

## Papel del Virus de la Inmunodeficiencia Humana en la apoptosis de leucocitos de pacientes infectados.

*Siham Salmen<sup>1</sup>, Carolina Guillermo<sup>1</sup>, Melisa Colmenares<sup>1</sup>, Luisa Barboza<sup>1</sup>, Loredana Goncalves<sup>1</sup>, Guillermo Terán<sup>1</sup>, Nacarid Alfonso<sup>1</sup>, Henry Montes<sup>2</sup> y Lisbeth Berrueta<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina y <sup>2</sup>CAMIULA. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Correo electrónico: lberruet@ula.edu.ve; idicula@telcel.net.ve

Palabras clave: Neutrófilos, apoptosis, linfocitos, MAPK, VIH, Fas, FasL.

**Resumen.** La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se caracteriza por el deterioro progresivo de la respuesta inmune, asociado a una pérdida gradual de los elementos que la generan, especialmente de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Aunque los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son el principal blanco del virus, en la actualidad existe gran interés por el estudio de otros elementos celulares, que se encuentran alterados y que contribuyen al deterioro del paciente. Dentro de este grupo de células se encuentran los polimorfonucleares (PMN), células fundamentales en la defensa innata contra el VIH y cuya función está alterada en el curso de la enfermedad. Probablemente la causa de este deterioro se debe, en parte, a un incremento en su susceptibilidad para sufrir apoptosis espontánea; sin embargo, no han sido dilucidados los mecanismos involucrados en generar muerte celular programada en los neutrófilos de pacientes VIH positivos. En trabajos previos, nosotros hemos explorado algunos eventos asociados con la muerte de los neutrófilos de pacientes infectados. Este artículo tiene como objetivo principal profundizar los eventos involucrados en la apoptosis espontánea e inducida vía Fas, que pudieran estar implicados en el deterioro de los PMN durante la infección por el VIH.

## Role of Human Immunodeficiency Virus in leukocytes apoptosis from infected patients.

*Invest Clín 2005; 46(3):*

Key words: Neutrophils, lymphocytes, apoptosis, MAPK, leukocytes, Fas, FasL, HIV

**Abstract.** The hallmark of the immunodeficiency virus infection is a progressive detriment of the immune response which has been associated to a gradual loss of its responsible components, in particular, CD4 positive T cells. Although this cell population is considered the main target of the virus, there is a recent deal of interest in studying other components that may not be targets of the virus, but are important elements to control infectious microorganisms and that have been demonstrated to be altered during HIV infection. Neutrophils (PMN) are innate immune components that play a fundamental role against HIV infection and these cells has been described as functionally altered during AIDS. It has been suggested that such a dysfunction could be attributed to an increased susceptibility of these cells to accelerated spontaneous apoptosis. However, the underlying mechanisms to induce programmed cell death of neutrophils remain unknown. In previous work we have explored some events involved during cell death of neutrophils from HIV infected patients. It is the purpose of this work to review the current knowledge of apoptosis signals in neutrophils and to discuss our own data about some mechanisms involved in spontaneous and Fas mediated apoptosis, which may contribute to understand neutrophils dysfunction during HIV infection.

*Recibido: 11-10-2004. Aceptado: 20-02-2005.*

### INTRODUCCIÓN

Se estima que 60 millones de personas en el mundo están infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (1). El VIH es el agente infeccioso más estudiado de la historia; desde su descripción durante los años 80, ha generado diversidad de publicaciones en todos los campos de la ciencia, estudios que han permitido entender cómo el virus infecta a la célula blanco y cuál es su ciclo de replicación, conocimientos que han hecho posible el desarrollo de estrategias terapéuticas para su control y así minimizar su diseminación (2).

A pesar de contar con la terapia anti-retroviral altamente efectiva (TAAE), no todos los individuos infectados tienen acceso a ella y en los casos de países con mayor disponibilidad de recursos, se presentan obstáculos debido a la emergencia de cepas resistentes (2). Paralelo a esto no siempre son efectivas, son tóxicas y no eliminan al virus de los reservorios (3), lo que ha dificultado el control de la infección.

Durante la historia natural de la infección, el individuo cursa con una fase aguda/primaria seguida por una fase de latencia entre 3-10 años, que conduce finalmente a un colapso del sistema inmune que caracteriza al SIDA (1). La infección aguda es el resultado del paso exitoso del virus a tra-

vés de las mucosas mediante transitis a través de las células epiteliales (4) y que luego es capturado por las células dendríticas (CD) de las mucosas, principalmente a través del receptor DC-SIGN, que puede mediar dos eventos: la *internalización* e infección de las CD y *transferencia viral* (con o sin infección de las CD) a los linfocitos T que expresan CD4/CCR5<sup>+</sup> (siendo ésta la forma más eficiente de infección de las células T CD4<sup>+</sup>) (5, 6). La interacción T-CD puede dar como resultado la formación de sincitio entre una CD y múltiples linfocitos, conduciendo a una producción mayor de virus que la generada por cualquier población de célula individual (7, 8); esta transferencia viral puede ocurrir tanto en los nódulos linfáticos como en la piel o la mucosa (5).

La infección por VIH usualmente conduce a la alteración funcional y declinación numérica de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, lo que conlleva al desarrollo del SIDA, y como consecuencia, a la aparición de infecciones oportunistas y la muerte del individuo. A pesar de múltiples estudios, todavía existen muchas lagunas sobre los mecanismos utilizados por el virus para mediar la muerte de las células linfoides (9, 10). Reportes recientes indican que la pérdida progresiva de las poblaciones de CD4 es debido a una inapropiada producción a nivel del timo, relocalización de los linfocitos virus-específicos en los órganos linfoides y alteración en la homeostasis entre la proliferación y muerte celular por apoptosis, siendo este último mecanismo uno de los principales eventos que conduce a la destrucción de las células del sistema inmune y a la progresión hacia la fase de SIDA (11). Así, la muerte celular acelerada activada por el virus o sus componentes, es considerada como clave en la declinación progresiva de las células del sistema inmune, por lo que dedicaremos especial atención a los mecanismos que utiliza el virus para modular la apoptosis y así conducir a la disfunción no sólo de los elemen-

tos de la inmunidad adquirida, sino también a una parte importante de componentes de la inmunidad innata, los neutrófilos.

#### APOPTOSIS: EFECTO MODULATORIO EJERCIDO POR EL VIH

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico altamente controlado y esencial para la regulación del crecimiento y diferenciación celular (12). Durante la activación de la respuesta inmune frente a antígenos extraños, la apoptosis es requerida para eliminar células inflamatorias (neutrófilos) o linfocitos T antígeno-específicos efectores, una vez que han ejecutado su función y así evitar el desarrollo de autoinmunidad. La apoptosis se caracteriza por retracción celular, compactación de la cromatina nuclear, pérdida de la forma multilobulada del núcleo, pérdida de receptores de superficie, cambios en la asimetría de la membrana plasmática asociado con la externalización de fosfatidilserina, lo que permite que las células apoptóticas sean fagocitadas por los macrófagos. La muerte celular se genera a través de dos vías: la muerte inducida por activación (MIA), mediada por receptores de muerte o vía extrínseca y la muerte de forma autónoma de células activadas (MACA), mediada por proteínas relacionadas con la familia Bcl-2 o vía intrínseca. La vía extrínseca es activada por miembros de la familia de TNF (TNF/TNFR, FasL/Fas, TRAIL/TRAIL ligando, etc), mientras que la vía intrínseca, por sensores internos que transmiten señales directamente hacia la mitocondria (13).

