, se han enfocado en los niveles de α -defensinas¹⁻³ presentes en plasma o fluidos, que constituyen un reflejo de la secreción por parte de los neutrófilos fundamentalmente y están ampliamente influenciados por infecciones concomitantes u otros estímulos, haciendo muy complejo el análisis de los resultados¹²⁰.

En un estudio reciente¹²⁰, la capacidad neutralizante del VIH detectada en muestras de lavado vaginal se vio que estaba

correlacionada significativamente con los niveles detectados de α -defensinas1-3 y LL-37, confirmándose así la actividad anti-VIH de estas moléculas. Sin embargo, los mayores niveles de α -defensinas1-3 en estas muestras estuvieron asociados con una mayor adquisición del VIH. Dado que la adquisición del VIH va generalmente asociada con adquisición de otras enfermedades de transmisión sexual, estos mayores niveles α -defensinas1-3 detectados podrían ser un reflejo de la secreción de los neutrófilos para defenderse de la infección bacteriana concomitante¹²⁰. Como hemos dicho anteriormente, los niveles de α -defensinas1-3 detectados en los fluidos de la mucosa vaginal provienen de los neutrófilos, por tanto, pensamos que no solamente los niveles de α -defensinas1-3, sino la localización y las células productoras de estas moléculas son factores de especial importancia a tener en cuenta en la infección por VIH. Dado que los pocos estudios realizados con pacientes, hasta el momento, se han enfocado en los niveles de α -defensinas1-3 producidos por neutrófilos, no por DC, y quizá esta podría ser la clave de las contradicciones entre los distintos trabajos.

En conclusión, demostramos una mayor secreción de α -defensinas1-3 por las DC de individuos infectados por VIH que en individuos no infectados, especialmente en los individuos capaces de controlar espontáneamente la infección. Esta mayor secreción se correlaciona positivamente con los niveles de células T CD4 y además, los menores niveles de α -defensinas1-3 se asocian con una mayor

progresión de la enfermedad. Aunque más estudios son necesarios, en nuestra opinión, este trabajo abre una importante línea de investigación en el campo de la inmunidad innata frente al VIH y, quizá en un futuro, la determinación de los niveles de α -defensinas¹⁻³ podría constituir una herramienta diagnóstica más para ayudar a identificar tempranamente aquellos pacientes que tendrán una peor evolución.

vi. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten concluir que:

- Las células dendríticas derivadas de monocitos, así como las células dendríticas mieloides circulantes, producen y secretan α -defensinas1-3.
- La producción de α -defensinas1-3 disminuye tras la maduración de las MDDC con distintos agentes madurativos y se ve incrementada con citocinas pro-inflamatorias, especialmente con IL-1 β .
- La producción de α -defensinas1-3 por las DC se ve incrementada en la respuesta antiviral de IFN de tipo I, así como co-cultivo de DC con células T CD4 naive alogénicas. Esta producción se ve fuertemente inhibida por el estrógeno.
- Las α -defensinas1-3 modulan la maduración y diferenciación de las DC con efectos opuestos dependiendo de la concentración. Además, inducen una secreción dosis-dependiente de IL-8 por las DC inmaduras.
- Las MDDC de pacientes infectados por VIH producen mayores niveles de α -defensinas1-3 que los individuos sanos no infectados. Dentro del grupo de infectados, los pacientes que controlan espontáneamente al VIH producen mayores niveles de defensinas que los que no la controlan.

- Los niveles de α -defensinas1-3 producidos por las MDDC, pero no los niveles plasmáticos de α -defensinas1-3, se correlacionan positivamente con el número de células T CD4.
- Los menores niveles de producción de α -defensinas1-3 por las DC se asocian con una mayor progresión de la enfermedad.

vii. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Reference List

- ¹ M. M. Addo, *et al.*, "Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load," *J. Virol.* **77**(3), 2081 (2003).
Ref Type: Journal
- ² B. Agerberth, *et al.*, "The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations," *Blood* **96**(9), 3086 (2000).
Ref Type: Journal
- ³ C. Aiken, *et al.*, "Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain," *Cell* **76**(5), 853 (1994).
Ref Type: Journal
- ⁴ S. M. Alam, *et al.*, "The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes," *J. Immunol.* **178**(7), 4424 (2007).
Ref Type: Journal
- ⁵ P. M. Aldred, E. J. Hollox, and J. A. Armour, "Copy number polymorphism and expression level variation of the human alpha-defensin genes DEFA1 and DEFA3," *Hum. Mol. Genet.* **14**(14), 2045 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁶ M. Altfeld, *et al.*, "Influence of HLA-B57 on clinical presentation and viral control during acute HIV-1 infection," *AIDS* **17**(18), 2581 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁷ M. Altfeld and T. M. Allen, "Hitting HIV where it hurts: an alternative approach to HIV vaccine design," *Trends Immunol.* **27**(11), 504 (2006).
Ref Type: Journal
- ⁸ B. Auvert, *et al.*, "Male circumcision and HIV infection in four cities in sub-Saharan Africa," *AIDS* **15 Suppl 4**, S31-S40 (2001).
Ref Type: Journal
- ⁹ J. Bailey, *et al.*, "Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs," *Curr. Opin. Immunol.* **16**(4), 470 (2004).
Ref Type: Journal
- ¹⁰ J. R. Bailey, *et al.*, "Maintenance of viral suppression in HIV-1-infected HLA-B*57+ elite suppressors despite CTL escape mutations," *J. Exp. Med.* **203**(5), 1357 (2006).
Ref Type: Journal

