

(E. SAVIO)

INDICE TEMATICO

TESIS DE MAESTRIA PRO.IN.BIO



PRODUCCIÓN DE OXIDO NITRICO EN MONOCITOS Y LINFOCITOS DE PERSONAS INFECTADAS POR EL VIH-1

Estudiante: Dr. Ernesto Cairoli Morossini
Orientadores: Dr. Eduardo Savio, Dr. Alfonso Cayota.

No. 5070

Departamentos involucrados en el desarrollo de esta maestría:

-Departamento Básico de Medicina,
-Servicio de Enfermedades Infecciosas,
-Clínica Médica "C", Hospital de Clínicas,
Facultad de Medicina, Universidad de la República Oriental del Uruguay.

INDICE TEMATICO

1) ANTECEDENTES	3
2) OBJETIVOS	18
3) MATERIALES y METODOS	19
I) Características de los individuos incluidos en el presente proyecto	19
II) Aislamiento de las células mononucleares de sangre periférica	22
III) Cultivos in vitro, ensayos de proliferación celular y determinación de apoptosis.	23
-Dadores de *NO e inhibidores de la NOS en la proliferación de PBMC normales.	
-Inhibidores de la NOS y su relación con la apoptosis en PBMC normales.	
-Presencia de nitrotirosina y su asociación con apoptosis en PBMC normales y de pacientes VIH+.	
IV) Expresión del mRNA de la iNOS y de la enzima iNOS en PBMC	26
V) Determinación de la producción de especies reactivas del nitrógeno	30
-Detección de nitritos por la reacción de Griess	
-Detección de nitrotirosina mediante Western Blot	
-Detección de la producción de *NO utilizando Di-Amino Fluoresceína (DAF)	
en:	
-fluorimetría	
-microscopia de fluorescencia	
-citometría de flujo	
4) RESULTADOS	36
5) DISCUSIÓN	62
6) CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS	75
7) BIBLIOGRAFÍA	77

1) ANTECEDENTES

Epidemiología de la infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente responsable del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Mas de 40 millones de personas viven en el mundo con VIH-SIDA. En el Uruguay la epidemia comenzó el 29 de julio de 1983 (primer caso identificado), reportándose a la fecha 5318 casos de VIH, de los cuales 2360 se encuentran en etapa SIDA. Los fallecidos totalizan 1283, estimándose un total de 12500 personas infectadas. El 70% de los pacientes tienen entre 15 y 34 años, con una relación hombre/mujer de 3/1, con una creciente proporción en el sexo femenino. La vía principal de transmisión es la sexual (70%) y dentro de esta el 66% es por contagio heterosexual. De enero a junio de 2004 se notificaron un total de 316 casos de VIH (2 casos por día) y 104 casos de SIDA en nuestro país. Existe un crecimiento significativo en la prevalencia existiendo un relación de 1/1000 en 1998 que se cuadruplicó a 4/1000 en el 2002 (prevalencia de 0,36% a junio de 2004) (Programa Nacional SIDA 2004).

Clínica de la infección VIH/ SIDA

Si bien el curso de la infección puede tener diferencias evolutivas de un paciente a otro, la historia natural de la infección por el VIH-1 en una persona que no recibiera tratamiento antirretroviral presentaría tres fases sucesivas (Fauci 2003), (Stevenson 2003).

a) Fase Aguda o de infección primaria (primoinfección): luego de 2-6 semanas del ingreso del VIH al organismo, el 50-70% de los sujetos presentan un síndrome de impregnación viral o mas característicamente un síndrome mononucleósido. El VIH abandona la circulación sanguínea, invade órganos linfáticos donde se replica hasta alcanzar una concentración crítica logrando una fuerte viremia inicial responsable de la diseminación del virus en el organismo, principalmente hacia tejidos linfoides y cerebro. El antígeno p24 del VIH aparece en 2 a 6 semanas luego de la primoinfección desapareciendo mientras comienza la detección de anticuerpos en el lapso de 2 a 12 semanas. El tiempo entre el inicio de la infección y la detección de anticuerpos específicos contra el VIH se denomina período ventana, el cual puede tener una duración de hasta 3 meses. La duración del período agudo es de aproximadamente 6 a 8 semanas.

b) Fase crónica o período asintomático: esta fase se caracteriza por ausencia de sintomatología clínica, teniendo una duración de 10 a 12 años en la mayoría de los pacientes. Dada la ausencia de síntomas puede considerarse a este periodo como de latencia clínica. Sin embargo durante el mismo se produce un lento pero progresivo deterioro del sistema inmunitario y la instalación de una replicación viral crónica y persistente. Esta característica lo convierte al VIH en único, ya que la respuesta inmunitaria no logra eliminar el virus ni controlar su diseminación y

durante el curso de una aparente latencia clínica no se produce una latencia microbiológica, manteniéndose a "bajo ruido" una replicación viral incesante, activa y persistente, convirtiéndose en una infección crónica. Podemos decir que la característica evolutiva principal de la infección por el VIH es la existencia simultánea de latencia clínica sin latencia microbiológica. Desde el punto de vista inmunitario esta etapa se caracteriza por una pérdida progresiva de linfocitos T CD4+ (LTCD4+) asociado a una disfunción y/o anergia progresiva de prácticamente la totalidad de efectores celulares del sistema inmunitario (Macrófagos, Linfocitos B (LB), Natural Killer (NK) y Linfocitos T CD8+ (LTCD8+).

c) Fase de crisis final, período sintomático o de inmunodeficiencia severa (SIDA): es el período final, caracterizado por una inmunodepresión severa con una virtual desaparición de las respuestas efectoras antivirales específicas y una depleción profunda de LTCD4+ (<200/ul). Las manifestaciones clínicas de esta fase están vinculadas con el desarrollo de complicaciones infecciosas por gérmenes oportunistas, alta incidencia de ciertos tipos de neoplasias malignas como linfomas o sarcoma de Kaposi, afectación neurológica y un fuerte deterioro del estado general.

La clasificación utilizada para adolescentes y adultos es la propuesta en 1993 por el Center for Disease Control de los Estados Unidos (CDC), en la que se establecen diferentes estadios combinando la clínica y el recuento de LTCD4+. La categoría clínica A corresponde a la infección primaria, pacientes asintomáticos con o sin linfadenopatías generalizadas; la categoría clínica B corresponde a pacientes que no hayan presentado enfermedades de la categoría C, pero que si presenten enfermedades relacionadas con defectos en la inmunidad celular como ser candidiasis bucofaríngea, leucoplasia oral vellosa, púrpura trombocitopénico idiopático, neuropatía periférica, angiomas bacilar, entre otras. La categoría clínica C corresponde a los pacientes que presenten al menos una de las siguientes complicaciones: 1) Candidiasis bronquial, traqueal, pulmonar o esofágica; 2) Coccidioidomicosis diseminada o extrapulmonar; 3) Criptococosis extrapulmonar; 4) Criptosporidiosis intestinal crónica; 5) Histoplasmosis diseminada o extrapulmonar; 6) Isosporidiasis intestinal crónica; 7) Infección diseminada o extrapulmonar por Complejo Mycobacterium Avium o Kansaii u otras especies de Mycobacterium, 8) Tuberculosis pulmonar o extrapulmonar, 9) Neumonía por Pneumocystis carinii, 10) Neumonía a repetición (mas de 2 en 12 meses), 11) Septicemia recidivante por Salmonella, 12) Toxoplasmosis cerebral, 13) Leucoencefalopatía multifocal progresiva, 14) enfermedad por citomegalovirus no hepática, esplénica ni ganglionar; 15) Herpes simple esofágico, bronquial, pulmonar o úlceras crónica; 16) Encefalopatía por VIH; 17) Síndrome de emaciación (desgaste o wasting) por VIH; 18) Cáncer cervical invasor; 19) Sarcoma de Kaposi; 20) Linfoma de Burkitt o Linfoma No Hodgkin; 21) Linfoma cerebral primitivo. En base a estas afecciones clínicas y en combinación con la cifra de LTCD4+ se define una tabla de clasificación con las siguientes características:

N° de LTCD4+	Categoría A	Categoría B	Categoría C
> 500/ul (> 29%)	A1	B1	C1
entre 200-499/ul (14 a 28%)	A2	B2	C2
< 199/ul (< 14%)	A3	B3	C3

Quedan comprendidos dentro de la definición de SIDA los pacientes VIH positivos que 1) presenten menos de 200 LTCD4+/ul y/o 2) hayan presentado una de las complicaciones señaladas en la categoría clínica C (Fauci 2002).

Etiopatogenia de la infección por el VIH

El VIH es un retrovirus humano integrante de la familia Retroviridae, incluido en la subfamilia de los Lentivirus, habiéndose descrito dos variedades VIH-1 y VIH-2. Es característica la presencia de la glicoproteína de la cápside viral gp160 (con los clásicos dominios gp120 y gp41). La transición de la infección aguda hacia la infección crónica, manteniendo una replicación viral persistente, es un fenómeno único y exclusivo del VIH (Fauci 1996). La replicación viral es activa desde las etapas tempranas de la infección y el grado de replicación viral tiene una relación directa con la evolución hacia el SIDA. El deterioro inmunológico es evaluado por el número de LTCD4+ circulantes y por el estado de replicación viral determinado por la carga viral plasmática, constituyendo ambos los marcadores pronósticos y evolutivos de la infección (Mellors 1996).

Las células blanco infectadas por el VIH son aquellas que expresan la molécula CD4 en su superficie debido a la alta afinidad de interacción con la gp120 de la envoltura externa viral, quedando incluidos los LTCD4+ (cooperadores o "helper"), las células de la estirpe monocítica (monocitos, macrófagos, células de la glía) y las células dendríticas. El ingreso del virus a la célula requiere además la interacción con un correceptor (receptor fisiológico de quimioquinas) el cual será diferente según el tipo celular infectado (Stevenson 2003). Los LTCD4+ perdidos en etapas tempranas corresponden a linfocitos naíves (CD45RA+), en tanto que en etapas avanzadas se pierden los LTCD4+ memoria (CD45RO+) (Cayota 1990).

Si bien las células blanco del VIH-1 son las células que expresan CD4 en la superficie, la manera en como se afectan es diferente. Los LTCD4+ son los principalmente afectados ya que pueden sufrir el efecto citopático directo (siendo eliminados) o pueden sufrir los efectos citopáticos indirectos al evolucionar hacia la disfunción, la anergia o entrando en apoptosis. En el caso de los monocitos-macrófagos se produce la entrada del virus pero el efecto citopático es menos intenso, pudiendo el VIH replicarse ampliamente en estas células con escasos efectos líticos. Esto explica que los infectados por el VIH-1 tengan un número conservado de monocitos circulantes en sangre. Por lo tanto las células de la

N° de LTCD4+	Categoría A	Categoría B	Categoría C
> 500/ul (> 29%)	A1	B1	C1
entre 200-499/ul (14 a 28%)	A2	B2	C2
< 199/ul (< 14%)	A3	B3	C3

Quedan comprendidos dentro de la definición de SIDA los pacientes VIH positivos que 1) presenten menos de 200 LTCD4+/ul y/o 2) hayan presentado una de las complicaciones señaladas en la categoría clínica C (Fauci 2002).

Etiopatogenia de la infección por el VIH

El VIH es un retrovirus humano integrante de la familia Retroviridae, incluido en la subfamilia de los Lentivirus, habiéndose descrito dos variedades VIH-1 y VIH-2. Es característica la presencia de la glicoproteína de la cápside viral gp160 (con los clásicos dominios gp120 y gp41). La transición de la infección aguda hacia la infección crónica, manteniendo una replicación viral persistente, es un fenómeno único y exclusivo del VIH (Fauci 1996). La replicación viral es activa desde las etapas tempranas de la infección y el grado de replicación viral tiene una relación directa con la evolución hacia el SIDA. El deterioro inmunológico es evaluado por el número de LTCD4+ circulantes y por el estado de replicación viral determinado por la carga viral plasmática, constituyendo ambos los marcadores pronósticos y evolutivos de la infección (Mellors 1996).