La activación de la vía extrínseca a través de Fas/FasL puede conducir a dos formas de muerte; una dependiente de la familia de proteínas denominadas caspasas, particularmente a través de la activación de caspasa 8 y 10 y otra independiente de caspasas (14, 15). La vía extrínseca, a su vez, puede seguir una ruta independiente de la

mitocondria (es decir no es influenciada por los miembros de la familia Bcl-2), o conectarse con la ruta de las mitocondrias, a través la acción de caspasa 8, que puede escindir a Bid (un miembro de la familia Bcl-2) y conectar a la mitocondria con la cascada extrínseca (16).

La vía intrínseca o mecanismo dependiente de la mitocondria es marcado por la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP), siendo éste el evento primario de este proceso (15) y al igual que durante la activación de la vía extrínseca, puede mediar la activación de las caspasas, pero en este caso es a través de la liberación del citocromo c al citoplasma, que bajo condiciones normales se encuentra en el espacio intermembranal de la mitocondria (16). Una vez liberado puede unirse a una proteína citosólica conocida como APAF o factor activador de proteínas de apoptosis (15) y mediar la activación de caspasa 9; este complejo a su vez activa a caspasa 3, uno de los principales ejecutores de muerte celular. Otros elementos liberados de la mitocondria durante el proceso de muerte celular son SMAC/Diablo y Omi/HtrA2, que se unen al inhibidor de proteínas apoptóticas (IAP) ubicado en el citosol, neutralizando así su efecto sobre caspasa 9 y caspasa 3 (17).

El VIH cuenta con diversas estrategias para activar la maquinaria de apoptosis tanto en células infectadas como en las no infectadas, induciendo así la muerte de células efectoras del sistema inmune. Los mecanismos involucrados en la destrucción de las células linfoides incluyen la muerte directa por expresión de genes virales en las células infectadas, muerte indirecta de células no infectadas por liberación de proteínas virales pro-apoptóticas, destrucción de efectores específicos en los tejidos infectados por el virus y expresión alterada de proteínas reguladoras de la apoptosis tanto en las células T, como en las células presenta-

doras de antígeno, como consecuencia de la activación celular crónica mediada por el virus (13).

La contribución de la apoptosis en la progresión de la enfermedad ha sido documentada en varios modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. Se ha evidenciado que los progresores lentos muestran una tasa de apoptosis más baja, en comparación con los progresores rápidos (13) y de esta manera, se contribuye al incremento en la susceptibilidad a sufrir infecciones por gérmenes oportunistas.

Las células infectadas por el VIH obtenidas de pacientes, al igual que líneas celulares pro-monocíticas infectadas *in vitro* (18), muestran cambios en la regulación de receptores pro-apoptóticos; ejemplo de ello es un incremento en la expresión de Fas y su ligando (FasL), acompañado por incremento de la expresión de proteínas intracelulares pro-apoptóticas miembros de la familia Bcl2 (BclXS y Bax) y disminución de la expresión de proteínas anti-apoptóticas como Bcl2 y BclXL (18, 19). Las células T de pacientes infectados no sólo muestran aumento en la expresión del receptor Fas, sino que además tienen mayor susceptibilidad de morir por esta vía (20-28). En células mononucleares (linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como en macrófagos) se ha evidenciado un aumento en la expresión en superficie de FasL (11, 26, 29) y niveles elevados de Fas soluble (30); estos cambios están asociados con un incremento en la carga viral y la progresión hacia la fase de SIDA. La participación de otros receptores y ligandos de muerte también ha sido documentada durante la infección por VIH; por ejemplo, se ha demostrado que los niveles de TNF se encuentran elevados en sangre periférica de pacientes sintomáticos (11). En resumen, el virus es capaz de regular la apoptosis mediante la modulación de MIA, asociado con alteración de la expresión de receptores de muerte (sistema Fas/FasL)

en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, estos cambios a su vez están relacionados con la progresión de la enfermedad hacia la fase de SIDA (27, 31-33).

Otro fenómeno observado es la muerte mediada por células autólogas infectadas, demostrada en macrófagos, monocitos, células T CD4<sup>+</sup> y células T CD8<sup>+</sup>, derivadas de pacientes infectados, que son capaces de inducir muerte en células no infectadas, ejemplo de ello es que los macrófagos y monolitos, en presencia del VIH, expresan niveles elevados de FasL y son capaces de inducir muerte a linfocitos T efectoros no infectados (11).

También se ha sugerido la regulación de MACA durante la apoptosis inducida por el VIH, por el aumento de la apoptosis espontánea observada en las células mononucleares de sangre periférica (34-37), especialmente aquellas que tienen fenotipo de células activadas (38, 39), asociado con disminución de la expresión de Bcl2 detectado *in vivo* en nódulos linfáticos y sangre de individuos seropositivos (40). Los linfocitos de sangre periférica de los pacientes tienen pérdida del potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), así como también aumento en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno por la mitocondria; estos cambios se han correlacionado con la apoptosis espontánea (41, 42).

#### EFFECTO DEL VIH SOBRE LOS NEUTRÓFILOS

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) forman parte de los componentes inespecíficos del sistema inmune. Estas células participan como elementos amplificadores, que en asociación con el complemento se encargan de eliminar a los agentes extraños (43). La función de los neutrófilos no se limita a la fase efectora de la respuesta inmune, sino también actúan como elementos moduladores de la inmunidad adap-

tativa (44, 45). Los neutrófilos tienen un papel fundamental en la defensa contra agentes infecciosos, evidenciado por el hecho que ciertos defectos en su función, conducen a infecciones severas que ponen en peligro la vida del paciente, tal es el caso de la Enfermedad Granulomatosa Crónica (CGD), una inmunodeficiencia primaria caracterizada por una inusual susceptibilidad a sufrir infecciones por agentes fúngicos y bacterianos (46) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, en la cual la inapropiada función de los PMN conduce a una susceptibilidad marcada a sufrir infecciones por hongos y bacterias (47). Recientemente se ha demostrado la presencia de la molécula CD4 en neutrófilos de individuos, tanto seropositivos como seronegativos para el VIH; esta observación sumada a reportes previos de presencia constitutiva de CXCR4 y DC-SIGN pudieran indicar que los PMN son blancos directos del virus o de sus componentes (48).

Existen evidencias previas de alteraciones funcionales de los neutrófilos asociadas con la progresión de la enfermedad, que incluyen disfunción de la producción de superóxido, dada por una producción basal incrementada (49), asociada con una incapacidad para responder frente a estímulos, defecto que se profundiza conforme progresa la enfermedad (50, 51). Además de la disfunción en la producción de superóxido, se han descrito defectos en la fagocitosis, en la quimiotaxis y en la expresión de moléculas de adhesión (49). Una de las explicaciones de estos defectos funcionales, es el incremento de la apoptosis constitutiva evidenciada por algunos autores (52-54), que además pudiera explicar en parte la neutropenia observada en los pacientes en fase de SIDA. Los mecanismos que conducen a la muerte acelerada de los neutrófilos no han sido dilucidados. Nuestro grupo se ha propuesto estudiar los mecanismos involucrados en la muerte celular espontánea de los

neutrófilos y evidenciar la participación del sistema Fas/FasL en la apoptosis.