- ¹¹ K. Balabanian, *et al.*, "CXCR4-tropic HIV-1 envelope glycoprotein functions as a viral chemokine in unstimulated primary CD4+ T lymphocytes," *J. Immunol.* **173**(12), 7150 (2004).
Ref Type: Journal
- ¹² E. Ballana, *et al.*, "Inter-population variability of DEFA3 gene absence: correlation with haplotype structure and population variability," *BMC. Genomics* **8**, 14 (2007).
Ref Type: Journal
- ¹³ J. Banchereau, *et al.*, "Immunobiology of dendritic cells," *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767 (2000).
Ref Type: Journal
- ¹⁴ J. Banchereau and R. M. Steinman, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature* **392**(6673), 245 (1998).
Ref Type: Journal
- ¹⁵ S. Baroncelli, *et al.*, "Tumor necrosis factor-alpha, Interleukin-10, and alpha-defensins in plasma and breast milk of HIV-infected highly active antiretroviral therapy-treated and untreated pregnant women in Mozambique," *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **47**(5), 647 (2008).
Ref Type: Journal
- ¹⁶ S. Baroncelli, *et al.*, "Characterization of alpha-defensins plasma levels in *Macaca fascicularis* and correlations with virological parameters during SHIV89.6Pcy11 experimental infection," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**(2), 287 (2007).
Ref Type: Journal
- ¹⁷ F. Barre-Sinoussi, *et al.*, "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)," *Science* **220**(4599), 868 (1983).
Ref Type: Journal
- ¹⁸ A. S. Beignon, *et al.*, "Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions," *J. Clin. Invest* **115**(11), 3265 (2005).
Ref Type: Journal
- ¹⁹ C. M. Bell, *et al.*, "Molecular characterization of the HIV type 1 subtype C accessory genes *vif*, *vpr*, and *vpu*," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**(2), 322 (2007).
Ref Type: Journal
- ²⁰ M. R. Betts, *et al.*, "HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells," *Blood* **107**(12), 4781 (2006).
Ref Type: Journal

- ²¹ A. Biragyn, *et al.*, "Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2," *Science* **298**(5595), 1025 (2002).
Ref Type: Journal
- ²² P. Y. Bochud, *et al.*, "Polymorphisms in Toll-like receptor 9 influence the clinical course of HIV-1 infection," *AIDS* **21**(4), 441 (2007).
Ref Type: Journal
- ²³ R. Bosire, *et al.*, "Breast milk alpha-defensins are associated with HIV type 1 RNA and CC chemokines in breast milk but not vertical HIV type 1 transmission," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **23**(2), 198 (2007).
Ref Type: Journal
- ²⁴ M. Breloer and B. Fleischer, "CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis," *Trends Immunol* **29**(4), 186 (2008).
Ref Type: Journal
- ²⁵ J. M. Brenchley, *et al.*, "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection," *Nat. Med.* **12**(12), 1365 (2006).
Ref Type: Journal
- ²⁶ J. A. Briggs, *et al.*, "The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions," *Structure*. **14**(1), 15 (2006).
Ref Type: Journal
- ²⁷ P. Bulet, *et al.*, "Antimicrobial peptides in insects; structure and function," *Dev. Comp Immunol.* **23**(4-5), 329 (1999).
Ref Type: Journal
- ²⁸ S. E. Burastero, *et al.*, "Autoantibodies to CD4 in HIV type 1-exposed seronegative individuals," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**(4), 273 (1996).
Ref Type: Journal
- ²⁹ P. U. Cameron, *et al.*, "Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells," *Science* **257**(5068), 383 (1992).
Ref Type: Journal
- ³⁰ R. Cantin, S. Methot, and M. J. Tremblay, "Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses," *J. Virol.* **79**(11), 6577 (2005).
Ref Type: Journal
- ³¹ Y. Cao, *et al.*, "Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection," *N. Engl. J. Med.* **332**(4), 201 (1995).
Ref Type: Journal

- ³² Y. V. Chaly, *et al.*, "Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells," *Eur. Cytokine Netw.* **11**(2), 257 (2000).
Ref Type: Journal
- ³³ T. L. Chang, *et al.*, "CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from alpha-defensin-1 HIV inhibition," *J. Virol.* **77**(12), 6777 (2003).
Ref Type: Journal
- ³⁴ T. L. Chang and M. E. Klotman, "Defensins: natural anti-HIV peptides," *AIDS Rev* **6**(3), 161 (2004).
Ref Type: Journal
- ³⁵ T. L. Chang, *et al.*, "Dual role of alpha-defensin-1 in anti-HIV-1 innate immunity," *J Clin. Invest* **115**(3), 765 (2005).
Ref Type: Journal
- ³⁶ P. A. Charp, *et al.*, "Inhibition of protein kinase C by defensins, antibiotic peptides from human neutrophils," *Biochem. Pharmacol.* **37**(5), 951 (1988).
Ref Type: Journal
- ³⁷ O. Chertov, *et al.*, "Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils," *J Biol. Chem.* **271**(6), 2935 (1996).
Ref Type: Journal
- ³⁸ M. J. Churchill, *et al.*, "Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1 nef/long terminal repeat sequences in a cohort of long-term survivors infected from a single source," *J. Virol.* **80**(2), 1047 (2006).
Ref Type: Journal
- ³⁹ C. Cicala, *et al.*, "HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**(14), 9380 (2002).
Ref Type: Journal
- ⁴⁰ A. Ciuffi, *et al.*, "A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration," *Nat. Med.* **11**(12), 1287 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁴¹ A. M. Cole, "Innate host defense of human vaginal and cervical mucosae," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **306**, 199 (2006).
Ref Type: Journal
- ⁴² A. M. Cole and A. L. Cole, "Antimicrobial polypeptides are key anti-HIV-1 effector molecules of cervicovaginal host defense," *Am. J. Reprod.*

Immunol. **59**(1), 27 (2008).