Las células blanco infectadas por el VIH son aquellas que expresan la molécula CD4 en su superficie debido a la alta afinidad de interacción con la gp120 de la envoltura externa viral, quedando incluidos los LTCD4+ (cooperadores o "helper"), las células de la estirpe monocítica (monocitos, macrófagos, células de la glía) y las células dendríticas. El ingreso del virus a la célula requiere además la interacción con un correceptor (receptor fisiológico de quimioquinas) el cual será diferente según el tipo celular infectado (Stevenson 2003). Los LTCD4+ perdidos en etapas tempranas corresponden a linfocitos naíves (CD45RA+), en tanto que en etapas avanzadas se pierden los LTCD4+ memoria (CD45RO+) (Cayota 1990).

Si bien las células blanco del VIH-1 son las células que expresan CD4 en la superficie, la manera en como se afectan es diferente. Los LTCD4+ son los principalmente afectados ya que pueden sufrir el efecto citopático directo (siendo eliminados) o pueden sufrir los efectos citopáticos indirectos al evolucionar hacia la disfunción, la anergia o entrando en apoptosis. En el caso de los monocito-macrófagos se produce la entrada del virus pero el efecto citopático es menos intenso, pudiendo el VIH replicarse ampliamente en estas células con escasos efectos líticos. Esto explica que los infectados por el VIH-1 tengan un número conservado de monocitos circulantes en sangre. Por lo tanto las células de la

estirpe monocítica funcionan como un reservorio de la infección y constituyen un obstáculo en la erradicación de la infección (Fauci 2002).

Las características fundamentales en la inmunopatogenia de la infección por el VIH son: a) la disfunción y/o anergia de los efectores inmunitarios remanentes asociada a la alteración en el perfil de secreción de citoquinas e hiperactivación inmunitaria crónica y b) la pérdida progresiva de LTCD4⁺ por mecanismos directos o indirectos.

Disfunción inmunológica y alteración en la secreción de citoquinas.

En condiciones normales los linfocitos T helper naives o "vírgenes" pueden diferenciarse en células efectoras, denominadas linfocitos T helper 1 (Th1) y linfocitos T helper 2 (Th2), separación funcional realizada en base al perfil de citoquinas que producen. Estos linfocitos no presentan un marcador fenotípico capaz de diferenciarlos entre si, siendo esta división exclusivamente funcional. Los Th1 presentan un perfil de secreción denominado "tipo 1" caracterizado por la secreción de interleuquina (IL) 2, interferón gama (IFN γ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Los Th2 presentan un perfil de secreción de citoquinas denominado "tipo 2" caracterizado por la secreción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Existe además un tercer subtipo identificado como Th0 (precursor de Th1 y Th2), el cual produce citoquinas del patrón de secreción Th1 y Th2. La citoquina que caracteriza a los Th1 es el IFN γ y las citoquinas que caracterizan a los Th2 son la IL-4, IL-5, IL-6 y la IL-10. Clásicamente se plantea que la respuesta Th1 es la que acciona la respuesta inmunitaria celular y que la respuesta Th2 es la que acciona la respuesta humoral. Las citoquinas producidas por un subtipo linfocitario ejercen una regulación negativa sobre la expansión y función del otro subtipo, de manera que el IFN γ estimula una mayor diferenciación Th1 e inhibe la proliferación Th2 y por otro lado la IL-4 estimula la diferenciación Th2 y la producción de IL-10 e inhibe la proliferación de los Th1. Así cada sub-población se amplifica a si misma y regula de forma cruzada a la otra. Esto justifica el desarrollo de una polarización en una dirección, llegando a una polarización extrema en los casos de infecciones crónicas o exposiciones crónicas a antígenos, constituyendo ambos un estímulo crónico persistente (Abbas 2004).

Se ha propuesto (Romagnani 1996) que durante la infección por el VIH se produciría un desequilibrio en la relación normal Th1/Th2-Th0 hacia un predominio progresivo de respuestas tipo Th2, siendo éste el perfil de secreción que favorecería la replicación viral y la progresión de la enfermedad. Esta hipótesis denominada "switch Th1/Th2" impulsada por Clerici y colaboradores, sostiene que en el curso de la infección se produce un descenso de la respuesta Th1 y una conservación de la respuesta Th2, pero no un aumento específico de ella. El descenso de los Th1 explicarían en parte la falta de control inmunitario frente a las infecciones por gérmenes intracelulares (Clerici 1993).

Clínicamente uno de los argumentos a favor de un predominio Th2 en la evolución de los infectados por el VIH-1 es el aumento de Inmunoglobulina (Ig) E plasmática, asociada a un descenso acelerado de LTCD4+. A su vez la concomitancia con infecciones helmínticas está asociada a una rápida progresión hacia el SIDA, estando ambos fenómenos estrechamente ligados a la producción de IL-4 e IL-5 (Romagnani 1996). Si bien esta hipótesis ha sido ampliamente difundida, existen trabajos que demuestran ausencia de evidencia o presentan resultados contradictorios con esta hipótesis (Graziosi 1994).

Más recientemente, mediante la determinación intracelular de interleuquinas por citometría de flujo sobre LTCD4+, se demostró una disminución en la producción de IL-2 e IFN γ con franca reducción en los casos en estadio SIDA, mientras que en las citoquinas del perfil tipo 2, se encontró un incremento proporcional de la IL-4 e IL-10, donde esta última se observó francamente elevada en los linfocitos procedentes de pacientes en etapa SIDA (Klein 1997). Otros autores encontraron que los niveles de IL-2 estaban disminuidos, existiendo una mayor susceptibilidad a la apoptosis en los clones Th1 productores de esta citoquina, en un fenómeno asociado a la expresión de Bcl-2 (Ledru 1998). La detección en PBMC del mRNA de diferentes citoquinas mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) semicuantitativa, mostró que existía una elevación de IL-4 e IL-10 y que esta elevación era mayor en los pacientes con elevada carga viral y bajo recuento de LTCD4+ (Altfeld 2000). Estos resultados apoyan la disminución de la relación Th1/Th2-Th0, evidenciando la conmutación en el perfil de secreción de citoquinas, pasando del tipo Th1 al tipo Th2, siendo estos cambios más notorios en las etapas con mayor deterioro inmunológico.

Otro factor participante en la producción de la conmutación Th1/Th2-Th0, es la particularidad de las variantes M-tróficas del VIH (predominantes en la primoinfección) para infectar selectiva y eficientemente los Th1, mientras que las variantes T-tróficas (predominantes en estadio SIDA) lo hicieron sobre los Th2 (Suzuki 1999).

Esta compleja regulación en la secreción de citoquinas en la infección por el VIH-1 puede estar influenciada por la concomitancia con otras enfermedades infecciosas que aparecen en el transcurso de la enfermedad. Un ejemplo de esto son los agentes infecciosos intracelulares, como *Toxoplasma Gondii* o enfermedades que tienden al desarrollo de granulomas como *Mycobacterium Tuberculosis*, tienden a estimular el desarrollo de respuestas Th1 en el contexto de pacientes VIH+ en etapa SIDA (Romagnani 1996).

Otro aspecto importante relacionado al desequilibrio en la producción de citoquinas es la incidencia de estas en la replicación viral, haciéndolo de manera variable, produciendo un efecto inductor de la replicación las IL-1, IL-2 y el TNF α o

produciendo una modulación negativa en su replicación las citoquinas IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF β) (Bahbouhi 2004). En este sentido se ha demostrado que el tratamiento prolongado con terapia antirretroviral altamente activa (highly active antiretroviral therapy, HAART) recuperó la secreción de IL-2. Los ensayos clínicos que adicionaron IL-2 a los planes de HAART, han demostrado la capacidad de la IL-2 de restaurar muchas de las alteraciones funcionales y de aumentar el número de LTCD4⁺ (con un aumento del 112% luego de un año), logrando una reducción sustancial del pool linfocitario que contiene una replicación viral viable y competente del VIH, no existiendo diferencias significativas en la carga viral plasmática (Davey 2000) (Chung 1999).

Si bien las evidencias *in vitro* abogan a favor de la disminuida respuesta Th1 y la conservada respuesta Th2, no se ha logrado *in vivo* establecer que exista un cambio brusco en la secreción, o que la separación tajante entre estas dos clases de citoquinas influya directamente en la progresión de la enfermedad. La alteración en la regulación de la secreción de citoquinas es compleja y no puede separarse nítidamente en términos de polaridad de las respuestas Th1 y Th2 (Fauci 2002).

Apoptosis en la infección por el VIH.

En cuanto a los mecanismos de pérdida linfocitaria el efecto citopático directo viral no alcanza para explicar la pérdida profunda de linfocitos. Se ha demostrado que la muerte de LTCD4⁺ en la infección por el VIH-1 se produce tanto en linfocitos directamente infectados como en los no infectados. Esto llevó al planteo de otros mecanismos involucrados en la pérdida linfocitaria, en donde la apoptosis ha sido sugerida jugando un rol central (Badley 2000).

La muerte celular programada o apoptosis, es la vía de eliminación celular utilizada tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Mediante la apoptosis se activan endonucleasas que fragmentan el DNA a nivel internucleosomal en fragmentos de 200bp o sus múltiplos. Esta activación se lleva a cabo por la activación secuencial de cisteína-proteasas conocidas como caspasas, enzimas constitutivas presentes en las células como zimógenos, describiéndose a la fecha 14 caspasas diferentes (Li 1999). En la infección por VIH la intensidad de la apoptosis guarda relación con el grado de activación general del sistema inmunitario y no con el estadio de la enfermedad. Los LTCD4⁺ de pacientes VIH⁺ presentaron una apoptosis espontánea superior a la de los linfocitos de individuos VIH negativos. La activación *in vitro* de LTCD4⁺ produjo una apoptosis mayor en aquellos linfocitos procedentes de pacientes VIH⁺ comparados contra los controles VIH negativos. Este fenómeno llamado muerte celular inducida por activación ocurre característicamente en células que han sido previamente activadas, como es el caso del estímulo crónico de las células CD4⁺ de los pacientes infectados por el VIH (Badley 2000). Las PBMC de pacientes

VIIH+ asintomáticos, evolucionan a la apoptosis al ser activadas en presencia de anticuerpos anti-CD3. Tanto en los LTCD4+ como en los LTCD8+ se produjo apoptosis, demostrando que el fenómeno era independiente de la infección directa por el virus (Meyaard 1992). El contacto de PBMC no infectadas con linfocitos infectados o con proteínas de la cápside viral, llevó a la muerte por apoptosis tanto a las células infectadas como no infectadas (Ohninus 1997). En el mismo sentido, en pacientes con rápida progresión se encontró un incremento en la actividad de la caspasa-3 y en los pacientes no progresores una inhibición en la actividad de la misma (Liegler 1998). Recientemente se ha demostrado que las proteínas de la cápside viral son capaces de inducir la activación de las caspasas 3 y 6 por un proceso dependiente del receptor CD4 (Cicala 2000).

El óxido nítrico y la infección por el VIH.

El establecimiento de la infección lleva a la producción predominante de agentes y reacciones oxidantes sobre los sistemas reductores o antioxidantes, creando un desequilibrio metabólico genéricamente denominado estrés oxidativo. Esta situación lleva a un aumento en la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN). Se producen cambios a nivel monocitario y linfocitario asociados a la alteración funcional celular, encontrando una disminución en la concentración de ácido ascórbico, tocoferol, superóxido dismutasa y glutatión (Pace 1995), fenómenos contrapuestos a la recuperación de la capacidad proliferativa linfocitaria lograda *in vitro* mediante tratamiento con antioxidantes (Cayota 1996).