En una primera fase, mediante la determinación del porcentaje de hipodiploidía de células fijadas con paraformaldehído al 1%, permeabilizadas con saponina y teñidas con ioduro de propidium (IP), evaluamos la muerte celular constitutiva e inducida vía Fas en los neutrófilos de los pacientes asintomáticos con conteo de CD4 > 200 cell/mm<sup>3</sup> (840 cel/mm<sup>3</sup> ± 366 DS) y con una viremia promedio de 133.801 copias/mL de ARN de HIV-1; tal y como se evidencia en la Fig. 1, la apoptosis espontánea de los neutrófilos de los pacientes (n = 30); es significativamente mayor cuando se compara con la de los controles (n = 30), la elevada tasa de muerte constitutiva no se correlacionó con los niveles de carga viral ni conteo de CD4 (55), resultados que corroboran reportes previos (53).

Evidencias recientes indican que en los estadios tempranos de la infección (antes de la aparición de anticuerpos específicos contra el virus), los granulocitos de estos

pacientes expresan niveles elevados de Fas en su superficie (56). La muerte acelerada de los neutrófilos de los pacientes infectados pudiera ser una consecuencia de una desregulación en la expresión de receptores de muerte como Fas/FasL, por lo que exploramos la expresión de Fas y FasL en los PMN de los pacientes, en condiciones basales y posterior a la estimulación con 100 ng/mL de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). Los resultados muestran que la expresión de FasL es significativamente mayor en la superficie de los neutrófilos de los pacientes, en comparación con los controles seronegativos ( $p < 0,05$ ) (Fig. 2) (55).

Se evaluó además la cinética de expresión de Fas en la superficie de los neutrófilos. Fas es expresado en alto porcentaje en la superficie de los neutrófilos de manera constitutiva. Una vez estimulados (100 ng/mL de PMA) durante los primeros 15 minutos ocurre una pérdida de la expresión en la superficie de las células, la cual es parcialmente recuperada a los 60 minutos. La expresión de Fas tanto bajo condiciones

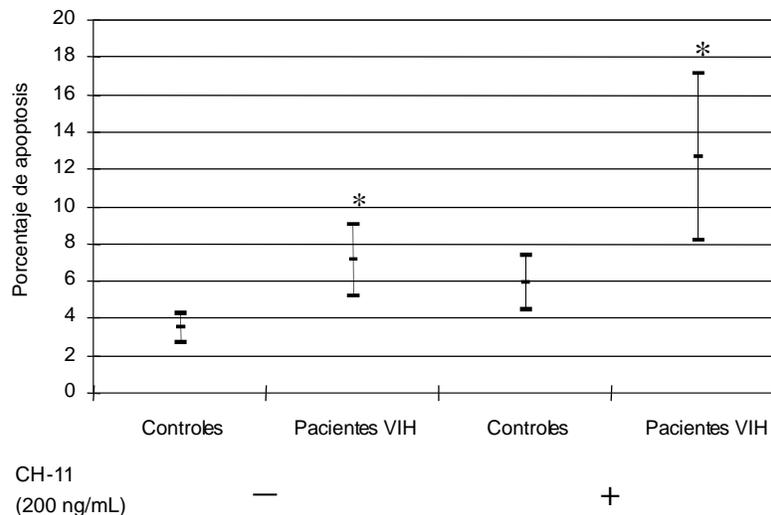


Fig. 1. Muerte celular espontánea e inducida vía Fas en neutrófilos de pacientes seropositivos y controles. La gráfica muestra los intervalos de confianza de la apoptosis constitutiva e inducida vía Fas. La apoptosis fue determinada posterior a 4 horas de incubación, mediante la tinción con ioduro de propidium (IP) (corroborada mediante el doble marcaje con Annexina-V/IP) y el porcentaje de hipodiploidía analizado mediante citometría de flujo. \*Indica diferencias estadísticamente significativas (55).

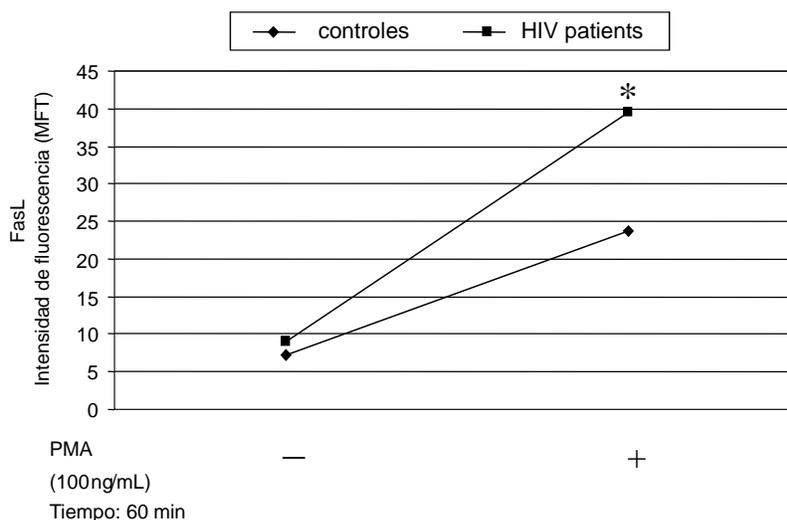


Fig. 2. Expresión de FasL en la superficie de los neutrófilos de los pacientes y controles. La figura muestra los promedios de la intensidad de fluorescencia de la expresión de FasL, expresado en la superficie de los neutrófilos bajo condiciones basales y posterior a la estimulación con PMA. \*Indica diferencias estadísticamente significativas (55).

basales, como posterior a la estimulación, fue similar en ambos grupos, ( $p > 0,05$ ) (datos no mostrados). Adicionalmente evaluamos la muerte inducida vía Fas utilizando un anticuerpo específico anti-Fas (CH-11) con la finalidad de inducir el entrecruzamiento de este receptor, a través de su incubación *in vitro* durante 4 h. Se evidenció que la muerte inducida es significativamente mayor en los neutrófilos de los pacientes (Fig. 1) y sugiere que a pesar de no observarse cambios significativos en los niveles de expresión de Fas, la susceptibilidad de sufrir muerte por esta vía esta incrementada durante la infección. A diferencia de la apoptosis constitutiva, esta elevada susceptibilidad de morir vía Fas se relacionó con la carga viral y con la co-expresión de Fas/FasL en la superficie de estas células en condiciones de reposo (55), lo que pudiera indicar que la presencia de ambas moléculas (Fas/FasL) en la superficie pudiera activar la muerte autocrina en los PMN de los pacientes.