Ref Type: Journal

- ⁴³ R. I. Connor, *et al.*, "Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals," *J. Exp. Med.* **185**(4), 621 (1997).
Ref Type: Journal
- ⁴⁴ K. A. Daher, M. E. Selsted, and R. I. Lehrer, "Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins," *J. Virol.* **60**(3), 1068 (1986).
Ref Type: Journal
- ⁴⁵ M. Dauer, *et al.*, "Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors," *J Immunol* **170**(8), 4069 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁴⁶ R. J. De Boer, *et al.*, "Turnover rates of B cells, T cells, and NK cells in simian immunodeficiency virus-infected and uninfected rhesus macaques," *J. Immunol.* **170**(5), 2479 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁴⁷ Santis C. De, *et al.*, "Human antibodies to immunodominant C5 region of HIV-1 gp120 cross-react with HLA class I on activated cells," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**(2), 157 (1994).
Ref Type: Journal
- ⁴⁸ N. J. Deacon, *et al.*, "Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients," *Science* **270**(5238), 988 (1995).
Ref Type: Journal
- ⁴⁹ M. Dean, *et al.*, "Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study," *Science* **273**(5283), 1856 (1996).
Ref Type: Journal
- ⁵⁰ S. G. Deeks and B. D. Walker, "Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy," *Immunity.* **27**(3), 406 (2007).
Ref Type: Journal
- ⁵¹ M. J. Dolan, *et al.*, "CCL3L1 and CCR5 influence cell-mediated immunity and affect HIV-AIDS pathogenesis via viral entry-independent mechanisms," *Nat. Immunol.* **8**(12), 1324 (2007).
Ref Type: Journal
- ⁵² D. C. Douek, *et al.*, "HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells," *Nature* **417**(6884), 95 (2002).
Ref Type: Journal

- ⁵³ D. C. Douek, L. J. Picker, and R. A. Koup, "T cell dynamics in HIV-1 infection," *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 265 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁵⁴ D. M. Eckert and P. S. Kim, "Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition," *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 777 (2001).
Ref Type: Journal
- ⁵⁵ B. Emu, *et al.*, "Phenotypic, functional, and kinetic parameters associated with apparent T-cell control of human immunodeficiency virus replication in individuals with and without antiretroviral treatment," *J. Virol.* **79**(22), 14169 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁵⁶ X. M. Fang, *et al.*, "Differential expression of alpha- and beta-defensins in human peripheral blood," *Eur. J. Clin. Invest* **33**(1), 82 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁵⁷ A. S. Fauci, "25 years of HIV," *Nature* **453**(7193), 289 (2008).
Ref Type: Journal
- ⁵⁸ J. Fellay, *et al.*, "A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1," *Science* **317**(5840), 944 (2007).
Ref Type: Journal
- ⁵⁹ A. Fernandez-Sesma, *et al.*, "Influenza virus evades innate and adaptive immunity via the NS1 protein," *J. Virol.* **80**(13), 6295 (2006).
Ref Type: Journal
- ⁶⁰ A. P. Fields, *et al.*, "Human immunodeficiency virus induces phosphorylation of its cell surface receptor," *Nature* **333**(6170), 278 (1988).
Ref Type: Journal
- ⁶¹ J. M. Folkvord, C. Armon, and E. Connick, "Lymphoid follicles are sites of heightened human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication and reduced antiretroviral effector mechanisms," *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **21**(5), 363 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁶² J. M. Folkvord, *et al.*, "alpha-Defensins 1, 2, and 3 are expressed by granulocytes in lymphoid tissues of HIV-1-seropositive and -seronegative individuals," *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **42**(5), 529 (2006).
Ref Type: Journal
- ⁶³ A. D. Frankel and J. A. Young, "HIV-1: fifteen proteins and an RNA," *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1 (1998).
Ref Type: Journal
- ⁶⁴ T. C. Friedrich, *et al.*, "Subdominant CD8+ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication," *J. Virol.* **81**(7), 3465

(2007).
Ref Type: Journal

- ⁶⁵ N. Funderburg, *et al.*, "Human α -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**(47), 18631 (2007).
Ref Type: Journal
- ⁶⁶ L. Furci, *et al.*, " α -defensins block the early steps of HIV-1 infection: interference with the binding of gp120 to CD4," *Blood* (2006).
Ref Type: Journal
- ⁶⁷ T. Ganz, "Extracellular release of antimicrobial defensins by human polymorphonuclear leukocytes," *Infect. Immun.* **55**(3), 568 (1987).
Ref Type: Journal
- ⁶⁸ T. Ganz, "Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity," *Nat. Rev. Immunol.* **3**(9), 710 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁶⁹ T. Ganz and R. I. Lehrer, "Antimicrobial peptides of vertebrates," *Curr. Opin. Immunol.* **10**(1), 41 (1998).
Ref Type: Journal
- ⁷⁰ T. Ganz, *et al.*, "Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils," *J Clin. Invest* **76**(4), 1427 (1985).
Ref Type: Journal
- ⁷¹ F. Garcia, *et al.*, "Therapeutic immunization with dendritic cells loaded with heat-inactivated autologous HIV-1 in patients with chronic HIV-1 infection," *J Infect. Dis.* **191**(10), 1680 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁷² J. E. Garrus, *et al.*, "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding," *Cell* **107**(1), 55 (2001).
Ref Type: Journal
- ⁷³ H. R. Gelderblom, M. Ozel, and G. Pauli, "Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations," *Arch. Virol.* **106**(1-2), 1 (1989).
Ref Type: Journal
- ⁷⁴ D. Ghosh, *et al.*, "Paneth cell trypsin is the processing enzyme for human defensin-5," *Nat. Immunol.* **3**(6), 583 (2002).
Ref Type: Journal
- ⁷⁵ J. V. Giorgi, *et al.*, "Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage," *J. Infect. Dis.* **179**(4), 859 (1999).
Ref Type: Journal