Dentro de las ERN, el óxido nítrico (*NO) adquiere particular importancia en la respuesta inmunitaria. El *NO fue descrito inicialmente como un componente vasodilatador derivado de endotelio, siendo sintetizado por una gran variedad de células (Moncada 1991). El *NO es sintetizado a partir del grupo guanidino de la L-arginina (desaminación oxidativa de la L-arginina para rendir L-citrulina) en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Ignaro 1995). Se han identificado 3 isoformas principales tanto en humanos como en modelos murinos, dos de las cuales se expresan de forma constitutiva, denominadas isoforma neuronal nNOS o NOS tipo I y la isoforma endotelial eNOS o NOS tipo III, cuyos genes se localizan en los cromosomas 12 y 7 respectivamente. Ambas generan cantidades moderadas de *NO y por cortos períodos de tiempo en respuesta a aumentos de flujos cálcicos. La tercera isoforma, denominada NOS inducible (iNOS o NOS tipo II), cuyo gen se localiza en el cromosoma 17, está generalmente ausente en condiciones basales o de reposo en células de mamíferos, teniendo la particularidad de ser inducida por una variedad de estímulos, tales como citoquinas, polisacáridos bacterianos y factores de transcripción (Bogdan 2000). Se encuentra presente en diferentes células primarias, células tumorales y líneas celulares. En células primarias puede ser encontrada en astrocitos, condrocitos,

miocitos cardíacos, eosinófilos, endometrio, fibroblastos, hepatocitos, keratinocitos, células de Kupffer, epitelio pulmonar, macrófagos, monocitos, neuronas, neutrófilos polimorfo nucleares, osteoblastos, osteoclastos, células pancreáticas, plaquetas, células musculares, células del endotelio vascular y células del músculo liso vascular. En células tumorales se ha descrito en carcinomas de mama, colon, pulmón, útero y melanoma. Se la encuentra presente en múltiples patologías como ser procesos inflamatorios crónicos, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas y neoplasias malignas (Ganster 2000).

Para el caso de los linfocitos, la iNOS ha podido ser detectada en condiciones patológicas en linfocitos B (Mannick 1995) y linfocitos NK tanto humanos como de ratón (Cifone 2001). En el caso de los linfocitos T, existen evidencias que sugieren la presencia de la iNOS en modelos murinos infectados de Malaria (Taylor-Robinson 1994) y en líneas T derivadas de tumores, pero no se ha demostrado claramente la presencia de la iNOS a nivel de linfocitos T en condiciones normales o de pacientes infectados por el VIH-1 (Kröncke 1998), (Ganster 2000). A nivel de linfocitos T y B humanos normales se ha demostrado por RT-PCR y WB presencia de la eNOS, sin profundizar en la producción de $\cdot\text{NO}$ en esas células (Reiling 1996).

Las citoquinas constituyen sus principales agentes reguladores a nivel humano, donde los estímulos más potentes inductores de su expresión son el TNF α , la IL-1 y el IFN γ , (potenciados por su combinación o administrado de forma conjunta con el lipopolisacárido - LPS). Las citoquinas capaces de realizar una inhibición en la inducción de la iNOS, son las IL-4, IL-10, IL-13 y el TGF β . La inhibición también es lograda por diferentes fármacos como los glucocorticoides (Bogdan 2000) (Kröncke 1998).

El $\cdot\text{NO}$ es inestable en solución acuosa con una vida media de algunos minutos, constituyendo el nitrito y el nitrato sus productos de oxidación estables. Una importante vía de reacción fisiológica del $\cdot\text{NO}$ se da a través de su reacción con el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), dando lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO^-) cuya velocidad de reacción es del orden de $6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, la cual es 3 veces mayor que la reacción del $\text{O}_2^{\cdot-}$ con su enzima depuradora la superóxido dismutasa (Huie 1993). El ONOO^- presenta un alto poder oxidante y nitrante de residuos tirosina y triptofano proteicos, que ha sido vinculado con muchos de los efectos patológicos atribuidos al $\cdot\text{NO}$.

En la respuesta inmune los macrófagos reciben estímulos de diferentes citoquinas, donde la principal citoquina activadora es el IFN γ . Las citoquinas inhibidoras son la IL-4, IL-10 e IL-13, conocidas como citoquinas desactivadoras de macrófagos, las cuales inhiben muchas de las funciones macrofágicas. Estas tres citoquinas pueden inhibir la producción del $\cdot\text{NO}$ macrofágico dependiendo del estado de activación (Doherty 1995). Otra citoquina inhibitoria de la iNOS es el TGF β con un potente

efecto inhibitorio comparable a la magnitud de la IL-10 (Vodovotz 1997). Otros estímulos pueden inducir o inhibir la expresión de la iNOS, en especial los de origen infeccioso. Pueden inducir la expresión del iNOS el lipo-polisacárido (LPS) de la pared de bacterias Gram negativas, lipoproteínas de la pared de *Mycobacterium tuberculosis*, exotoxinas bacterianas como la pneumolisina del estreptococo pneumoniae o infecciones virales como el virus de la Hepatitis C. Contrariamente pueden inhibir la expresión de la iNOS patógenos como *Leishmania* o *Cándida albicans* (Bogdan 2000).

La función del *NO a nivel de la respuesta inmunitaria es ejercida en un amplio y diverso espectro. Participa de la respuesta anti-viral (Akaike 2000), (Colasanti 1999), de la regulación en la producción de citoquinas, expresión de receptores de superficie, proliferación y apoptosis celulares (Bogdan 2000). En la proliferación celular el efecto del *NO es variable, considerando que concentraciones fisiológicas son necesarias para la proliferación y que concentraciones supra-fisiológicas son capaces de inhibirla (Liew 1995). En muchos de estos procesos el *NO aparece con un doble rol, pero en particular en la apoptosis, son muchos los trabajos que lo muestran como una molécula con un rol pro y anti-apoptótico, dependiendo de la concentración a la que se encuentre, del microambiente en que se produce y del tipo celular donde se lo analice (Dimmeler 1997), (Nicotera 1997).

En cuanto a la relación *NO y VIH se demostró que existe un incremento en la producción de *NO en los macrófagos procedentes de pacientes VIH+ (el cual es inhibido por IL-4) (Bukrinsky 1995) así como en los macrófagos de controles sanos estimulados con la gp120 (Pietraforte 1994). En cuanto a los efectos del *NO en el curso de la infección por el VIH-1 los resultados concuerdan en el desarrollo de injuria neurológica, encontrando la iNOS expresada con mayor intensidad en los casos de SIDA-demencia severos con carga viral elevada, atribuyendo el aumento del *NO a la capacidad de la gp41 de inducir la expresión de la iNOS (Adamson 1996). De la misma manera la elevada expresión de la iNOS, de la superóxido dismutasa y de niveles elevados de nitrotirosina en biopsias cerebrales, han sido parte de los marcadores de deterioro neurológico ligado al VIH-1 (Boven 1999). Se ha establecido también una relación entre la presencia aumentada de nitritos con aumentos de la carga viral en pacientes VIH+ (Groeneveld 1996). En cuanto al valor de la iNOS como indicador de progresión de la enfermedad, recientemente se realizó un estudio analizando el polimorfismo en su región promotora no encontrando relación entre ellos (Hersberger 2004).

En la respuesta inmunitaria contra el VIH el rol del *NO es controvertido, mostrando efectos protectores (anti-virales) así como efectos perjudiciales (pro-virales). La misma dualidad se presenta en la modulación de la apoptosis, existiendo evidencias del *NO como agente anti-apoptótico y pro-apoptótico.

La evidencias de su rol pro-viral se observan en ensayos donde dadores de •NO estimulan la replicación del VIH-1 en LTCD4+ (Jiménez 2001) y en monocitos-macrófagos (Blond 2000). Por otra parte existen evidencias de un efecto antiviral específico del •NO contra el VIH a través de la inhibición de la transcriptasa inversa (Persichini 1999) y la proteasa virales (Persichini 1998) ambas necesarias en una replicación productiva viral. Otros autores (Mannick 1999) demostraron sobre PBMC que el •NO es capaz de inhibir la replicación del VIH-1 en la infección aguda y contrariamente es capaz de estimular su replicación en las células infectadas crónicamente.

En cuanto a la apoptosis en PBMC se ha sugerido el efecto pro-apoptótico del •NO (Albina 1993), buscando otros autores correlacionarlo con la apoptosis durante la infección por el VIH, no obteniendo resultados concluyentes (Hermann 1997). Recientemente se analizó el efecto pro-apoptótico del •NO, al estudiar *in vitro* PBMC de pacientes VIH+, en quienes la adición de dadores de •NO aumentó la apoptosis mientras que los inhibidores selectivos de la iNOS lograron una disminución en la misma en las PBMC procedentes de pacientes con bajo número de LTCD4+ (Mossalayi 1999). Por otra parte hay evidencias de un claro efecto anti-apoptótico del •NO (en modelos fuera del VIH) que lo mostraron capaz de bloquear la cascada apoptótica por inhibición de la activación de caspasas a diferentes niveles (Mannik 1995).

En una síntesis de los efectos producidos por el •NO en la infección por el VIH (Torre 2002) podemos decir que participa generando efectos que favorecen la replicación viral (provirales) y efectos que protegen a las células (antivirales). En los fenómenos provirales donde el •NO esta relacionado encontramos: a) favorece el incremento en la replicación viral tanto en macrófagos como en linfocitos T, b) en la neuropatogenia del VIH a nivel del sistema nervioso central contribuyendo al incremento de la injuria encefálica, c) induciendo la apoptosis en monocitos y linfocitos. En los fenómenos antivirales donde el •NO esta relacionado encontramos: a) induce una inhibición en la replicación viral y una inhibición en la actividad del VIH, b) produce un efecto citoprotector induciendo la expresión del correceptor de MIP-1alfa, c) produce un efecto anti-apoptótico sobre linfocitos.

Podemos decir que el efecto del •NO es doble (**doble rol o rol dual del •NO**), dependiendo del tipo celular involucrado y de la concentración a la que esté presente. Ese doble rol del •NO lo observamos tanto en los mecanismos inmunitarios de defensa, generando protección/injuria, así como en la modulación de la apoptosis, comportándose como una molécula anti-apoptótica/pro-apoptótica. Vale decir que el •NO tiene un efecto pleiotrópico en el sistema inmunitario, con una relación bifásica dosis dependiente tanto en su efecto sobre la apoptosis como sobre la respuesta inmunitaria frente al VIH-1, siendo capaz de lograr efectos provirales y efectos antivirales (Torre 2002).

Producción y detección del •NO en células vivas

En la detección de la producción de ERN y en particular del •NO disponemos de herramientas que nos permiten una determinación indirecta o directa. Una medida indirecta de la producción de •NO es la detección de sus productos de oxidación estables como son los nitritos y los nitratos, utilizando la reacción de Griess (Schmidt 1996) en forma aislada o previa reducción de nitratos a nitritos por medio de la nitrato reductasa para la medición combinada de ambos productos. Otra eventualidad es realizar la detección de nitrotirosina en proteínas celulares como huella molecular de la existencia de peroxinitrito. Si bien los trabajos iniciales demostraban el alto poder nitrante del peroxinitrito *in vitro*, actualmente existen evidencias *in vitro* que demuestran una pobre eficiencia en la nitración a las concentraciones y condiciones biológicas existentes *in vivo* (Pfeiffer 2001), (Radi 2004).