Al igual que lo observado en los neutrófilos, las células T de pacientes VIH sero-

positivos muestran una elevada susceptibilidad de morir vía Fas (31, 33, 57). Inicialmente se pensó que el mecanismo principal de muerte de las células T era producto del efecto citopático generado por el virus sobre las células infectadas. Sin embargo, existen evidencias que mecanismos diferentes a los efectos citopáticos generados por la infección pueden regular la muerte celular. Mediante técnicas de hibridación *in situ* en nódulos linfáticos, se ha evidenciado que la mayoría de las células apoptóticas no están infectadas (58), indicando que existen otros mecanismos involucrados en inducir muerte, además de la infección directa de las células (11, 58), por lo que se pudiera argumentar que células inflamatorias como los polimorfonucleares pudieran ser también blanco de proteínas virales, sin ser células susceptibles a la infección.

Un aspecto importante a tomar en consideración dentro de la fisiología de los neutrófilos, es la participación de las protein kinasas regulada por señales extracelulares (MAPK), consideradas como mediadores de señales de supervivencia y muerte. Previa-

mente se ha demostrado que la fosforilación y activación de uno de los miembros de las MAPK, ERK media señales asociadas con la supervivencia de estas células (59), mientras que algunos autores afirman que la fosforilación p38 está asociada con la apoptosis espontánea de neutrófilos provenientes de controles sanos (60, 61), otros autores no confirman estas observaciones (62). Teniendo en cuenta estos antecedentes decidimos evaluar la participación de estas dos quinasas en la muerte espontánea e inducida vía Fas en los neutrófilos de pacientes infectados por el VIH, a través del uso de inhibidores específicos para cada uno de ellos (ERK y p38). Al utilizar el inhibidor de ERK (50  $\mu$ M de PD98059), se evidenció median-

te la determinación del porcentaje de hipodiploidía de células teñidas con IP, un incremento en la apoptosis espontánea sólo en las células de los pacientes, mientras que la apoptosis inducida vía Fas no fue afectada (Fig. 3) (55); no se observaron cambios en la apoptosis espontánea ni vía Fas con el uso del inhibidor de p38 (10  $\mu$ M de SB203580) (Fig. 4) (datos no publicados). Estos resultados sugieren un compromiso de la vía de ERK en los PMN de los pacientes y que el uso del inhibidor pudiera generar un desbalance en la cascada de las MAPK, que favorecen la muerte de estas células. Para comprender con mayor claridad la participación de las MAPK durante la apoptosis de PMN de pacientes VIH seropo-

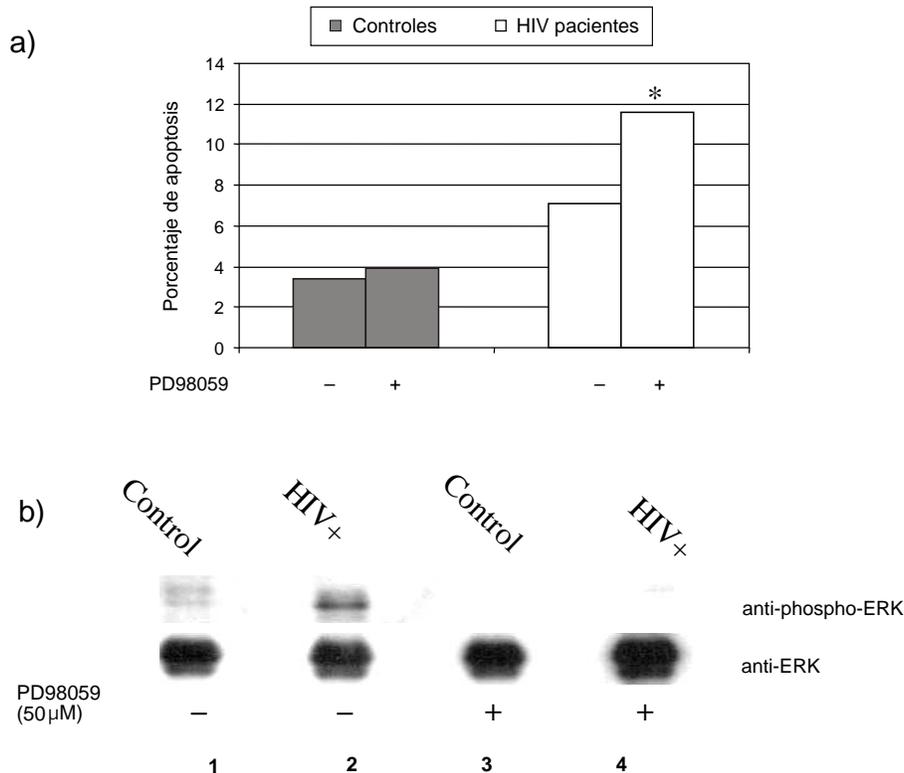


Fig. 3. Efecto del inhibidor de ERK sobre la apoptosis espontánea de los neutrófilos de los pacientes VIH positivos y controles sanos. a) Se muestra la media del porcentaje de apoptosis de las células tratadas y no tratadas con el inhibidor de ERK (PD98059) a una concentración de 50  $\mu$ M. b) Las células lisadas, sometidas a electroforesis y transferidas a una membrana de PVDF fueron tratadas con anti-fosfo-ERK y con anti-ERK, para demostrar la inactivación de ERK cuando se utilizó PD98059. \*Indica diferencias estadísticamente significativas (55).

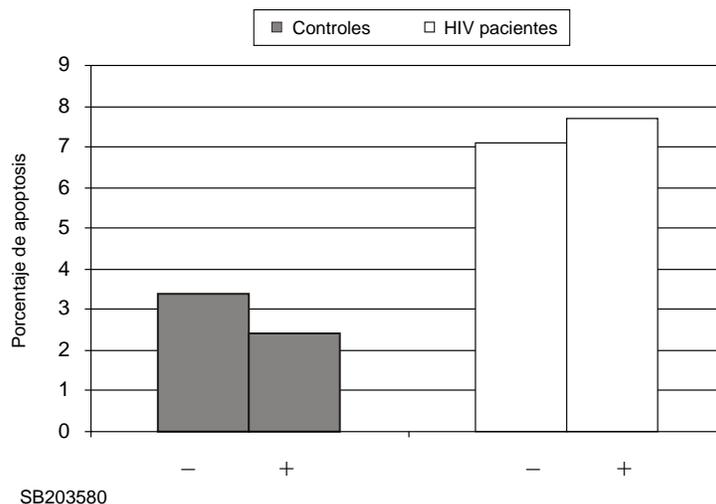


Fig. 4. Efecto del inhibidor de p38 sobre la apoptosis espontánea de los neutrófilos de los pacientes VIH positivos y controles sanos. La figura muestra la media del porcentaje de apoptosis de las células tratadas y no tratadas con el inhibidor de p38 (SB203580) a una concentración de 10  $\mu$ M. Panel izquierdo corresponde a PMN de controles y el panel derecho corresponde a PMN de pacientes (datos no publicados).

sitivos, es necesario evaluar la participación de otras quinasas miembros de esta familia (Ej. JNK) involucradas en la muerte de los neutrófilos. Adicionalmente podríamos asumir que los mecanismos que conducen a la muerte espontánea y vía Fas parecieran estar regulados por dos vías diferentes.