- ⁷⁶ E. Gonzalez, *et al.*, "The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility," *Science* **307**(5714), 1434 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁷⁷ J. Goudsmit, *et al.*, "Naturally HIV-1 seroconverters with lowest viral load have best prognosis, but in time lose control of viraemia," *AIDS* **16**(5), 791 (2002).
Ref Type: Journal
- ⁷⁸ A. Grakoui, *et al.*, "HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help," *Science* **302**(5645), 659 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁷⁹ A. Granelli-Piperno, *et al.*, "Virus replication begins in dendritic cells during the transmission of HIV-1 from mature dendritic cells to T cells," *Curr. Biol.* **9**(1), 21 (1999).
Ref Type: Journal
- ⁸⁰ R. H. Gray, *et al.*, "Increased risk of incident HIV during pregnancy in Rakai, Uganda: a prospective study," *Lancet* **366**(9492), 1182 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁸¹ R. H. Gray, *et al.*, "Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda," *Lancet* **357**(9263), 1149 (2001).
Ref Type: Journal
- ⁸² J. Grigat, *et al.*, "Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family," *J Immunol* **179**(6), 3958 (2007).
Ref Type: Journal
- ⁸³ M. Groth, *et al.*, "High-resolution mapping of the 8p23.1 beta-defensin cluster reveals strictly concordant copy number variation of all genes," *Hum. Mutat.* **29**(10), 1247 (2008).
Ref Type: Journal
- ⁸⁴ P. Guermonprez, *et al.*, "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells," *Annu. Rev Immunol* **20**, 621 (2002).
Ref Type: Journal
- ⁸⁵ C. J. Guo, *et al.*, "Alpha-defensins inhibit HIV infection of macrophages through upregulation of CC-chemokines," *AIDS* **18**(8), 1217 (2004).
Ref Type: Journal
- ⁸⁶ A. T. Haase, "Perils at mucosal front lines for HIV and SIV and their hosts," *Nat. Rev. Immunol.* **5**(10), 783 (2005).
Ref Type: Journal

- ⁸⁷ A. Harari, *et al.*, "Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy," *Blood* **103**(3), 966 (2004).
Ref Type: Journal
- ⁸⁸ B. F. Haynes, *et al.*, "Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies," *Science* **308**(5730), 1906 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁸⁹ B. F. Haynes, *et al.*, "Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: a hypothesis," *Hum. Antibodies* **14**(3-4), 59 (2005).
Ref Type: Journal
- ⁹⁰ M. Hein, *et al.*, "Antimicrobial factors in the cervical mucus plug," *Am. J. Obstet. Gynecol.* **187**(1), 137 (2002).
Ref Type: Journal
- ⁹¹ C. P. Hill, *et al.*, "Crystal structure of defensin HNP-3, an amphiphilic dimer: mechanisms of membrane permeabilization," *Science* **251**(5000), 1481 (1991).
Ref Type: Journal
- ⁹² J. A. Hoffmann, *et al.*, "Phylogenetic perspectives in innate immunity," *Science* **284**(5418), 1313 (1999).
Ref Type: Journal
- ⁹³ D. M. Hoover, O. Chertov, and J. Lubkowski, "The structure of human beta-defensin-1: new insights into structural properties of beta-defensins," *J. Biol. Chem.* **276**(42), 39021 (2001).
Ref Type: Journal
- ⁹⁴ D. M. Hoover, *et al.*, "The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization," *J. Biol. Chem.* **275**(42), 32911 (2000).
Ref Type: Journal
- ⁹⁵ Q. Hu, *et al.*, "Blockade of attachment and fusion receptors inhibits HIV-1 infection of human cervical tissue," *J. Exp. Med.* **199**(8), 1065 (2004).
Ref Type: Journal
- ⁹⁶ J. B. Hubert, *et al.*, "Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group," *AIDS* **14**(2), 123 (2000).
Ref Type: Journal
- ⁹⁷ G. Hutter, *et al.*, "Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation," *N. Engl. J. Med.* **360**(7), 692 (2009).
Ref Type: Journal

- ⁹⁸ A. Izaguirre, *et al.*, "Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells," *J. Leukoc. Biol.* **74**(6), 1125 (2003).
Ref Type: Journal
- ⁹⁹ N. Izquierdo-Useros, *et al.*, "Capture and transfer of HIV-1 particles by mature dendritic cells converges with the exosome-dissemination pathway," *Blood* **113**(12), 2732 (2009).
Ref Type: Journal
- ¹⁰⁰ G. B. Karlsson Hedestam, *et al.*, "The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus," *Nat. Rev. Microbiol.* **6**(2), 143 (2008).
Ref Type: Journal
- ¹⁰¹ D. E. Kaufmann, *et al.*, "Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction," *Nat. Immunol.* **8**(11), 1246 (2007).
Ref Type: Journal
- ¹⁰² A. A. Khine, *et al.*, "Human neutrophil peptides induce interleukin-8 production through the P2Y6 signaling pathway," *Blood* **107**(7), 2936 (2006).
Ref Type: Journal
- ¹⁰³ P. Kiepiela, *et al.*, "Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA," *Nature* **432**(7018), 769 (2004).
Ref Type: Journal
- ¹⁰⁴ C. Kim, *et al.*, "Human alpha-defensins neutralize toxins of the mono-ADP-ribosyltransferase family," *Biochem. J.* **399**(2), 225 (2006).
Ref Type: Journal
- ¹⁰⁵ A. E. King, H. O. Critchley, and R. W. Kelly, "Innate immune defences in the human endometrium," *Reprod. Biol. Endocrinol.* **1**, 116 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹⁰⁶ A. E. King, *et al.*, "Differential expression of the natural antimicrobials, beta-defensins 3 and 4, in human endometrium," *J. Reprod. Immunol.* **59**(1), 1 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹⁰⁷ A. E. King, *et al.*, "Innate immune defences in the human uterus during pregnancy," *Placenta* **28**(11-12), 1099 (2007).
Ref Type: Journal
- ¹⁰⁸ M. M. Kitahata, *et al.*, "Effect of Early versus Deferred Antiretroviral Therapy for HIV on Survival," *N. Engl. J. Med.* (2009).
Ref Type: Journal