Recientemente se produjeron moléculas aceptoras del •NO, capaces de captarlo y emitir fluorescencia, moléculas diferentes a las previamente disponibles, mejorando las condiciones para su utilización con células vivas integras *in vitro* (Kojima 1998). Estas moléculas se denominaron 4-5-Diaminofluoresceína (DAF-2) y su equivalente permeable a la membrana celular el DAF-2 di-acetato (DAF-2DA). Para la detección de •NO a nivel de lisados celulares utilizamos el DAF-2 y para hacerlo a nivel intracelular con células integras utilizamos el DAF-2DA. En este último caso el •NO producido a nivel intracelular es desviado en parte, hacia la formación de Trióxido de Di Nitrógeno (N_2O_3). El DAF-2DA, un análogo permeable del DAF-2, es una molécula permeable a la membrana celular, capaz de permanecer en el compartimiento intracelular gracias a la hidrólisis realizada por esterasas citosólicas, transformándose en DAF-2. El DAF-2 es capaz de captar el N_2O_3 y formar el aducto fluorescente Triazolo-fluoresceína (DAF-2T) el cual emite fluorescencia (verde) y puede ser detectada por métodos fluorimétricos. Ambos constituyen moléculas específicas en la detección del •NO, adecuadas a las concentraciones de producción del mismo, teniendo el DAF-2 un límite para la detección del •NO de 5 nmol/L. La fluorescencia del DAF-2T decae con cifras de pH por debajo de 7,0 (Nagano 1999).

La utilización del DAF-2DA en microscopia de fluorescencia y citometría de flujo son relativamente recientes y los trabajos disponibles se limitan a líneas celulares o células normales y patológicas en modelos fuera de la infección VIH-1 (Lopez-Figueroa 2001), (Navarro-Antolin 2001), (Havenga 2001), (Takagi 2003), (Tiscornia 2004):

En cuanto a la expresión de la iNOS y producción de •NO en PBMC de pacientes VIH+ existe acuerdo en que a nivel monocito-macrofágico se produce una inducción de la iNOS y un aumento en la producción del •NO, no existiendo

acuerdo en el efecto que produce, ya que los resultados son controversiales como analizaremos.

En las alteraciones producidas por la infección del VIH-1 a nivel del sistema nervioso central, las evidencias disponibles apuntan en la misma dirección, concluyendo que el *NO producido por células de estirpe monocitaria (estimuladas por el VIH-1 o sus proteínas), tiene como resultado el desarrollo de injuria neurológica. Uno de los trabajos mas destacados es el de Adamson, donde la detección de la presencia de la iNOS se realizó por RT-PCR y WB y la producción de *NO midiendo la producción de nitritos (Adamson 1996).

Los trabajos disponibles que relacionan al VIH-1 y al *NO en PBMC están dirigidos en su mayoría a la evaluación de cómo se afectan la replicación viral y el desarrollo de apoptosis frente a la presencia o ausencia de *NO en modelos *in vitro*. Los trabajos donde se utilizan dadores de *NO o inhibidores de la NOS y la iNOS presentan entre si resultados contradictorios. Por una parte encontramos los efectos beneficiosos del *NO induciendo la expresión de correceptores como MIP-1alfa (Sherry 2000), la inhibición de la proteasa (Persichini 1998) y transcriptasa inversa (Persichini 1999). Por otra parte encontramos los efectos perjudiciales del *NO, existiendo evidencias de que su presencia induce el aumento en la replicación viral en macrófagos (Blond 2000) y linfocitos T humanos (Jiménez 2001), donde en ambos trabajos se detecta la expresión de la iNOS por RT-PCR y la detección de nitritos por Griess. Mas evidencias del rol pro-apoptótico del *NO es aportado por Mossalayi y col. con el estudio *in vitro* en PBMC de pacientes VIH+, encontrando que la adición de dadores de *NO produjo una apoptosis significativamente mayor en los pacientes con bajo número de LTCD4+ comparado contra los que presentan elevado número de LTCD4+. Encuentra que la inhibición de la producción del *NO endógeno rescató de la apoptosis los linfocitos de pacientes con bajo número de LTCD4+. En estos ensayos se detectaron nitritos por reacción de Griess y se utilizó SNAP (dador de *NO) y LMMA (inhibidor de la NOS) (Mossalayi 1999).

El doble rol del *NO en la patogenia del VIH-1 es reportado en los trabajos de Mannick y col. Utilizando dadores de *NO se llega a la conclusión de que el *NO es capaz de inhibir la replicación del VIH-1 en la infección aguda y al mismo tiempo es capaz de estimular la replicación del VIH-1 en las células crónicamente infectadas. Es una de las evidencias mas fuertes que documentan el doble rol del *NO en la infección por el VIH-1 (Mannick 1999).

En cuanto a la expresión de la iNOS y la producción de *NO a nivel de las PBMC de pacientes VIH+, los trabajos disponibles no son tantos, mostrando resultados contradictorios, siendo un punto clave en ellos (a nuestro entender) los métodos de detección de las ERN, donde en una gran proporción se utilizan métodos de baja

sensibilidad para el modelo de estudio diseñado lo que podría explicar las diferencias en los diferentes trabajos.

En ensayos clínicos el nivel de producción de ERN y de $\cdot\text{NO}$ *in vivo*, en la enorme mayoría de los trabajos, el análisis está limitado a la detección de nitritos mediante la reacción de Griess, como lo revisara Torre recientemente (Torre 2002).

En cuanto a la detección de la iNOS *in vivo* en PBMC de pacientes VIH+ el trabajo mas reciente (parte del Swiss HIV Cohort Study), se limitó al estudio del polimorfismo de la iNOS en los infectados por el VIH-1. En este trabajo no se realizaron medidas de la producción de $\cdot\text{NO}$ de ningún tipo así tampoco como de la presencia del mRNA de la iNOS en condiciones basales. Concluyen que la repetición CCTTT de la región promotora de la iNOS no está relacionada con la progresión del VIH hacia el SIDA (Hersberger 2004).

Los estudios de expresión de la iNOS y producción de $\cdot\text{NO}$ por las PBMC de pacientes VIH+ *in vitro* de mayor relevancia son los realizados por Bukrinski. En sus ensayos demuestra la producción de ERN a nivel de monocitos y astrocitos, midiendo la expresión de la iNOS por RT-PCR, los nitritos por reacción de Griess y la producción de $\cdot\text{NO}$ mediante un equipo resonancia paramagnética electrónica (electrón paramagnetic resonance - EPR). Demuestra en la infección aguda (sobre monocitos procedentes de PBMC) y en la infección crónica (en astrocitos procedentes de muestras biopsicas cerebrales de pacientes VIH+) que se produce $\cdot\text{NO}$ en respuesta a diferentes estímulos activadores. Para el caso de los monocitos la expresión de la iNOS comienza a ser detectada entre el 5° y 8° día de la infección y la producción de nitritos a partir del 7° día (Bukrinski 1995).

Otro estudio relevante es el de Hermann quien mide la concentración de nitritos mediante la técnica de Griess y la expresión de la iNOS por RT-PCR concluyendo que no existe una elevación del $\cdot\text{NO}$ producido por PBMC de pacientes VIH+ pero que si esta involucrado en la apoptosis linfocitaria espontánea (Hermann 1997).

Las hipótesis de trabajo

Resultados publicados por nuestro grupo mostraron que el peroxinitrito se produce normalmente en las respuestas inmunes tanto *in vitro* como *in vivo*, siendo capaz de inducir una susceptibilidad aumentada a la muerte celular apoptótica (Brito 1999). No obstante, la nitración de proteínas en PBMCs provenientes de personas seropositivas para el VIH mediante citometría de flujo, reveló una disminución significativa comparada con sujetos normales. La existencia de nitrotirosina la consideramos como la "huella molecular" de la producción de peroxinitrito, el cual con su alto poder nitrante sobre residuos de tirosina y triptofano, podría ser utilizado como evidencia de su formación.

Una primera hipótesis la formulamos tomando datos de la literatura junto con nuestros resultados, planteando que la producción de $\cdot\text{NO}$ podría tener dos etapas diferentes. Una primera etapa, en los estadios iniciales de la infección, ligada a una respuesta Th1 inductora de la iNOS llevando a la producción aumentada del $\cdot\text{NO}$ y una segunda etapa, presente en estados de inmunodeficiencia severa, ligada a una respuesta dominante Th2, inhibitoria de la expresión de la iNOS y por tanto disminuyendo la capacidad de producción de $\cdot\text{NO}$ en la etapa SIDA.

Propusimos que en etapas iniciales de la enfermedad la hiperactivación del sistema inmune y predominio de respuestas antivirales de tipo Th1 llevan a un aumento de la expresión de la iNOS y de la producción del $\cdot\text{NO}$ a nivel monocito-macrofágico (y eventualmente linfocitario). En esta etapa habrían concentraciones suprafisiológicas de $\cdot\text{NO}$ que podrían conducir a la apoptosis a través de la generación de especies reactivas del $\cdot\text{NO}$ altamente nocivas como es el caso del ONOO-. En la progresión de la inmunodeficiencia se produciría un predominio de citoquinas Th2 que producirían una potente inhibición de las respuestas Th1. Esto llevaría a una disminución progresiva en la expresión de la iNOS durante las respuestas inmunes, con una disminución significativa o virtual ausencia de $\cdot\text{NO}$ que provocaría la pérdida de su efecto anti-apoptótico (observado a concentraciones fisiológicas) y de la actividad microbicida del sistema monocito-macrófago (desarrollando mayor susceptibilidad a infecciones oportunistas).

Una segunda hipótesis de trabajo consistió en considerar que la adición de IL-2 podría recuperar el predominio Th1 y lograr inducir la expresión de la iNOS. La adición de IL-2 sería capaz de revertir esta situación hacia respuestas inmunes capaces de recuperar la expresión de iNOS y la producción del $\cdot\text{NO}$ con la consecuente inhibición del proceso apoptótico y la restauración de su actividad microbicida.

Las hipótesis de trabajo quedan entonces expresadas de la siguiente forma:

1) En la progresión de la enfermedad existiría una disminución en la producción del $\bullet\text{NO}$ mayor cuanto mas severa es la inmunodeficiencia, induciendo una predisposición aumentada a infecciones oportunistas e incrementando la tendencia a la apoptosis linfocitaria.

2) El $\bullet\text{NO}$ se produciría en diferentes concentraciones a lo largo de la infección, planteando una elevada producción en etapas iniciales (como consecuencia de una hiperactivación del sistema inmune) y una baja producción en etapas de inmunodeficiencia severa. Las alteraciones en la expresión de la iNOS y en la producción del $\bullet\text{NO}$ serían diferentes según el estadio de la enfermedad, variando acorde al perfil de secreción citoquinas predominante.

3) La deficiencia en la producción de IL-2 característica de la infección por VIH podría estar implicada en la deficiencia del $\bullet\text{NO}$, pudiendo este mecanismo estar en la base de los efectos beneficiosos de la terapia antirretroviral combinada con IL-2.

2) OBJETIVOS

En lo general:

El objetivo general fue conocer la capacidad de las PBMC para producir ERN, en particular de $\bullet\text{NO}$, analizando las diferencias en su producción en condiciones basales y de activación, comparando la respuesta inmunitaria del individuo inmunocompetente y la desarrollada en la inmunodeficiencia producida por el VIH-1. Como parte de este objetivo general nos propusimos identificar el origen celular de la producción del $\bullet\text{NO}$, buscando identificar y diferenciar la producción monocitaria de una eventual producción linfocitaria en PBMC de pacientes infectados por el VIH-1.

En lo específico:

-determinar *in vitro* el efecto del $\bullet\text{NO}$ en la proliferación y en la apoptosis de las PBMC de individuos normales y de pacientes VIH+, mediante el uso de dadores de $\bullet\text{NO}$ e inhibidores de la NOS.