Varias proteínas del virus están involucradas en mediar la muerte celular, entre ellas la glicoproteína de envoltura (Env), Tat, Rev, Nef, Vpr y proteasas (63-65). La participación de productos del virus ha sido previamente demostrada, por ejemplo Vpr (viral protein R) puede causar desintegración del potencial de membrana de la mitocondria en células intactas y provocar la liberación del cirtocromo c, y de esta manera, conducir a la apoptosis. Por otro lado, Tat favorece la disminución de la expresión de Bcl2 e incremento de la expresión de caspasa 8. La disminución de Bcl2 intracelular es afectada además por la degradación proteolítica inducida por proteasas codificadas por el virus o por proteínas virales reguladoras y estructurales (Tat, Nef, Env o Vpr) (11, 13).

Env es capaz de interactuar directamente con receptores ubicados en la superficie de la célula blanco (Ej. CD4 o con los co-receptores) e inducir muerte de los linfocitos no infectados. El mecanismo por el cual se genera la muerte puede variar dependiendo de la naturaleza de la proteína Env (soluble secretada de células infectadas, expresada sobre los viriones o en la superficie de las células infectadas) y de la célula blanco. En el caso de expresarse en la superficie de una célula infectada, puede interactuar con un linfocito no infectado que expresa CD4 en su superficie e inducir muerte a través de activación de señales de apoptosis mediadas por receptores, hemifusión con la célula blanco y la formación de sincitio, eventos que conducen a la muerte celular (9). La muerte inducida por Env puede activarse, además, dependiente de CXCR4 e independiente de la presencia de CD4 (66, 67), conduciendo a la activación de la cascada de apoptosis dependiente de la mitocondria, y al parecer, no involucra la participación de los miembros de la familia de las MAPK (ERK, p38, JNK) (68-70), ni

del sistema Fas/FasL. Así, la interacción de Env con CXCR4 genera depolarización de la membrana mitocondrial, liberación del citocromo c y activación de caspasa 9 y 3 (68, 71-76). Env puede además interactuar con CCR5 e inducir la expresión de FasL y activación de caspasa 8 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> (77).

La regulación de la expresión de FasL en la superficie de células mononucleares (linfocitos T CD4, CD8, monolitos/macrófagos, células dendríticas) se ha atribuido principalmente a dos productos virales Env y Nef (78-81). Se ha sugerido que Nef es esencial para la patogénesis viral y es considerado como uno de los reguladores de la apoptosis, postulado por los siguientes hallazgos: 1) La infección en humanos con cepas que no tienen nef, produce progresión más lenta hacia la fase de SIDA; 2) Las células T que expresan Nef co-expresan FasL; 3) Nef puede incrementar la muerte de células no infectadas (82, 83). En este estudio se decidió explorar el efecto directo de Nef sobre la expresión de FasL en la superficie de los PMN provenientes de individuos sanos. Para tal fin, usamos la proteína recombinante GST-Nef para los ensayos funcionales, mediante la incubación durante dos horas a 37°C. En un primer paso, las células fueron marcadas en un primer paso con un anticuerpo anti-FasL asociado con biotina y en un segundo, paso incubadas con streptavidin-PE, finalmente analizadas por citometría de flujo. Como puede observarse en la Fig. 5a y b, GST-Nef induce un incremento significativo en la expresión de FasL en la superficie de los neutrófilos provenientes de individuos seronegativos, en comparación con los controles expuestos a GST (datos no publicados). Estos resultados preliminares hablan a favor de un efecto regulador directo de Nef sobre los mecanismos que controlan la expresión de FasL en los PMN. En células T se ha evidenciado que Nef es capaz de inducir la expresión de FasL a través

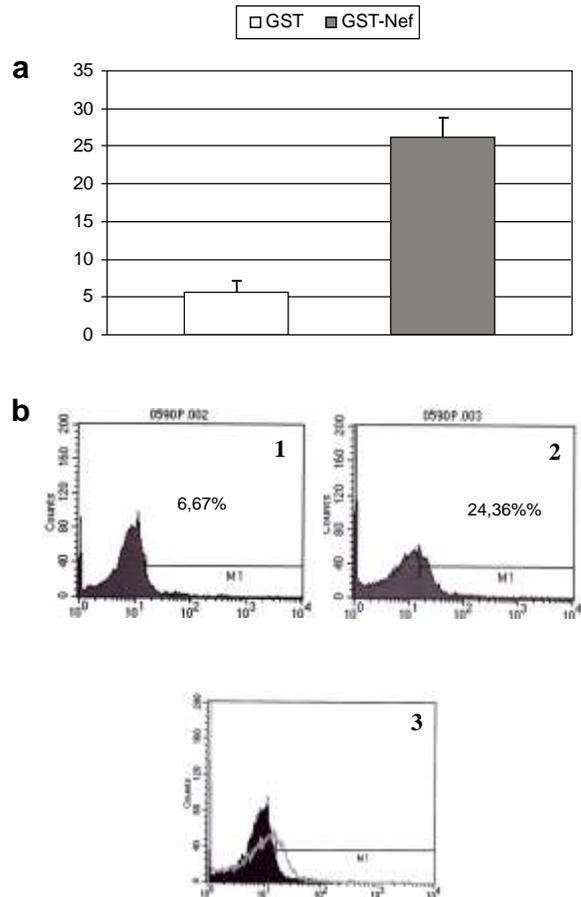


Fig. 5. Inducción de la expresión de FasL en la superficie de los neutrófilos mediado por Nef. a) Muestra el valor de la media ( $\pm$  DS) del porcentaje de expresión de FasL en los neutrófilos de controles seronegativos incubados por 2 horas a 37°C con 1  $\mu$ g/mL de GST y GST-Nef. b) Histograma representativo que evidencia: 1: expresión de FasL de neutrófilos tratados con GST; 2: expresión de FasL de neutrófilos tratados con GST-Nef; 3: imagen solapada de ambos gráficos (datos no publicados).

su interacción con la cadena  $\zeta$  del TCR y esto condiciona a la activación y reclutamiento de una kinasa, conocida como kinasa asociada a Nef (p62/NAK); sin embargo, no está claro cómo este complejo conduce a un incremento en la expresión de FasL en las células blanco (78); hacen falta estudios

adicionales para dilucidar como Nef regula la expresión de FasL en la superficie de los neutrófilos.

Para profundizar en el significado del incremento de FasL sobre la superficie de los PMN, se evaluó además el papel de Nef sobre la apoptosis espontánea sobre los neutrófilos de controles sanos, sensibilizados previamente con Nef; en este caso no se evidenció efecto alguno de esta proteína sobre la muerte celular de los neutrófilos (datos no mostrados), lo que indica que probablemente otros componentes del virus diferentes a Nef podrían estar involucrados en inducir la muerte de los PMN.

Se ha postulado que la modulación de la expresión de FasL en la superficie de una gran variedad de células, como es el caso de los macrófagos infectados por el VIH (13, 33, 79, 84, 85), es un mecanismo para proteger a los reservorios de la acción de las células efectoras. De allí que se evaluó otro posible significado biológico de los niveles elevados de FasL sobre los PMN de los pacientes, a través de ensayos de co-cultivo con células linfoides no infectadas (utilizando un línea celular susceptible a la muerte mediada por Fas conocida como J77) y los neutrófilos como células inductoras de muerte. Previo a estos ensayos de co-cultivo se corroboró la expresión de Fas (superior al 90%) en la superficie de las J77, mediante la tinción con anti-Fas-FITC y análisis por citometría de flujo.