- ¹⁰⁹ M. E. Klotman and T. L. Chang, "Defensins in innate antiviral immunity," *Nat Rev Immunol* **6**(6), 447 (2006).
Ref Type: Journal
- ¹¹⁰ J. A. Kovacs, *et al.*, "Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV," *J. Exp. Med.* **194**(12), 1731 (2001).
Ref Type: Journal
- ¹¹¹ O. Lambotte, *et al.*, "HIV controllers: a homogeneous group of HIV-1-infected patients with spontaneous control of viral replication," *Clin. Infect. Dis.* **41**(7), 1053 (2005).
Ref Type: Journal
- ¹¹² A. W. Lee, *et al.*, "A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy," *Vaccine* **20 Suppl 4**, A8-A22 (2002).
Ref Type: Journal
- ¹¹³ J. J. Lefrere, *et al.*, "Even individuals considered as long-term nonprogressors show biological signs of progression after 10 years of human immunodeficiency virus infection," *Blood* **90**(3), 1133 (1997).
Ref Type: Journal
- ¹¹⁴ R. I. Lehrer, "Multispecific myeloid defensins," *Curr. Opin. Hematol.* **14**(1), 16 (2007).
Ref Type: Journal
- ¹¹⁵ R. I. Lehrer, *et al.*, "Interaction of human defensins with *Escherichia coli*. Mechanism of bactericidal activity," *J. Clin. Invest* **84**(2), 553 (1989).
Ref Type: Journal
- ¹¹⁶ R. I. Lehrer, T. Ganz, and M. E. Selsted, "Oxygen-independent bactericidal systems. Mechanisms and disorders," *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **2**(1), 159 (1988).
Ref Type: Journal
- ¹¹⁷ R. I. Lehrer, *et al.*, "Antibacterial activity of microbicidal cationic proteins 1 and 2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages," *Infect. Immun.* **42**(1), 10 (1983).
Ref Type: Journal
- ¹¹⁸ B. Leon, M. Lopez-Bravo, and C. Ardavin, "Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*," *Immunity.* **26**(4), 519 (2007).
Ref Type: Journal
- ¹¹⁹ N. L. Letvin, "Correlates of immune protection and the development of a human immunodeficiency virus vaccine," *Immunity.* **27**(3), 366

(2007).
Ref Type: Journal

- ¹²⁰ P. Levinson, *et al.*, "Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition," *AIDS* **23**(3), 309 (2009).
Ref Type: Journal
- ¹²¹ R. Linzmeier, *et al.*, "The structure of neutrophil defensin genes," *FEBS Lett.* **321**(2-3), 267 (1993).
Ref Type: Journal
- ¹²² R. M. Linzmeier and T. Ganz, "Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23," *Genomics* **86**(4), 423 (2005).
Ref Type: Journal
- ¹²³ R. M. Linzmeier and T. Ganz, "Copy number polymorphisms are not a common feature of innate immune genes," *Genomics* **88**(1), 122 (2006).
Ref Type: Journal
- ¹²⁴ Y. J. Liu, "Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity," *Cell* **106**(3), 259 (2001).
Ref Type: Journal
- ¹²⁵ C. B. Lopez, *et al.*, "Type I interferon induction pathway, but not released interferon, participates in the maturation of dendritic cells induced by negative-strand RNA viruses," *J. Infect. Dis.* **187**(7), 1126 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹²⁶ K. Lore, *et al.*, "Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells," *J. Exp. Med.* **201**(12), 2023 (2005).
Ref Type: Journal
- ¹²⁷ C. E. Mackewicz, *et al.*, "alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors," *AIDS* **17**(14), F23-F32 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹²⁸ A. Maemoto, *et al.*, "Functional analysis of the alpha-defensin disulfide array in mouse cryptdin-4," *J. Biol. Chem.* **279**(42), 44188 (2004).
Ref Type: Journal
- ¹²⁹ H. L. Martin, *et al.*, "Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition," *J. Infect. Dis.* **180**(6), 1863 (1999).
Ref Type: Journal

- 130 M. P. Martin, *et al.*, "Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5," *Science* **282**(5395), 1907 (1998).
Ref Type: Journal
- 131 M. P. Martin, *et al.*, "Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA-B delays the progression to AIDS," *Nat. Genet.* **31**(4), 429 (2002).
Ref Type: Journal
- 132 M. P. Martin, *et al.*, "Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1," *Nat. Genet.* **39**(6), 733 (2007).
Ref Type: Journal
- 133 J. Martin-Serrano, T. Zang, and P. D. Bieniasz, "HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress," *Nat. Med.* **7**(12), 1313 (2001).
Ref Type: Journal
- 134 J. Martin-Serrano, T. Zang, and P. D. Bieniasz, "Role of ESCRT-I in retroviral budding," *J. Virol.* **77**(8), 4794 (2003).
Ref Type: Journal
- 135 J. R. Mascola, "HIV/AIDS: allied responses," *Nature* **449**(7158), 29 (2007).
Ref Type: Journal
- 136 J. R. Mascola, *et al.*, "Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies," *J. Virol.* **73**(5), 4009 (1999).
Ref Type: Journal
- 137 D. McIlroy, *et al.*, "Infection frequency of dendritic cells and CD4+ T lymphocytes in spleens of human immunodeficiency virus-positive patients," *J. Virol.* **69**(8), 4737 (1995).
Ref Type: Journal
- 138 J. A. McKeating and R. L. Willey, "Structure and function of the HIV envelope," *AIDS* **3 Suppl 1**, S35-S41 (1989).
Ref Type: Journal
- 139 A. S. McWilliam, *et al.*, "Dendritic cells are recruited into the airway epithelium during the inflammatory response to a broad spectrum of stimuli," *J Exp. Med* **184**(6), 2429 (1996).
Ref Type: Journal
- 140 A. S. McWilliam, *et al.*, "Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces," *J Exp. Med* **179**(4), 1331 (1994).
Ref Type: Journal
- 141 R. Medzhitov and C. A. Janeway, Jr., "Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition," *Cell* **91**(3), 295 (1997).
Ref Type: Journal