-realizar el análisis comparativo de la expresión de la iNOS mediante RT-PCR cualitativa entre células de individuos sanos y de pacientes VIH+. Analizar diferencias en la expresión de la iNOS en pacientes VIH+ dentro y fuera de la etapa SIDA.

-determinar la producción de ERN a nivel de las PBMC control y de pacientes VIH+, a través de:

- a) determinación de nitritos en plasma y sobrenadante de cultivo celulares.
- b) detección de nitración de proteínas.
- c) determinación de la producción diferencial de $\bullet\text{NO}$ en monocitos y linfocitos en ambos grupos mediante el uso de sondas fluorescentes específicas para el $\bullet\text{NO}$.

3) MATERIALES y METODOS

I) Características de los individuos incluidos en el presente proyecto

Para el presente proyecto se utilizó sangre periférica obtenida por punción venosa previo consentimiento informado voluntario.

Selección de pacientes VIH+ y criterios de inclusión: los pacientes incluidos en los estudios realizados en este trabajo, cumplieron con las siguientes características:

- serología positiva para VIH-1 confirmada por Western Blot
- no estar recibiendo tratamiento antirretroviral contra el VIH-1
- no estar recibiendo tratamiento corticoideo en el momento de la extracción de la muestra sanguínea debido a su efecto modulador negativo en la expresión de la iNOS.

-de preferencia se incluyeron aquellos pacientes con un recuento linfocitario y determinación de carga viral plasmática, realizada dentro de los últimos 6 meses (la ausencia de estos datos no implicó la exclusión de los pacientes).

Los criterios de inclusión señalados nos posibilitaron conocer la respuesta inmunitaria de las personas infectadas por el VIH-1 en ausencia de tratamientos farmacológicos antivirales y en diferentes etapas evolutivas de la infección.

Selección de individuos normales: las muestras provinieron de donantes clínicamente normales al momento del estudio, en un rango etario comparable al de los sujetos seropositivos. Fueron incluidos individuos con serología negativa para el VIH, que en el momento de extraer la muestra sanguínea no presentaran signo-sintomatología de proceso infeccioso en curso y que no se encontraran recibiendo tratamiento corticoideo. Obtuvimos sangre de 5 individuos, 1 mujer y 4 hombres con una edad promedio de 36 años (obteniéndose sangre en mas de una ocasión).

Características clínicas y paraclínicas de los pacientes incluidos: incluimos un total de 14 pacientes VIH+, 5 de sexo femenino y 9 de sexo masculino (tabla Ia). La edad promedio fue de 39 años. Al momento de obtención de la muestra un total de 8 (57%) se encontraban en etapa SIDA. De los 8 pacientes, solo en 4 disponíamos de LTCD4+ teniendo un promedio en ellos de 61 LTCD4+/ul. La complicación infecciosa mas frecuente marcadora de SIDA en el momento de realizar el estudio fue la tuberculosis seguido de la infección por Cándida.

Del total de 14 pacientes estudiados, solo 4 de ellos no presentaban en ese momento signo-sintomatología de una infección clínica evidente concomitante a la infección por el VIH-1.

Nº de código	Sexo	Edad	Etapas Infección (CDC)	Complicación al Ingreso	Linfocitos/uI	LTCD4+/uI (últimos 6 meses)	CVP Copias/ml (últimos 6 meses)	Estudios hechos en este trabajo
+1	F	48	A1	Síndrome Depresivo	4200	750	-	PCR, WB, SR
+2	M	31	A2	Nefropatía por VIH	3800	350	-	PCR, SR
+3	M	36	C3	Criptococosis Meníngea	490	30	-	PCR, SR
+4	M	38	C3	Linfoma No Hodgkin	1900	128	400.000	PCR
+5	F	24	C	Neumonía Pneumocistis Carini.	910	522 (hace 16 meses)	11739 (hace 14 meses)	PCR
+6	M	22	C3	TBC pulmonar	700	50	-	PCR, WB, Gri
+7	M	25	A1	Celulitis de antebrazo	3000	559	940	PCR, WB, FL, Gri
+9	F	69	A1	Primo-infección VIH y VHC	2300	-	-	PCR, WB
+10	F	61	A2	Hematuria	1800	234	-	PCR
+11	M	37	C3	Candidiasis esofágica Diarrea a BGN	440	36	-	PCR, MFL
+12	F	46	C	Candidiasis esofágica TBC Meníngea	800	-	-	PCR, MFL
+13	M	44	C3	Toxoplasmosis Encefálica	1900	180 (hace 12 meses)	360.000 (hace 12 meses)	MFL
+14	M	31	A2	Celulitis de cara	1300	256	16426	Cit-Flujo
+15	M	41	C	TBC pulmonar probable MAC	300	-	-	Cit-Flujo

TABLA I: características clínicas y paraclínicas de los pacientes estudiados. Abreviaturas utilizadas: CVP: carga viral plasmática; Cit-Flujo: estudios de citometría de flujo; FL: análisis de fluorimetría; Gri: técnica de Griess; MFL: estudios de microscopía de fluorescencia; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; SR: detección de iNOS por sondas radioactivas; WB: western blot para nitrotirosina.

Obtención de la muestra: los pacientes incluidos fueron reclutados en el Hospital de Clínicas (Clínica Médica "C"), en el Servicio de Enfermedades Infeccio-Contagiosas (SEIC) y en el Hospital Maciel (Clínica Médica "1"). En todos los casos solicitamos consentimiento informado al paciente, así como al equipo médico tratante. Se extrajeron 10 a 15 ml de sangre periférica anticoagulando con heparina sódica, en tubo estéril. Dentro de las dos horas de extraída, la sangre fue procesada en el laboratorio, comenzando la extracción de las PBMC.

Limitantes en el trabajo con pacientes VIH+: el bajo número de PBMC obtenido en muchos pacientes condicionó la cantidad de ensayos que con esa muestra se pudieron realizar. Esto explica lo aleatorio del tipo de ensayos que se hicieron en cada paciente y por eso consideramos oportuno destacarlo en este momento. Las

principales limitantes fueron las propias de la infección por VIH-1 sumado a las limitantes técnicas.

Existe una natural tendencia a la leucopenia (con linfopenia) propia del VIH-1, como resultado del efecto citopático directo e indirecto del virus sobre las células CD4+, llevando al descenso principalmente de linfocitos. A esto debemos sumarle la depresión medular y toxicidad medular secundaria a las infecciones intercurrentes. A su vez, dentro de las PBMC obtenidas se produce una pérdida linfocitaria resultado de la apoptosis incrementada característica de los linfocitos de estos pacientes. A estas dificultades debemos agregarle dos limitantes técnicas: durante el proceso de aislamiento por gradiente de densidad se produce una pérdida inevitable del número de células y que durante el procesos de activación linfocitaria, se produce un incremento en la fragilidad celular que las hace mas propensas a destruirse y por tanto a disminuir su cifra.

II) Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La purificación de células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells) (PBMC) se realizó mediante gradiente de densidad utilizando Histopaque (Histopaque-1077, Sigma diagnostics). Brevemente, la sangre heparinizada fue diluida al medio en PBS a temperatura ambiente y depositada sobre solución de Ficoll-Metrizoato en una relación de volúmen 3:1 respectivamente. Seguidamente se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 800xg. Mediante pipeta estéril se procedió aspirar la interfase que incluye las PBMC.

La suspensión celular fue lavada 3 veces en PBS centrifugando durante 10 minutos a 400xg. Finalmente en función del recuento celular las células fueron resuspendidas en medio de cultivo (RPMI) con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10% a las concentraciones especificadas para cada caso.

III) Cultivos in vitro, ensayos de proliferación celular y determinación de apoptosis.

IIIa) Efecto de dadores de $\cdot\text{NO}$ e inhibidores de la NOS en la proliferación de PBMC de individuos normales

Cultivos de PBMC: las PBMC aisladas fueron resuspendidas en medio RPMI con SBF 10%, a una concentración de $1 \times 10^6/\text{ml}$. 100ul por pocillo de la suspensión celular fueron depositadas en placas estériles de 96 pocillos. Los cultivos se realizaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% durante los períodos indicados.

Ensayos de proliferación: Luego de 48 horas de cultivo se adicionó 1 uCi/pocillo de timidina tritiada (^3H -Timidina) y las placas fueron cultivadas por un período adicional de 24, siendo luego almacenandas a -80°C hasta su análisis. En todas las condiciones de cultivo las muestras se realizaron por triplicado. La detección de los valores de incorporación de ^3H -Timidina se realizó en un contador de radiación beta y los resultados expresados como la media de los triplicados en cuentas por minuto (cpm).

Activación linfocitaria. Analizamos 3 condiciones diferentes: a) sin activación (basal), b) activación con anticuerpos policlonales anti-CD3 a 1 ug/ml y fitohemaglutinina (PHA) a 5 ug/ml y c) activación con anti-CD3, PHA e IL-2 a 20 U/ml.

Dadores de $\cdot\text{NO}$ e inhibidores de la Oxido nítrico sintetasa (NOS). Los dadores de $\cdot\text{NO}$ utilizados fueron el SNAP (S-Nitroso-N-acetyl-D, L-penicilamina) y el NOC-18 (Alexis Biochemicals). El SNAP tiene una vida media 5 hs, donde por cada mol de SNAP se libera un mol de $\cdot\text{NO}$, logrando proporcionar un aporte de $\cdot\text{NO}$ de breve duración al medio celular. Las concentraciones finales de SNAP fueron de 50, 100 y 200 uM. Se hizo una solución stock 40mM en metanol con posterior filtración con filtros de 0.22 micras para conservar la esterilidad.

El NOC-18 tiene una vida media de 20hs, donde por cada mol de NOC-18 se liberan dos moles de $\cdot\text{NO}$, logrando a estas concentraciones un flujo sostenido y mas prolongado en el tiempo comparado al SNAP. El NOC-18 utilizado fue preparado en el mismo momento de realizar el ensayo a partir de una solución stock 25 mM fresca en buffer fosfato 25 mM, pH 11,4 filtrándolo para conservar la esterilidad) y protegiéndolo de la luz. Las concentraciones finales de NOC-18 fueron de 5, 10, 20, 40 y 80 uM.

Todas las dosis finales utilizadas para el SNAP y el NOC-18 no poseen efectos tóxicos para la célula, lo cual fue demostrado mediante ensayos de viabilidad celular con colorantes de exclusión (trypan blue) luego de 24 horas de incubación.

Inhibidores de la producción de $\cdot\text{NO}$: el inhibidor utilizado fue el L-NAME (L-Nitro-L-arginina-methyl ester) el cual es un inhibidor de las NOS (no específico de la iNOS). Para evaluar la especificidad de este inhibidor, lo comparamos con su isómero el D-NAME, metabólicamente inactivo. Preparamos una solución stock de 100 mM y ambos los utilizamos en concentraciones finales de 5, 10 y 20 mM previa demostración de la ausencia de efectos tóxicos a nivel celular.

IIIb) Inhibidores de la producción de $\cdot\text{NO}$ y su relación con la apoptosis en PBMC normales: efecto del L-NAME en la apoptosis celular.

Para determinar la relación existente entre la apoptosis celular y la ausencia del $\cdot\text{NO}$ endógeno en nuestro modelo experimental utilizamos el marcado celular con Anexina-V conjugada a la fluoresceína mediante citometría de flujo. Este método se basa en que uno de los eventos mas precoces de evolución a la apoptosis es la pérdida de la asimetría de la membrana externa celular, por la cual la fosfatidilserina sale de su posición normal en la cara interna y pasa a una posición anómala en la cara externa. Este fosfolípido de membrana, en presencia de calcio, puede unirse con alta afinidad a la Anexina-V, la cual conjugada a un marcador fluorescente como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Anexina-V-FITC) puede ser utilizada por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia para identificar células en apoptosis.