Los PMN purificados provenientes de pacientes y controles fueron fijados con paraformaldehído al 1% y co-cultivados con las J77 proporción 1:1, por un período de 48 horas. La muerte fue evaluada por dos métodos (tinción con Annexina-V/IP y porcentaje de hipodiploidia por tinción del ADN con IP) y analizada mediante citometría de flujo. El uso del marcaje con Annexina-V simultáneamente con IP, permitió además utilizar anti-CD3-PerCP para seleccionar todas las células positivas para el mar-

cador CD3 (linfocitos T) e identificar con mayor certeza a la población linfoide. Para la apoptosis se cuantificaron sólo aquellas células positivas para Annexina-V, mientras que para determinar el porcentaje de muerte total se tomó la sumatoria de todas aquellas células positivas, tanto para Annexina-V como para IP.

El co-cultivo con PMN, provenientes tanto de controles como de pacientes VIH positivos, indujo un incremento de la apoptosis en las J77 (cuantificado por el porcentaje de hipodiploidia y corroborado por la determinación del porcentaje de células positivas sólo para Annexina-V), no se evidenció diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ( $p = 0,2$ ) (datos no mostrados). Al analizar el total de muerte celular inducida por los PMN de pacientes y controles sobre las J77, se observó que los PMN de pacientes VIH positivos indujeron mayor porcentaje de muerte en células linfoides (Fig. 6), encontrándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (datos no publicados). Adicionalmente, cuantificamos mediante tinción con el anticuerpo monoclonal anti-FasL la expresión basal de FasL en la superficie de los neutrófilos para establecer una asociación entre su capacidad para inducir muerte y la expresión del ligando de Fas. Sin embargo, no evidenciamos correlación entre estos dos parámetros. Estos resultados sugieren que los neutrófilos de pacientes infectados pudieran participar en la eliminación de células no infectadas y así contribuir con el deterioro de la respuesta inmune; sin embargo, existen otros factores además de la expresión de FasL que pudieran contribuir con la muerte de células linfoides.

En conclusión, podemos sugerir tres posibles efectos del virus sobre los neutrófilos: 1) Apoptosis espontánea modulada a través del desbalance de la cascada de las MAPK; 2) Incremento en la susceptibilidad de sufrir apoptosis vía Fas, asociada con in-

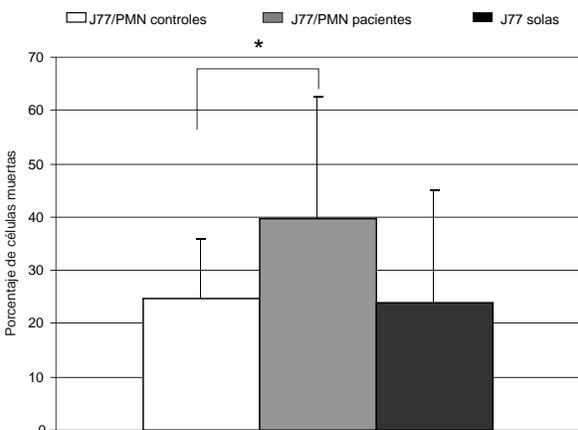


Fig. 6. Cuantificación de la muerte total en las J77: Porcentaje de muerte de las Jurkat co-cultivadas durante 48h con neutrófilos fijados con paraformaldehído al 1%. \*Indica diferencias estadísticamente significativas (datos no publicados).

cremento en los niveles de viremia e incremento en la expresión de FasL, inducida en parte por Nef; 3) Inducción de muerte de células linfoides no infectadas, por mecanismos independientes de la expresión de FasL, que pudiera contribuir con la eliminación de células efectoras reclutadas al sitio de inflamación. Aún quedan muchas interrogantes por responder sobre los mecanismos utilizados por el virus para regular la muerte de estas células. Son necesario nuevos estudios para profundizar sobre el papel de las MAPK, el superóxido, miembros de la familia Bcl2 y las caspasas. Comprender estos aspectos claves en la cascada de apoptosis de los neutrófilos podría en un futuro aportar posibles blancos terapéuticos, que permitan restaurar la función de estas células durante la infección por el VIH.

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por FONACIT S1-2000000522, F-2000001509 y CDCHT-ULA-M-812-04-B.

#### REFERENCIAS

- Pilcher CD, Eron Jr JJ, Galvin S, Gay C, Cohen MS. Acute HIV revisited: new opportunities for treatment and prevention. *J Clin Invest* 2004; 113:937-945.
- Parniak MA. HIV/AIDS after twenty-five years. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 1666-1667.
- O'Brien SJ, Nelson GW. Human genes that limit AIDS. *Nat Genet* 2004; 36:565-574.
- Hocini H, Bomsel M. Infectious human immunodeficiency virus can rapidly penetrate a tight human epithelial barrier by transcytosis in a process impaired by mucosal immunoglobulins. *J Infect Dis* 1999; 179:S448-453.
- Turville S, Wilkinson J, Cameron P, Dable J, Cunningham AL. The role of dendritic cell C-type lectin receptors in HIV pathogenesis. *J Leukoc Biol* 2003; 74:710-718.
- Steinman RM. DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells. *Cell* 2000; 100:491-494.
- Pope M, Betjes MG, Romani N, Hirman H, Cameron PU, Hoffman L, Gezelter S, Schuler G, Steinman RM. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994; 78:389-398.
- Cameron PU, Freudenthal PS, Barker JM, Gezelter S, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* 1992; 257:383-387.
- Ahr B, Robert-Hebmann V, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Apoptosis of uninfected cells induced by HIV envelope glycoproteins. *Retrovirology* 2004; 1:1-12.
- McCune JM. The dynamics of CD4<sup>+</sup> T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; 410:974-979.
- Badley AD, Pilon AA, Landay A, Lynch DH. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* 2000; 96:2951-2964.
- Adachi-Yamada T, O'Connor MB. Mechanisms for removal of developmentally ab-