- ¹⁴² S. Mehandru, *et al.*, "Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract," *J. Exp. Med.* **200**(6), 761 (2004).
Ref Type: Journal
- ¹⁴³ S. A. Migueles, *et al.*, "The differential ability of HLA B*5701+ long-term nonprogressors and progressors to restrict human immunodeficiency virus replication is not caused by loss of recognition of autologous viral gag sequences," *J. Virol.* **77**(12), 6889 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹⁴⁴ S. A. Migueles, *et al.*, "HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors," *Nat. Immunol.* **3**(11), 1061 (2002).
Ref Type: Journal
- ¹⁴⁵ S. A. Migueles, *et al.*, "HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**(6), 2709 (2000).
Ref Type: Journal
- ¹⁴⁶ M. Milanese, *et al.*, "Copy number variation of defensin genes and HIV infection in Brazilian children," *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **50**(3), 331 (2009).
Ref Type: Journal
- ¹⁴⁷ R. H. Miller and N. Sarver, "HIV accessory proteins as therapeutic targets," *Nat. Med.* **3**(4), 389 (1997).
Ref Type: Journal
- ¹⁴⁸ R. S. Mitchell, *et al.*, "Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences," *PLoS. Biol.* **2**(8), E234 (2004).
Ref Type: Journal
- ¹⁴⁹ H. Mohri, *et al.*, "Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy," *J. Exp. Med.* **194**(9), 1277 (2001).
Ref Type: Journal
- ¹⁵⁰ S. E. Msuya, *et al.*, "Reproductive tract infections and the risk of HIV among women in Moshi, Tanzania," *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **81**(9), 886 (2002).
Ref Type: Journal
- ¹⁵¹ A. Munoz, *et al.*, "Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes," *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **8**(5), 496 (1995).
Ref Type: Journal

- 152 H. Nakashima, *et al.*, "Defensins inhibit HIV replication in vitro," *AIDS* **7**(8), 1129 (1993).
Ref Type: Journal
- 153 S. Nekhai and K. T. Jeang, "Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev," *Future. Microbiol.* **1**, 417 (2006).
Ref Type: Journal
- 154 T. R. O'Brien, *et al.*, "Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study," *JAMA* **276**(2), 105 (1996).
Ref Type: Journal
- 155 T. Okazaki, *et al.*, "Plasma levels of alpha-defensins 1-3 are an indicator of neutrophil activation in pregnant and post-partum women," *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **33**(5), 645 (2007).
Ref Type: Journal
- 156 R. Pacheco, *et al.*, "Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation," *J Immunol* **177**(10), 6695 (2006).
Ref Type: Journal
- 157 K. Palucka and J. Banchereau, "How dendritic cells and microbes interact to elicit or subvert protective immune responses," *Curr. Opin. Immunol* **14**(4), 420 (2002).
Ref Type: Journal
- 158 G. Pantaleo, *et al.*, "Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection," *N. Engl. J. Med.* **332**(4), 209 (1995).
Ref Type: Journal
- 159 A. V. Panyutich, *et al.*, "Plasma defensin concentrations are elevated in patients with septicemia or bacterial meningitis," *J. Lab Clin. Med.* **122**(2), 202 (1993).
Ref Type: Journal
- 160 A. Pardi, *et al.*, "NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1," *Biochemistry* **31**(46), 11357 (1992).
Ref Type: Journal
- 161 A. Pichlmair and Reis e Sousa, "Innate recognition of viruses," *Immunity.* **27**(3), 370 (2007).
Ref Type: Journal
- 162 E. J. Platt, J. P. Durnin, and D. Kabat, "Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus," *J. Virol.* **79**(7), 4347 (2005).
Ref Type: Journal

- ¹⁶³ M. Pope, *et al.*, "Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1," *Cell* **78**(3), 389 (1994).
Ref Type: Journal
- ¹⁶⁴ M. Pope and A. T. Haase, "Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection," *Nat. Med.* **9**(7), 847 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹⁶⁵ E. Porter, *et al.*, "Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions," *Infect. Immun.* **73**(8), 4823 (2005).
Ref Type: Journal
- ¹⁶⁶ E. M. Porter, *et al.*, "Localization of human intestinal defensin 5 in Paneth cell granules," *Infect. Immun.* **65**(6), 2389 (1997).
Ref Type: Journal
- ¹⁶⁷ C. M. Prazma and T. F. Tedder, "Dendritic cell CD83: a therapeutic target or innocent bystander?," *Immunol Lett.* **115**(1), 1 (2008).
Ref Type: Journal
- ¹⁶⁸ Y. Qi, *et al.*, "KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections," *PLoS. Pathog.* **2**(8), e79 (2006).
Ref Type: Journal
- ¹⁶⁹ M. E. Quinones-Mateu, *et al.*, "Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication," *AIDS* **17**(16), F39-F48 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹⁷⁰ B. Ramratnam, *et al.*, "Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis," *Lancet* **354**(9192), 1782 (1999).
Ref Type: Journal
- ¹⁷¹ G. J. Randolph, C. Jakubzick, and C. Qu, "Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells," *Curr. Opin. Immunol* **20**(1), 52 (2008).
Ref Type: Journal
- ¹⁷² G. J. Randolph, J. Ochando, and S. Partida-Sanchez, "Migration of dendritic cell subsets and their precursors," *Annu. Rev Immunol* **26**, 293 (2008).
Ref Type: Journal
- ¹⁷³ N. Ray and R. W. Doms, "HIV-1 coreceptors and their inhibitors," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **303**, 97 (2006).
Ref Type: Journal