Análisis por citometría de flujo: Aproximadamente $0.5-1 \times 10^6$ células fueron lavadas en PBS y resuspendidas en 100 microlitros de RPMI-1640 en presencia de anticuerpos anti-CD4-Cy5PE y anti-CD8-PE incubándolos 30 minutos a 4°C protegidos de la luz. Luego de lavadas en PBS, las células se resuspendieron en 500 μl de buffer de unión para Anexina-V (con elevada concentración de calcio para permitir la unión a la fosfatidilserina), se adicionaron 2 μl de Anexina-FITC y se incubó durante 10 minutos para posteriormente hacer su análisis en citometría de flujo dentro de los primeros 30 minutos luego de la adición de anexina. PBMC sin marcar se utilizaron como control negativo y de ajuste para evaluar la autofluorescencia de las células. El equipo utilizado para la citometría de flujo fue un analizador FACScalibur (Beckton-Dickinson), realizando la adquisición y análisis sobre la ventana linfocitaria.

IIIc) Determinación por citometría de flujo de la presencia de nitrotirosina y su asociación con apoptosis en PBMC normales y de pacientes VIH+.

En cuanto a la producción de las ERN sabemos que una de las formas posibles de estudiarla es determinando la presencia de nitrotirosina, pudiendo hacerlo mediante citometría de flujo para lo cual utilizamos un anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina (hecho en conejo) conjugado a la Ficoeritrina (PE), capaz de unirse a la nitrotirosina de las proteínas celulares. Se aislaron PBMC normales y de pacientes

VIH+, se resuspendieron en RPMI-SBF 10% y se distribuyeron en pocillos de placas de cultivo a razón 1×10^6 PBMC por mililitro de RPMI, manteniendo durante 24 horas en cultivo a 37°C y con CO_2 al 5%. Tanto para las PBMC normales como para las de pacientes VIH+ se definieron 2 condiciones: a) tiempo cero (condiciones basales) y b) tiempo 24 horas post-activación linfocitaria. La activación se realizó con el anticuerpo anti-CD3 y PHA.

Transcurrido el tiempo aspiramos con micropipeta desde los pocillos las PBMC y fueron lavadas en PBS y resuspendidas en 100 μl de RPMI en presencia de anticuerpos anti-nitrotirosina-PE incubándolo 30 minutos a 4°C protegido de la luz. Luego se resuspendió la muestra en 500 μl de buffer de unión para Anexina-V (con elevada concentración de calcio para permitir la unión a la fosfatidilserina), se adicionaron 2 μl de Anexina-FITC y se incubó durante 10 minutos para posteriormente hacer su análisis en citometría de flujo. Se dejaron PBMC sin marcar para evaluar la auto-fluorescencia de las células. El equipo utilizado para la citometría de flujo fue un analizador FACScalibur (Beckton-Dickinson) realizando la adquisición y el análisis sobre la ventana linfocitaria.

Extracción y purificación del RNA total: partimos del lisado de los pellets de PBMC (de cada tubo y para un mismo paciente) utilizando 500 μl de lisis buffer (control para realizar la extracción del RNA total) (reactivo que, según la recomendación del fabricante de guanidinio-fenol-cloroformo) (Guanizyma) y agregamos 100 μl de cloroformo dejamos 15' a temperatura ambiente a $12000g$ por $15'$ a 4°C . La fase superior (acuosa) se transfirió a otro eppendorf agregando 250 μl de isopropanol a temperatura ambiente y centrifugamos a $12000g$ por $15'$ a 4°C . Eliminamos el sobrenadante, dejando el precipitado sobre la pared del tubo. Lavamos el pellet con 50 μl al 75% Centrifugamos $2'$ a $12000g$ a 4°C . Eliminamos el sobrenadante al 75% y resuspendimos el precipitado de RNA total en 25 μl de agua. La concentración de ARN y su grado de pureza fueron determinados espectrofotométricamente mediante lecturas de absorbancia con espectrofotómetro a 260 y 280 nm de longitud de onda. Se definieron los valores de concentración de ARN por cada muestra. La relación de la concentración de ARN de las muestras post-activación y pre-activación fue igual o superior a 1.

Reacción de síntesis de cDNA: fue realizada con el kit de síntesis de cDNA (SuperScript II RTase) (Life Technologies) agregando primers Oligo dT (10 μl a 10^{-5} M) y 10 μl de la mezcla de enzimas (SuperScript II RTase) (Life Technologies) en un volumen final de 20 μl . Mantuvimos la reacción a 37°C por 10'.

IV) Expresión del mRNA de la iNOS y de la enzima iNOS en PBMC

IVa) Expresión del mRNA de la iNOS:

Nested PCR del mensajero de la iNOS. Las PBMC fueron resuspendidas en medio RPMI con SBF al 10%, obteniendo una suspensión celular de PBMC de 5×10^6 /ml en los casos de PBMC normales. En los pacientes VIH+ el número promedio de PBMC en cada tubo fue de $7,3 \times 10^6$ /ml. La suspensión celular fue distribuida en 5 tubos eppendorf, conteniendo el mismo número de PBMC por tubo para un mismo paciente. Los diferentes pellets celulares cultivados en diferentes condiciones fueron centrifugados durante 3 minutos a 3000 rpm para obtener el pellet celular, descartar el sobrenadante, lizarlo con 500 μ l de TRI-reagent para extraer el ARN total y conservarlo a -20°C para su posterior procesamiento. Analizamos una cinética de inducción bajo diferentes condiciones de estimulación a cero hora, 4 horas y 7 horas post - activación. Sobre PBMC normales realizamos un ensayo de manera adicional, para comparar los estímulos inductores, ampliando el tiempo de análisis, observando la expresión de la iNOS hasta 12 hs post-activación linfocitaria.

Extracción y cuantificación del RNA total: partimos del lisado de los pellets de PBMC (en igual número en cada tubo y para un mismo paciente) utilizando 500 μ l de TRI-reagent (Sigma) para realizar la extracción del RNA total (reactivo que utiliza la técnica del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo) (Chomczynski and Sachi, 1987). Luego agregamos 100 μ l de cloroformo dejamos 15' a temperatura ambiente, centrifugando a 12000g por 15' a 4°C . La fase superior (acuosa) fue recuperada y transferida a otro eppendorf agregando 250 μ l de isopropanol. Dejamos 10' a temperatura ambiente y centrifugamos a 12000g por 10' a 4°C . Descartamos el sobrenadante, dejando el precipitado sobre la pared del tubo y agregamos 1 ml de etanol al 75%. Centrifugamos 5' a 12000g a 4°C . Dejamos secar durante 15' a 37°C y resuspendimos el precipitado de RNA total en 25 a 50 μ l de H_2O estéril. La concentración de ARN y su grado de pureza fueron determinadas espectrofotométricamente mediante lecturas de absorbancia con diluciones 1/100 de las muestras a 260 y 280 nm de longitud de onda. Se utilizaron los valores de equivalencia de 40 μg /ml de ARN por cada unidad de D.O. para determinar la concentración en ARN de las muestras problema. Se consideraron aquellas muestras cuya relación 260/280 fue igual o superior a 1.7.

Síntesis del cDNA: la síntesis de cDNA fue realizada utilizando 3 μg de RNA total de cada muestra, agregando primers Oligo-dT, 0,5 mM de dNTPs, DTT y 200 U de Transcriptasa inversa (Superscript II RNase, Gibco BRL Life Technologies) contenidos en un volumen final de 20 μ l. Mantuvimos la reacción a 42°C durante 50', finalizando con 70°C por 10'.

Puesta a punto de la PCR de la iNOS y la GAPD: Para controlar este procedimiento se utilizó la amplificación de la enzima constitutiva Glicerualdehído 3-Fosfato Deshidrogenasa (GAPD). En nuestro diseño experimental la detección de la GAPD cumplió con dos objetivos: a) controlar la extracción del RNA y la síntesis del cDNA y b) posibilitarnos realizar una semi-cuantificación al comparar la relación en la expresión iNOS/GAPD, considerando la intensidad de la expresión de la GAPD como la unidad de referencia.

Para amplificar el mRNA de la GAPD el par de primers utilizado fue GAPD Fow 5'-CTG AGA ACG GGA AGC TTG TC-3' y GAPD Rev 5'-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG-3' (XXIDT Int-Tech) los cuales amplifican un fragmento de 600 pb.

Para amplificar el mRNA de la iNOS en su región media diseñamos una Nested-PCR realizando un primer round con un par de primers externos que amplifican un fragmento correspondiente a los exones 12 a 19 y un segundo round con la utilización de un par de primers internos que amplifican un fragmento ubicado entre los exones 13 a 16, teniendo como resultado de la amplificación un fragmento de 317 pb (figura IV). Los primers externos utilizados fueron NOS2-Fext 5'-GGC AGG ACG AGA AGC GGA GAC CC-3', NOS2-Rext 5'-GCT CCC CCG GCA GGT AGT TCA GG-3' y los primers internos utilizados fueron NOS2-Fint 5'-GGC GTC CCG AGT CAG AGT CAC C-3', NOS2-Rint 5'-GAG CAA AGG CGC AGA ACC GAG GG-3' (Operon Tech).

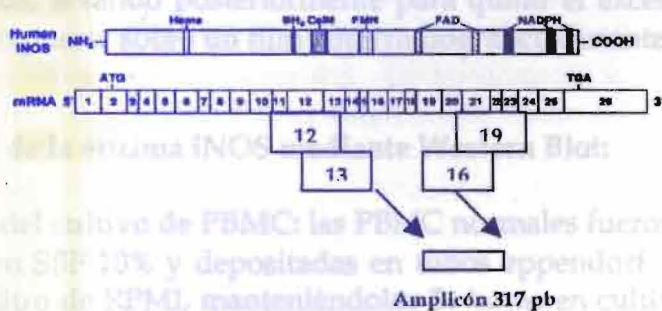


Figura IV: Gen de la iNOS humana y su RNA conteniendo 26 exones. Se señalan los sectores de la primera amplificación entre los exones 12 a 19 y de la segunda amplificación entre los exones 13 a 16. Se obtuvo un fragmento amplificado de la iNOS de 317 pb.

En la puesta a punto de la PCR utilizamos un termociclador Omn-E Thermal Cycler - Hybaid PCR (Hybaid Limited). Ensayamos diferentes temperaturas de annealing y diferentes tiempos en el termociclador, utilizando una Taq DNA polimerasa recombinante (*Thermus aquaticus*) (ATgen-Sistemas Moleculares).

El primer round de la Nested-PCR de iNOS y la PCR de la GAPD, utilizamos las siguientes condiciones: 95°C por 4', luego 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30'', annealing a 58°C por 1' y extensión a 72°C por 1', finalizando con una extensión de 72°C por 10'. Para el segundo round de la Nests-PCR de la iNOS

utilizamos 20 ciclos y una temperatura de annealing de 60°C por 1', conservando el resto de las características restantes del primer round.

La identidad de los fragmentos amplificados fueron determinadas por secuenciado nucleotídico del fragmento amplificado.