- normal cells: cell competition and morphogenetic apoptosis. *J Biochem* 2004; 136:13-17.
13. Gougeon M. Apoptosis as an HIV strategy to escape immune attack. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:392-404.
  14. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3:E255-263.
  15. Castedo M, Perfettini JL, Andreau K, Roumier T, Piacentini M, Kroemer G. Mitochondrial apoptosis induced by the HIV-1 envelope. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010:19-28.
  16. Kuwana T, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15:691-699.
  17. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2002; 15:2922-2933.
  18. Badley AD, McElhinny JA, Leibson PJ, Lynch DH, Alderson MR, Paya CV. Upregulation of Fas ligand expression by human immunodeficiency virus in human macrophages mediates apoptosis of uninfected T lymphocytes. *J Virol* 1996; 70:199-206.
  19. Kaplan D, Sieg S. Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Virol* 1998; 72:6279-6282.
  20. Aries SP, Schaaf B, Muller C, Dennin RH, Dalhoff K. Fas (CD95) expression on CD4<sup>+</sup> T cells from HIV-infected patients increases with disease progression. *J Mol Med* 1995; 73:591-593.
  21. Baumler CB, Bohler T, Herr I, Benner A, Krammer PH, Debatin KM. Activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in T cells from human immunodeficiency virus type-1-infected children. *Blood* 1996; 88:1741-1746.
  22. Bohler T, Baumler C, Herr I, Groll A, Kurz M, Debatin KM. Activation of the CD95 system increases with disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:754-759.
  23. Dockrell DH, Badley AD, Algeciras-Schimmich A, Simpson M, Schut R, Lynch DH, Paya CV. Activation-induced CD4<sup>+</sup> T cell death in HIV-positive individuals correlates with Fas susceptibility, CD4<sup>+</sup> T cell count, and HIV plasma viral copy number. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15:1509-18.
  24. Estaquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber CM, Bourez JM, Ameisen JC. T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (FAS/APO-1)-mediated apoptosis of CD4<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 1995; 182:1759-1767.
  25. Gehri R, Hahn S, Rothen M, Steuerwald M, Nuesch R, Erb P. The Fas receptor in HIV infection: expression on peripheral blood lymphocytes and role in the depletion of T cells. *AIDS* 1996; 10:9-16.
  26. Hosaka N, Oyaizu N, Kaplan MH, Yagita H, Pahwa S. Membrane and soluble forms of Fas (CD95) and Fas ligand in peripheral blood mononuclear cells and in plasma from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Infect Dis* 1998; 178:1030-1039.
  27. Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* 1995; 181:2029-2036.
  28. Silvestris F, Cafforio P, Frassanito MA, Tucci M, Romito A, Nagata S, Dammacco F. Overexpression of Fas antigen on T cells in advanced HIV-1 infection: differential ligation constantly induces apoptosis. *AIDS* 1996; 10:131-141.
  29. Dockrell DH, Badley AD, Villacian JS, Heppelmann CJ, Algeciras A, Ziesmer S, Yagita H, Lynch DH, Roche PC, Leibson PJ, Paya CV. The expression of fas ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest* 1998; 101:2394-2405.
  30. Medrano FJ, Leal M, Arienti D, Rey C, Zagliani A, Torres Y, Sanchez-Quijano A, Lissen E, Clerici M. Tumor necrosis factor beta and soluble APO-1/Fas independently predict progression to AIDS in HIV-sero-

- positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:835-843.
31. Estaquier J, Tanaka M, Suda T, Nagata S, Golstein P, Ameisen JC. Fas-mediated apoptosis of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus-infected persons: differential in vitro preventive effect of cytokines and protease antagonists. *Blood* 1996; 87:4959-4966.
  32. Gougeon ML, Lecoœur H, Boudet F, Ledru E, Marzabal S, Boullier S, Roue R, Nagata S, Heeney J. Lack of chronic immune activation in HIV-infected chimpanzees correlates with the resistance of T cells to Fas/Apo-1 (CD95)-induced apoptosis and preservation of a T helper 1 phenotype. *J Immunol* 1997; 158:2964-2976.
  33. Sloand EM, Young NS, Kumar P, Weichold FF, Sato T, Maciejewski JP. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4<sup>+</sup> lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood* 1997; 89:1357-1363.
  34. Gougeon ML, Garcia S, Heeney J, Tschopp R, Lecoœur H, Guetard D, Rame V, Dauguet C, Montagnier L. Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9:553-63.
  35. Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, Debord T, Montagnier L. Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 1996; 156:3509-3520.
  36. Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; 257:217-219.
  37. Oyaizu N, McCloskey TW, Coronese M, Chirmule N, Kalyanaraman VS, Pahwa S. Accelerated apoptosis in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from human immunodeficiency virus type-1 infected patients and in CD4 cross-linked PBMCs from normal individuals. *Blood* 1993; 82:3392-3400.
  38. Adachi Y, Oyaizu N, Than S, McCloskey TW, Pahwa S. IL-2 rescues in vitro lymphocyte apoptosis in patients with HIV infection: correlation with its ability to block culture-induced down-modulation of Bcl-2. *J Immunol* 1996; 157:4184-4193.
  39. Boudet F, Lecoœur H, Gougeon ML. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes during HIV infection. *J Immunol* 1996; 156:2282-2293.
  40. Muro-Cacho CA, Pantaleo G, Fauci AS. Analysis of apoptosis in lymph nodes of HIV-infected persons. Intensity of apoptosis correlates with the general state of activation of the lymphoid tissue and not with stage of disease or viral burden. *J Immunol* 1995; 154:5555-5566.
  41. Castedo M, Macho A, Zamzami N, Hirsch T, Marchetti P, Uriel J, Kroemer G. Mitochondrial perturbations define lymphocytes undergoing apoptotic depletion in vivo. *Eur J Immunol* 1995; 25:3277-3284.
  42. Macho A, Castedo M, Marchetti P, Aguilar JJ, Decaudin D, Zamzami N, Girard PM, Uriel J, Kroemer G. Mitochondrial dysfunctions in circulating T lymphocytes from human immunodeficiency virus-1 carriers. *Blood* 1995; 86:2581-2587.
  43. Smith JA. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double edged sword. *J Leukoc Biol* 1994; 56:672-686.
  44. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Del Sero G, Nicoletti I, Trinchieri G, Bistoni F, Puccetti P. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J Immunol* 1997; 158:5349-5356.
  45. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Toniatti C, Puccetti P, Bistoni F, Poli V. Impaired neutrophil response and CD4<sup>+</sup> T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 1996; 183:1345-1355.
  46. Babior BM. NADPH Oxidase: An Update. *Blood* 1999; 93:1464-1476.