- 174 C. R. Rinaldo, "Dendritic cell-based human immunodeficiency virus vaccine," *J. Intern. Med.* **265**(1), 138 (2009).
Ref Type: Journal
- 175 K. L. Rock and A. L. Goldberg, "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides," *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 739 (1999).
Ref Type: Journal
- 176 K. L. Rock and L. Shen, "Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance," *Immunol. Rev.* **207**, 166 (2005).
Ref Type: Journal
- 177 B. Rodes, *et al.*, "Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection," *AIDS* **18**(8), 1109 (2004).
Ref Type: Journal
- 178 M. Rodriguez-Garcia, *et al.*, "Impact of alpha-defensins 1-3 on the maturation and differentiation of human monocyte-derived DCs. Concentration-dependent opposite dual effects," *Clin. Immunol.* (2009).
Ref Type: Journal
- 179 M. Rodriguez-Garcia, *et al.*, "Human immature monocyte-derived dendritic cells produce and secrete alpha-defensins 1-3," *J Leukoc. Biol.* **82**(5), 1143 (2007).
Ref Type: Journal
- 180 J. F. Roeth and K. L. Collins, "Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**(2), 548 (2006).
Ref Type: Journal
- 181 A. Saez-Cirion, *et al.*, "HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **104**(16), 6776 (2007).
Ref Type: Journal
- 182 F. Sallusto, *et al.*, "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products," *J. Exp. Med.* **182**(2), 389 (1995).
Ref Type: Journal
- 183 M. Salvatore, *et al.*, "alpha-Defensin inhibits influenza virus replication by cell-mediated mechanism(s)," *J Infect. Dis.* **196**(6), 835 (2007).
Ref Type: Journal
- 184 T. M. Schaefer, *et al.*, "IL-1beta-mediated proinflammatory responses are inhibited by estradiol via down-regulation of IL-1 receptor type I in

uterine epithelial cells," J. Immunol. **175**(10), 6509 (2005).
Ref Type: Journal

- ¹⁸⁵ J. F. Scheid, *et al.*, "Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals," Nature **458**(7238), 636 (2009).
Ref Type: Journal
- ¹⁸⁶ U. Scherdin, K. Rhodes, and M. Breindl, "Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration," J. Virol. **64**(2), 907 (1990).
Ref Type: Journal
- ¹⁸⁷ M. Schindler, *et al.*, "Nef-mediated suppression of T cell activation was lost in a lentiviral lineage that gave rise to HIV-1," Cell **125**(6), 1055 (2006).
Ref Type: Journal
- ¹⁸⁸ B. Schmidt, *et al.*, "Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy," J. Clin. Immunol. **26**(1), 55 (2006).
Ref Type: Journal
- ¹⁸⁹ A. R. Schroder, *et al.*, "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots," Cell **110**(4), 521 (2002).
Ref Type: Journal
- ¹⁹⁰ B. C. Schutte and P. B. McCray, Jr., "[beta]-defensins in lung host defense," Annu. Rev. Physiol **64**, 709 (2002).
Ref Type: Journal
- ¹⁹¹ B. C. Schutte, *et al.*, "Discovery of five conserved beta -defensin gene clusters using a computational search strategy," Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **99**(4), 2129 (2002).
Ref Type: Journal
- ¹⁹² E. Schutyser, S. Struyf, and J. Van Damme, "The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6," Cytokine Growth Factor Rev. **14**(5), 409 (2003).
Ref Type: Journal
- ¹⁹³ S. A. Seibert, *et al.*, "Natural selection on the gag, pol, and env genes of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1)," Mol. Biol. Evol. **12**(5), 803 (1995).
Ref Type: Journal
- ¹⁹⁴ M. E. Selsted and S. S. Harwig, "Determination of the disulfide array in the human defensin HNP-2. A covalently cyclized peptide," J. Biol. Chem. **264**(7), 4003 (1989).
Ref Type: Journal

- 195 R. J. Shattock and J. P. Moore, "Inhibiting sexual transmission of HIV-1 infection," *Nat. Rev. Microbiol.* **1**(1), 25 (2003).
Ref Type: Journal
- 196 H. W. Sheppard, *et al.*, "The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels," *AIDS* **7**(9), 1159 (1993).
Ref Type: Journal
- 197 R. Shibata, *et al.*, "Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys," *Nat. Med.* **5**(2), 204 (1999).
Ref Type: Journal
- 198 V. Simon and D. D. Ho, "HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy," *Nat. Rev. Microbiol.* **1**(3), 181 (2003).
Ref Type: Journal
- 199 V. Simon, D. D. Ho, and Karim Q. Abdool, "HIV/AIDS epidemiology, pathogenesis, prevention, and treatment," *Lancet* **368**(9534), 489 (2006).
Ref Type: Journal
- 200 P. K. Singh, *et al.*, "Production of beta-defensins by human airway epithelia," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**(25), 14961 (1998).
Ref Type: Journal
- 201 A. Smed-Sorensen, *et al.*, "Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells," *J. Virol.* **79**(14), 8861 (2005).
Ref Type: Journal
- 202 O. Soehnlein, *et al.*, "Neutrophil secretion products regulate anti-bacterial activity in monocytes and macrophages," *Clin. Exp. Immunol.* **151**(1), 139 (2008).
Ref Type: Journal
- 203 R. S. Sparkes, *et al.*, "Assignment of defensin gene(s) to human chromosome 8p23," *Genomics* **5**(2), 240 (1989).
Ref Type: Journal
- 204 R. M. Steinman, *et al.*, "The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **276**, 1 (2003).
Ref Type: Journal
- 205 R. M. Steinman and H. Hemmi, "Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity," *Curr. Top. Microbiol. Immunol* **311**, 17 (2006).
Ref Type: Journal
- 206 T. R. Sterling, *et al.*, "Sex differences in longitudinal human immunodeficiency virus type 1 RNA levels among seroconverters,"