Detección de los fragmentos amplificados: los amplicones obtenidos fueron analizados sobre geles de agarosa al 1%. En aquellos casos donde no pudo lograrse la visualización del fragmento amplificado en geles de agarosa con bromuro de etidio, utilizamos métodos de detección mas sensibles, recurriendo para ello a electroforesis en geles de acrilamida con tinción con nitrato de plata y a la detección sobre películas radiográficas mediante utilización de sondas radioactivas (southern-blot). Para este último método se diseñó una sonda específica de unión al fragmento de la iNOS amplificado que pudiéramos marcarla con Fósforo radioactivo (^{32}P). Brevemente, el producto de amplificación de una PCR de la iNOS fue corrido en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE. Bajo transiluminador UV procedimos a recortar la banda de 317 pb para proceder a su purificación utilizando Gene-Clean Kit (Bio 101-Promega). Dicho amplicón fue marcado con ATP radioactivo utilizando el Ready-Primer-Kit (Promega) de acuerdo a las especificaciones aportadas por el fabricante. Para la detección por southern blot, se procedió a la transferencia pasiva de los geles de agarosa hacia membranas de nylon (Hybond N+). Luego bloqueamos la membrana y la incubamos con 10 ul de la sonda marcada, lavando posteriormente para quitar el exceso de la misma. La membrana fue expuesta sobre un film autorradiográfico durante 72 horas a -80 °C.

IVb) Detección de la enzima iNOS mediante Western Blot:

Características del cultivo de PBMC: las PBMC normales fueron resuspendidas en medio RPMI con SBF 10% y depositadas en tubos eppendorf a razón de 7×10^6 PBMC por mililitro de RPMI, manteniéndolas 24 horas en cultivo a 37°C y con 5% CO_2 . Transcurrido el tiempo se obtuvieron los pellet celulares y se homogeneizaron en buffer de lisis (Tris 25 mM pH 7.5 al 2% de SDS y glicerol 5%) y se conservaron a -20°C hasta la realización del WB. Definimos 4 condiciones: a) tiempo cero (condiciones basales), b) sin activación a 24 horas, c) activación a 24 horas y d) activación a 24 horas en presencia de IL-2. Se midió la concentración proteica por el método del ácido Bicinconínico (BCA) (Bicichoninic acid method, Pierce, Rockford, IL, USA) y 50 ug de proteínas totales fueron sembradas por línea en geles de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) al 8%.

Las muestras conteniendo 50 ugr de proteínas fueron mezcladas con el buffer de la muestra (Tris-HCL 10 mM, pH 6,8, SDS 1% y glicerol 5%) y sometidas a 94 °C durante 5 minutos. Sembramos las muestras en el gel de stacking, incluyendo los pesos moleculares (PM), los lisados de PBMC de 4 individuos normales y un control positivo (lisado de macrófagos de ratón activados).

Electro-transferencia de la producción de especies reactivas del nitrógeno

Electro-transferencia a membranas de nitrocelulosa: para la transferencia utilizamos membranas de nitrocelulosa con poros de 0,45 μm de diámetro. La electro-transferencia se realizó con buffer Tris-glicina-etanol al 20 %, durante 2 horas a 250 mA constantes y a 100 Volt. Finalizada la transferencia teñimos con rojo Ponceau para verificar la correcta transferencia y lavamos con PBS. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados incubando las membranas durante toda la noche en una solución de bloqueo hecha con PBS-Tween 0,1% con BSA 5% (50 ml por cada membrana) a 4°C. Se lavaron las membranas de nitrocelulosa en agitación durante 5 minutos 1 vez con solución de lavado hecha con PBS-Tween 0,1%.

Realizando la medida de la acumulación de sus productos: el nitrato (NO_3^-) y el nitrato (NO_2^-). Como esta técnica se

Incubación de anticuerpos: para la inmuno-detección de la iNOS utilizamos un anticuerpo policlonal anti-iNOS hecho en conejo (anti-iNOS rabbit, BD Transduction laboratorios, Lexington, KY, USA) el cual está dirigido contra el sector carboxi-terminal de la proteína iNOS (aminoácidos 961-1144) que muestra reactividad contra la iNOS humana. El anticuerpo primario anti-iNOS se utilizó en diluciones 1/500 y 1/1000 en solución PBS-Tween 0,1%, albúmina 1 mg/ml incubando por 2 horas (preparándose 4 ml por cada nitrocelulosa). Realizamos 4 lavados de 5 minutos cada uno con solución de lavado. Posteriormente las membranas fueron incubadas en presencia de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a la peroxidasa (DAKO, Paris, France) diluido 1/2000 en una solución PBS-Tween 0,1%, albúmina 1 mg/ml, incubándolo durante 1 hora (preparándose 4 ml por cada nitrocelulosa). Posteriormente se realizaron 4 lavados de 5 minutos cada uno en solución de lavado. Los western fueron revelados por quimioluminiscencia utilizando ECL Supersensible (Enhanced chemiluminescence detection supersignal system, Pierce, Rockford, IL, USA) utilizando film radiográfico de alta sensibilidad, realizando exposiciones secuenciales entre 1 y 15 minutos.

El tiempo de exposición a la luz de longitud de onda.

El tiempo de exposición y como control positivo se realizó una curva estándar de

Re-incubación de anticuerpos primario y secundario en membranas de nitrocelulosa: para re-utilizar las membranas electro-transferidas, utilizamos un protocolo de "stripping" mediante el cual logramos eliminar los anticuerpos y la solución de bloqueo, para luego reiterar la secuencia correspondiente. La solución de stripping se compone de Tris-HCL 62,5 mM pH6,7, 2-mercapto-etanol 100 mM y SDS 2%. Se incubaron las membranas en 50 ml de esta solución durante 5 a 30 minutos a 50°C, se lavaron y se reinició de este punto con el bloqueo de las membranas.

El pH de la solución de stripping por 300 μl de muestra se preparó una solución de 100 μl de muestra. Como blanco utilizamos H₂O y PBS con SDS concentrado a 200 mM y NBDH en diferentes proporciones que para las

V) Determinación de la producción de especies reactivas del nitrógeno

Va) Detección de nitritos en el sobrenadante de cultivos de PBMC. Utilización de la técnica de Griess.

Como primera aproximación a la producción de ERN por las PBMC, nos planteamos realizar la medida de nitritos (productos estables de degradación del $\cdot\text{NO}$) en el plasma y en el sobrenadante de cultivos de PBMC normales y procedentes de pacientes VIH+ utilizando para esto la técnica espectrofotométrica clásica de Griess (Schmidt 1996). Mediante la misma es posible estimar la producción de $\cdot\text{NO}$ realizando la medida de la acumulación de sus productos estables de degradación: el nitrito (NO_2^-) y el nitrato (NO_3^-). Como esta técnica sólo mide la presencia de nitrito, la determinación de nitratos requiere un paso previo de reducción utilizando la nitrato reductasa. Debemos considerar que el $\cdot\text{NO}$ puede oxidarse a nitrito o en nitrato en diferente proporción dependiendo de las condiciones del microambiente y del potencial redox del medio biológico. Debe tenerse en cuenta por tanto que el $\cdot\text{NO}$ medido bajo forma de nitrito no necesariamente es el $\cdot\text{NO}$ producido por el sistema en cuestión. La sensibilidad de detección de estos compuestos alcanza rangos en el orden de nanomolar para los nitritos (límite inferior de sensibilidad de 250 nm) y de micromolar para los nitratos. Un paso que aumenta la sensibilidad en la detección de nitritos en fluidos biológicos es la utilización de una enzima con alta especificidad por el nitrato, la nitrato reductasa la cual reduce el nitrato transformándolo en nitrito. A 300 μl de sobrenadante de cultivo (previamente incubado por 10 min a 4°C) se le adicionaron secuencialmente 150 μl de solución de P-amino-benceno-sulfonamida (sulfanilamida) al 1% en H_2O y posteriormente 150 μl de N-1-naftil-etilendiamina (NEDA) al 0,5% en ácido acético al 30%. La reacción transcurrió a temperatura ambiente y protegida de la luz directa, leyendo posteriormente en espectrofotómetro a 570 nm de longitud de onda.

Para la cuantificación y como control positivo se realizó una curva estandar de calibración con concentraciones conocidas de nitrito de sodio entre 62.5 μM y 0.12 μM (NaNO_2), que resuspendimos en medio RPMI y en buffer KRP (Krebs, Ringer, Fosfato, Glucosa). La utilización del buffer KRP se consideró necesaria dado que es incoloro (sin indicadores de pH) evitando de esta manera interferencias agregadas, siendo además capaz de mantener la viabilidad celular durante el tiempo que requiere el análisis. El buffer de KRP se utilizó a pH de 7,2 y una osmolaridad de 310 mOsm. El nivel absoluto de detección referido por diferentes autores es de entre 30 a 60 pmol de nitrito o nitrato por 300 μl de muestra, representando una sensibilidad de 0,1 μM (Schmidt 1996). Como blanco utilizamos RPMI y KRP con SBF combinados a sulfonamida y NEDA en idénticas proporciones que para las muestras.

Realizamos la medida de nitritos tanto en plasma como en sobrenadantes de cultivos de PBMC normales y procedentes de pacientes VIH+. El plasma normal y de pacientes VIH+ se obtuvo de la misma muestra sanguínea de donde obtendríamos las PBMC, centrifugando la sangre periférica durante 5 minutos a 3000 rpm. Los cultivos con PBMC se realizaron en tubos eppendorf utilizando 5×10^6 PBMC/ml de medio, incubando a 37°C y con CO_2 5%. El cultivo se realizó en diferentes condiciones: condiciones basales (sin activación), activación con anti-CD3 y PHA con y sin IL-2. Del cultivo de las PBMC se obtuvieron alícuotas de sobrenadante al momento de iniciar el cultivo, a las 5 y 20 horas. Adicionalmente se realizaron cultivos con iguales condiciones sobre PBMC control pero utilizando KRP-glucosa-SBF 10%. Todas las medidas realizadas se hicieron por duplicado. Las muestras obtenidas se depositaron en placas de ELISA (NUNC-maxisorp) y se realizó su lectura espectrofotométrica en el lector Multiskan MS a 570 nm a los 10, 15 y 20 minutos de transcurrida la reacción colorimétrica.

b) Determinación de la presencia de nitrotirosina en proteínas de las PBMC mediante Western blot.

Analizamos la presencia de nitrotirosina en proteínas celulares de homogeneizados de PBMC normales y de pacientes VIH+ mediante la técnica de Western Blot (WB) con anticuerpos policlonales anti-nitrotirosina. Las PBMC se resuspendieron en RPMI con SBF 10%, distribuyéndolas en tubos eppendorf a razón 5×10^6 PBMC/ml. Se mantuvieron los cultivos durante 24 horas a 37°C y con CO_2 5%. Las mismas las analizamos en condiciones basales (tiempo cero) y luego de 24 horas de cultivo sin y con activación. Transcurrido el tiempo de cultivo se obtuvieron los pellet celulares, se descartó el sobrenadante y se procedió a su lisis en solución de lisis con SDS al 2%, conservándolos a -20°C hasta la realización del ensayo. Se utilizaron como controles negativo y positivo albúmina sérica bovina (BSA) nativa y albúmina nitrada *in vitro* en presencia de 0.5 mM de ONOO- (albúmina-NO) respectivamente. En ambos casos las cantidades absolutas de proteína de control positivo y negativo sembradas en el gel se encontraron en el rango de 1 a 3 μg .

Las muestras se sembraron a una concentración de 50 μg por línea. Las muestras y controles fueron sometidos a electroforesis en policacrilamida al 10% (SDS-PAGE) y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa de 0,45 micras.