47. Kuritzkes DR. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Clin Infect Dis* 2000; 30:256-260.
48. Biswas P, Mantelli B, Sica A y col. Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils. *Blood* 2003; 101:4452-4456.
49. Elbim C, Prevot MH, Bouscarat, Franzini E, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidaló MA. Polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-induced L-selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood* 1994; 84:2759-2766.
50. Ellis M, Gupta S, Galant S, Hakim S, VandeVen C, Toy C, Cairo MS. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation. *J Infect Dis* 1988; 158:1268-1276.
51. Muñoz JF, Salmen S, Berrueta LR, Carlos MP, Cova JA, Donis JH, Hernandez MR, Torres JV. Effect of human immunodeficiency virus type 1 on intracellular activation and superoxide production by neutrophils. *J Infect Dis* 1999; 180:206-210.
52. Pitrak DL, Tsai HC, Mullane MK, Sutton SH, Stevens P. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Invest* 1996; 98:2714-2719.
53. Baldelli F, Preziosi R, Francisci D, Tascini C, Bistoni F, Nicoletti I. Programmed granulocyte neutrophil death in patients at different stages of HIV infection. *AIDS* 2000; 14:1067-1069.
54. Mastroianni CM, d'Ettorre G, Forcina G, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C, Corpolongo A, Massetti AP, Vullo V. Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 2000; 96:1979-1984.
55. Salmen S, Teran G, Borges L, Goncalves L, Albarran B, Urdaneta H, Montes H, Beerueta L. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol* 2004; 137:166-172.
56. Cossarizza A, Mussini C, Borghi V, Mongiardo N, Nuzzo C, Pedrazzi J, Benatti F, Moretti L, Pinti M, Paganelli R, Franceschi C, De Rienzo B. Apoptotic features of peripheral blood granulocytes and monocytes during primary, acute HIV infection. *Exp Cell Res* 1999; 247:304-311.
57. Badley AD, Dockrell D, Simpson M, Schut R, Lynch DH, Leibson P, Paya CV. Macrophage-dependent apoptosis of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes from HIV-infected individuals is mediated by FasL and tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1997; 185:55-64.
58. Xu XN, Sreaton G. HIV-1 Nef: negative effector of Fas? *Nat Immunol* 2001; 2:384-385.
59. Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett* 2001; 487:318-322.
60. Aoshiha K, Yasui S, Hayashi M, Tamaoki J, Nagai A. Role of p38-mitogen-activated protein kinase in spontaneous apoptosis of human neutrophils. *J Immunol* 1999; 162:1692-1700.
61. Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, Buridi A, McLeish KR. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor Delays Neutrophil Constitutive Apoptosis Through Phosphoinositide 3-Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathways. *J Immunol* 2000; 164:4286-4291.
62. Alvarado-Kristensson M, Pörn-Ares MI, Grethe S, Smith D, Zheng L, Andersson T. p38 Mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis. *FASEB J* 2001; 16:129-131.
63. Heinkelein M, Sopper S, Jassoy C. Contact of human immunodeficiency virus type 1-infected and uninfected CD4<sup>+</sup> T lymphocytes is highly cytolytic for both cells. *J Virol* 1995; 69:6925-6931.
64. Laurent-Crawford AG, Krust B, Riviere, Desgranges C, Muller S, Kiény MP, Dauguet C, Hovanessian AG. Membrane expression of HIV envelope glycoproteins triggers apoptosis in CD4 cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9:761-773.

65. Ohnismus H, Heinkelein M, Jassoy C. Apoptotic cell death upon contact of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1. *J Immunol* 1997; 159:5246-5252.
66. Jacotot E, Krust B, Callebaut C, Laurent-Crawford AG, Blanco J, Hovanessian AG. HIV-1 envelope glycoproteins-mediated apoptosis is regulated by CD4 dependent and independent mechanisms. *Apoptosis* 1997; 2:47-60.
67. Guillermin C, Coudronniere N, Robert-Hebmann V, Devaux C. Delayed human immunodeficiency virus type 1-induced apoptosis in cells expressing truncated forms of CD4. *J Virol* 1998; 72:1754-1761.
68. Roggero R, Robert-Hebmann V, Harrington S, Roland J, Vergne L, Jaleco S, Devaux C, Biard-Piechaczyk M. Binding of human immunodeficiency virus type 1 gp120 to CXCR4 induces mitochondrial transmembrane depolarization and cytochrome c-mediated apoptosis independently of Fas signaling. *J Virol* 2001; 75:7637-7650.
69. Biard-Piechaczyk M, Robert-Hebmann V, Roland J, Coudronniere N, Devaux C. Role of CXCR4 in HIV-1-induced apoptosis of cells with a CD4<sup>+</sup>, CXCR4<sup>+</sup> phenotype. *Immunol Lett* 1999; 70:1-3.
70. Biard-Piechaczyk M, Robert-Hebmann V, Richard V, Roland J, Hipskind RA, Devaux C. Caspase-dependent apoptosis of cells expressing the chemokine receptor CXCR4 is induced by cell membrane-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein (gp120). *Virology* 2000; 268:329-344.
71. Berndt C, Mopps B, Angermuller S, Gierschik P, Krammer PH. CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:12556-12561.
72. Gandhi RT, Chen BK, Straus SE, Dale JK, Lenardo MJ, Baltimore D. HIV-1 directly kills CD4<sup>+</sup> T cells by a Fas-independent mechanism. *J Exp Med* 1998; 187:1113-22.
73. Noraz N, Gozlan J, Corbeil J, Brunner T, Spector SA. HIV-induced apoptosis of activated primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes is not mediated by Fas-Fas ligand. *AIDS* 1997; 11:1671-1680.
74. Blanco J, Jacotot E, Cabrera C, Cardona A, Clotet B, De Clercq E, Este JA. The implication of the chemokine receptor CXCR4 in HIV-1 envelope protein-induced apoptosis is independent of the G protein-mediated signalling. *AIDS* 1999; 13: 909-917.
75. Herbein G, Van Lint C, Lovett JL, Verdin E. Distinct Mechanisms Trigger Apoptosis in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected and in Uninfected Bystander T Lymphocytes. *J Virol* 1998; 72:660-670.
76. Cicala C, Arthos J, Rubbert A, Selig S, Wildt K, Cohen OJ, Fauci AS. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:1178-1183.
77. Algeciras-Schimmich A, Vlahakis SR, Villasis-Keever A, Gomez T, Heppelmann CJ, Bou G, Paya CV. CCR5 mediates Fas- and caspase-8 dependent apoptosis of both uninfected and HIV infected primary human CD4 T cells. *AIDS* 2002; 16: 1467-1478.
78. Xu XN, Laffert B, Screaton GR, Kraft M, Wolf D, Kolanus W, Mongkolsapay J, McMichael AJ, Baur AS. Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain. *J Exp Med* 1999; 189:1489-1496.
79. Quaranta MG, Mattioli B, Giordani L, Viora M. HIV-1 Nef equips dendritic cells to reduce survival and function of CD8<sup>+</sup> T cells: a mechanism of immune evasion. *FASEB J* 2004; 18:1459-1461.
80. Cottrez F, Manca F, Dalgleish AG, Arenzana-Seisdedos F, Capron A, Groux H. Priming of human CD4<sup>+</sup> antigen-specific T cells to undergo apoptosis by HIV-infected monocytes. A two-step mechanism involving the gp120 molecule. *J Clin Invest* 1997; 99:257-266.
81. Tateyama M, Oyaizu N, McCloskey TW, Than S, Pahwa S. CD4 T lymphocytes are primed to express Fas ligand by CD4 cross-linking and to contribute to CD8 T-cell apoptosis via Fas/FasL death signaling pathway. *Blood* 2000; 96:195-202.

- 
82. Okada H, Takei R, Tashiro M. HIV-1 Nef protein-induced apoptotic cytolysis of a broad spectrum of uninfected human blood cells independently of CD95(Fas). *FEBS Lett* 1997; 414:603-606.
  83. Okada H, Takei R, Tashiro M. Nef protein of HIV-1 induces apoptotic cytolysis of murine lymphoid cells independently of CD95 (Fas) and its suppression by serine/threonine protein kinase inhibitors. *FEBS Lett* 1997; 417:61-64.
  84. Mahlkecht U, Herbein G. Macrophages and T-cell apoptosis in HIV infection: a leading role for accessory cells? *Trends Immunol* 2001; 22:256-260.
  85. Badley AD, Roumier T, Lum JJ, Kroemer G. Mitochondrion-mediated apoptosis in HIV-1 infection. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24:298-305.