- J. Infect. Dis. **180**(3), 666 (1999).
Ref Type: Journal
- ²⁰⁷ F. Syeda, *et al.*, "Differential signaling mechanisms of HNP-induced IL-8 production in human lung epithelial cells and monocytes," J Cell Physiol **214**(3), 820 (2008).
Ref Type: Journal
- ²⁰⁸ Y. Q. Tang and M. E. Selsted, "Characterization of the disulfide motif in BNBD-12, an antimicrobial beta-defensin peptide from bovine neutrophils," J. Biol. Chem. **268**(9), 6649 (1993).
Ref Type: Journal
- ²⁰⁹ M. C. Territo, *et al.*, "Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils," J Clin. Invest **84**(6), 2017 (1989).
Ref Type: Journal
- ²¹⁰ D. Trabattoni, *et al.*, "Human alpha defensin in HIV-exposed but uninfected individuals," J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. **35**(5), 455 (2004).
Ref Type: Journal
- ²¹¹ F. Turlure, *et al.*, "A tripartite DNA-binding element, comprised of the nuclear localization signal and two AT-hook motifs, mediates the association of LEDGF/p75 with chromatin in vivo," Nucleic Acids Res. **34**(5), 1653 (2006).
Ref Type: Journal
- ²¹² R. Vaschetto, *et al.*, "Role of human neutrophil peptides in the initial interaction between lung epithelial cells and CD4+ lymphocytes," J Leukoc. Biol. **81**(4), 1022 (2007).
Ref Type: Journal
- ²¹³ P. L. Vernazza, *et al.*, "Sexual transmission of HIV: infectiousness and prevention," AIDS **13**(2), 155 (1999).
Ref Type: Journal
- ²¹⁴ W. Wang, *et al.*, "Retrocyclins kill bacilli and germinating spores of Bacillus anthracis and inactivate anthrax lethal toxin," J. Biol. Chem. **281**(43), 32755 (2006).
Ref Type: Journal
- ²¹⁵ W. Wang, *et al.*, "Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1," J. Immunol. **173**(1), 515 (2004).
Ref Type: Journal
- ²¹⁶ X. Wei, *et al.*, "Antibody neutralization and escape by HIV-1," Nature **422**(6929), 307 (2003).
Ref Type: Journal
- ²¹⁷ T. Wilk and S. D. Fuller, "Towards the structure of the human immunodeficiency virus: divide and conquer," Curr. Opin. Struct.

Biol. **9**(2), 231 (1999).
Ref Type: Journal

- ²¹⁸ C. Winkler, *et al.*, "Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC)," *Science* **279**(5349), 389 (1998).
Ref Type: Journal
- ²¹⁹ C. R. Wira and J. V. Fahey, "A new strategy to understand how HIV infects women: identification of a window of vulnerability during the menstrual cycle," *AIDS* **22**(15), 1909 (2008).
Ref Type: Journal
- ²²⁰ C. R. Wira, *et al.*, "Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions," *Immunol. Rev.* **206**, 306 (2005).
Ref Type: Journal
- ²²¹ L. Wu and V. N. KewalRamani, "Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination," *Nat. Rev. Immunol.* **6**(11), 859 (2006).
Ref Type: Journal
- ²²² Z. Wu, *et al.*, "Engineering disulfide bridges to dissect antimicrobial and chemotactic activities of human beta-defensin 3," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**(15), 8880 (2003).
Ref Type: Journal
- ²²³ D. Yang, *et al.*, "Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense," *Annu. Rev Immunol* **22**, 181 (2004).
Ref Type: Journal
- ²²⁴ D. Yang, *et al.*, "Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells," *J Leukoc. Biol.* **68**(1), 9 (2000).
Ref Type: Journal
- ²²⁵ D. Yang, *et al.*, "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6," *Science* **286**(5439), 525 (1999).
Ref Type: Journal
- ²²⁶ G. Zandman-Goddard and Y. Shoenfeld, "HIV and autoimmunity," *Autoimmun. Rev.* **1**(6), 329 (2002).
Ref Type: Journal
- ²²⁷ W. Zapata, *et al.*, "Increased levels of human beta-defensins mRNA in sexually HIV-1 exposed but uninfected individuals," *Curr. HIV. Res.* **6**(6), 531 (2008).
Ref Type: Journal

- ²²⁸ L. Zhang, *et al.*, "Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor," *Science* **298**(5595), 995 (2002).
Ref Type: Journal
- ²²⁹ X. L. Zhang, M. E. Selsted, and A. Pardi, "NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 1. Resonance assignment and secondary structure determination of rabbit NP-2 and human HNP-1," *Biochemistry* **31**(46), 11348 (1992).
Ref Type: Journal
- ²³⁰ T. Zhu, *et al.*, "Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection," *Science* **261**(5125), 1179 (1993).
Ref Type: Journal
- ²³¹ G. R. Zimmermann, *et al.*, "Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins," *Biochemistry* **34**(41), 13663 (1995).
Ref Type: Journal
- ²³² S. Zolla-Pazner, "Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies," *Nat. Rev. Immunol.* **4**(3), 199 (2004).
Ref Type: Journal