Finalizada la transferencia teñimos con rojo Ponceau para verificar la correcta transferencia y lavamos con PBS. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados incubando las membranas durante toda la noche en una solución de bloqueo (BSA al 5% en PBS-Tween 0,1%) a 4°C . Los lavados se realizaron siempre con PBS-Tween 0,3%. La inmuno-detección de nitrotirosina se realizó con un anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-nitrotirosina producido en nuestro laboratorio. El anticuerpo primario anti-nitrotirosina se utilizó en diluciones 1/500, 1/800 y 1/1000 en solución PBS-Tween 0,1%, albúmina 1 mg/ml incubando por 2

horas. Luego de los lavados se incubó la membrana con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a la peroxidasa (DAKO anti rabbit, Paris, France) diluido 1/500, 1/1000, 1/2000 y 1/4000 en una solución PBS-Tween 0,3%, albúmina 1 mg/ml durante 1 hora. Se realizaron lavados y revelamos utilizando ECL Supersensible (Enhanced chemiluminescence detection supersignal system, Pierce, Rockford, IL, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se realizaron exposiciones sobre film radiográfico de alta sensibilidad de 1, 3, 5, y 10 minutos a temperatura ambiente.

En algunos ensayos las membranas fueron reutilizadas previo tratamiento de "stripping" (Tris-HCL 62,5 mM pH6,7, 2-mercapto-etanol 100 mM y SDS 2% durante 30 min. a 50°C) para eliminar los anticuerpos fijados.

c) Detección de la producción de $\cdot\text{NO}$ en lisados de PBMC mediante utilización del 4-5-Diaminofluoresceína (DAF-2) en fluorimetría.

Para evaluar la producción de $\cdot\text{NO}$ auténtico se utilizó la diaminofluoresceína (DAF-2) la cual forma un aducto con el $\cdot\text{NO}$, el DAF-2T, que fluoresce a 512 nm de longitud de onda y puede ser determinada mediante fluorimetría. Realizamos la determinación de la producción de $\cdot\text{NO}$ en homogeneizados de PBMC utilizando un número elevado de células para lograr valores de fluorescencia relativa dentro del rango de sensibilidad del equipo detector. Estos ensayos fueron realizados en colaboración con la Dra. Cecilia Brito y la Dra. Ana Denicola de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Universidad de la República respectivamente.

Características del cultivo de las PBMC: el ensayo se realizó sobre PBMC suspendidas en RPMI con SBF al 10% las cuales se distribuyeron en tubos eppendorf, manteniendo el cultivo durante 24 horas a 37°C y con 5% de CO_2 . Las PBMC se utilizaron en diluciones de finales entre 5 y 8 $\times 10^6$ /ml de medio. Estudiamos las PBMC en condiciones basales (tiempo 0 hora) y a 24 horas post-activación con anti-CD3 y PHA utilizados a razón de 10 μl por cada mililitro de RPMI. Se obtuvo el pellet de PBMC y se homogenizó mediante buffer de lisis, sonicando posteriormente y conservando la muestra a -20°C. Como patrón de referencia para la cuantificación se utilizaron diferentes concentraciones de $\cdot\text{NO}$ auténtico. El DAF-2 se utilizó en concentraciones de 10 μM y las incubaciones se realizaron durante 2 horas. Las unidades de fluorescencia relativa (UFR) fueron medidas a diferentes longitudes de onda y en diferentes tiempos, utilizando el equipo FLUOstar-Galaxy (BMG-Labtechnologies). Con las muestras descongeladas procedimos a la normalización, de manera que cada muestra contuviera el mismo número de PBMC por tubo de reacción. Los homogeneizados celulares fueron incubados durante 2 horas con DAF-2 en concentración final de 10 μM (en un tubo protegido de la luz) para luego medir las UFR a 15, 20, 30, 50 y 65 minutos y frente a diferentes longitudes de onda. En esta cinética el DAF-2T produjo un máximo de emisión de fluorescencia a 50 minutos y en una longitud de



onda de 510 nm. Los valores basales de fluorescencia espontánea fueron sustraídos de los valores obtenidos en los ensayos.

d) Detección de la producción de $\cdot\text{NO}$ en PBMC intactas: utilización del DAF-2DA en microscopia de fluorescencia.

Los ensayos con DAF-2 DA sobre células intactas por microscopía de fluorescencia nos permitieron identificar y disecar el origen celular de la producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel de las PBMC mediante la utilización de doble marcado para identificar las distintas subpoblaciones celulares. Para demostrar la especificidad del ensayo utilizamos el L-NAME a una concentración final de 10 mM (inhibidor de la NOS). Las PBMC aisladas fueron diluidas en medio RPMI con SBF 10%, distribuyéndolas en tubos eppendorf, a razón de 1 a 5×10^6 PBMC por ml de medio. Se incubaron a 37°C con 5% de CO_2 durante 24 horas. Analizamos varias condiciones: tiempo 0 hora, tiempo 24 sin y con activación linfocitaria en presencia y ausencia de L-NAME. En el caso de PBMC a tiempo cero, una vez aisladas y resuspendidas en RPMI-SBF 10%, se continuó el ensayo sin ser sometidas a criopreservación, finalizando con su observación en el microscopio a 6 horas de extraídas. Los tiempos de incubación fueron variables, ensayando 2, 6 y 24 horas para analizar su efecto inhibitorio. El D-NAME se utilizó con las mismas características que el L-NAME.

Adición del DAF-2DA a las PBMC: el ingreso del DAF-2DA al interior de las PBMC ("cargado celular del DAF") se logró llegando a una concentración final de 1 μM . Los pellets celulares obtenidos se resuspendieron en 100 μl de RPMI agregando el DAF-2DA partiendo de una solución de trabajo 100 μM . Las incubaciones se realizaron durante 2 horas, a 37°C , con 5% de CO_2 en ambiente protegido de la luz. El momento de realizar el cargado de DAF-2DA fue una vez finalizados los pasos de activación o inhibición (si correspondía) de manera previa a la adición de anticuerpos marcadores. Una vez cargado el DAF y finalizado el tiempo de cultivo correspondiente, lavamos con PBS las células y agregamos los anticuerpos anti-CD14 conjugados a ficoeritrina (marcador monocitario) incubando durante 20 minutos a 4°C .

El pellet de PBMC se resuspendió en 50 μl de RPMI frío, agregándole una gota de medio de montaje (Fluorescent Mountain Medium, Dako) para depositarlo sobre el portaobjetos y cubriéndolo luego con el cubreobjetos. Se guardaron a temperatura ambiente protegidas de la luz y se realizó su análisis por microscopia de fluorescencia en los 30 minutos siguientes. La visualización se realizó en un microscopio Optiphot Labophot (Episcopic-Fluorescence - Nikon), el cual cuenta con un equipo digital para el registro de imágenes, que fueron adquiridas y analizadas mediante el programa Imagen-Pro-Plus 5.1. En cada caso el campo observado fue analizado utilizando filtros ópticos diferentes: 1) sin filtros de

fluorescencia para observar la morfología de las PBMC, 2) con los filtros G y 580 w para observar la fluorescencia emitida en el rojo de la PE y 3) con los filtros B y 515 w para poder observar la fluorescencia emitida en el verde del DAF-2T. De esta manera, sin mover el campo de observación y cambiando secuencialmente los filtros, pudimos observar cual era la morfología de la PBMC involucrada, si eran CD14-PE positivas o negativas y cuales podían emitir fluorescencia por el DAF-2T (producción de $\cdot\text{NO}$). Para adquirir las imágenes los tiempos de exposición utilizados por la cámara digital fueron los mismos para cada fluorocromo.

e) Detección de producción de $\cdot\text{NO}$ por Citometría de Flujo:utilización del DAF-2DA para la detección de $\cdot\text{NO}$.

Objetivo y consideraciones previas: los trabajos con microscopía de fluorescencia nos posibilitaron identificar la producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel monocitario y linfocitario, lo que nos llevó a proponernos dos objetivos: a) conocer que porcentaje de linfocitos eran capaces de producir $\cdot\text{NO}$ y b) dentro de ellos cual era la subpoblación principalmente responsable de esa producción. Planteamos utilizar el DAF-2T en citometría de flujo, constituyendo una técnica donde las publicaciones disponibles son pocas, limitadas a líneas de cultivo celular no encontrando datos de su utilización en PBMC humanas. Por tanto entendemos necesario relatar con mayor detalle la puesta a punto de la técnica y su adaptación a nuestro sistema de experimental. Este trabajo fue realizado en colaboración con el Dr. Daniel Scott-Algara, de la Unité Biologie des Rétrovirus, Institut Pasteur, Paris, Francia.

Características del cultivo de PBMC y de la activación linfocitaria: planteamos comparar las diferencias en la producción de $\cdot\text{NO}$ entre PBMC activadas y no activadas, utilizando un estímulo activador linfocitario. En este caso la activación fue realizada utilizando anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, los cuales fueron adheridos a la fase sólida de la placa de cultivo (inmovilizados), a través de un anticuerpo policlonal anti-Ig de ratón. Se optó por este estímulo ya que los anticuerpos inmovilizados desarrollan una activación mas potente que los anticuerpos en fase soluble. Optamos por no utilizar PHA ya que las PBMC se tornan más frágiles, lo que descendería su número durante la manipulación. Utilizando placas de cultivo de 24 pocillos (NUNC) incubamos el anticuerpo policlonal anti-ratón en concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS, sembrando 500 μl por pocillo, dejándolo durante la noche a 4°C (alternativamente 2 hs a 37°C). Luego descartamos el sobrenadante y agregamos los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 agregando 500 μl por pocillo incubándolo durante 2 horas a 37°C. La activación linfocitaria se realizó en dos condiciones proporcionando un estímulo con baja concentración (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y otro con alta concentración (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de los dos monoclonales. Pasado el tiempo de adhesión, descartamos el sobrenadante y adicionamos las PBMC.

La suspensión celular de PBMC normales y de pacientes VIH+ se utilizaron a razón de $0,5$ a 1×10^6 PBMC por ml de medio RPMI con SBF al 10%, incubándolas en placas de 24 pocillos (NUNC), sembrando en cada pocillo 1 ml de la suspensión celular, manteniéndolas a 37°C y con CO_2 al 5% durante 12 a 24 horas. Analizamos las PBMC normales a 24 horas de cultivo sin y con activación y a 24 horas post-activación linfocitaria en presencia de L-NAME. Las PBMC de pacientes VIH+ dado el menor número de células obtenido, analizamos los cultivos a 24 horas sin y con activación linfocitaria. Cada una de las condiciones experimentales fue realizada por triplicado repitiendo los ensayos en al menos dos oportunidades encontrando reproducibilidad en las experiencias.

Adición del DAF-2DA a las PBMC: para el "cargado celular del DAF" incubamos los pellets celulares (incluidos en 100 μl de volumen final) durante 90 a 120 minutos con el DAF-2DA en concentraciones variables, en medio RPMI, a 37°C y en ambiente protegido de la luz. Las concentraciones finales a las que se incubó el pellet celular con el DAF-2DA fueron de 0,1, 1, 5 y 10 μM , partiendo de una dilución de trabajo de 100 μM . Comparamos las diferencias en el agregado del DAF-2DA antes o después de la activación linfocitaria, para lo que cargamos el DAF-2DA dos horas antes o dos horas después de la activación linfocitaria. Los ensayos fueron analizados por citometría de flujo a diferentes intervalos de tiempo, analizándolos a 5, 6, 7, 12 y 24 horas posteriores al cargado el DAF-2DA.

Efecto de la inhibición de la NOS por L-NAME: a las PBMC contenidas en 1 ml de medio se les adicionó el L-NAME utilizándolo en una concentración final de 5 mM, partiendo de una dilución de trabajo de 500 mM. Con iguales características se ensayó el D-NAME. El inhibidor fue incubado durante 12, 18 y 24 horas. En los casos donde el tiempo de incubación del L-NAME fue superior a las horas de incubación del DAF-2DA, la incubación con L-NAME debió ser interrumpida para cargar el DAF-2DA a las PBMC, para luego proceder a la re-adición posterior en igual concentración.

Fijación con Para-Formaldehído (PFA): realizamos ensayos comparativos frente a la utilización de PFA en concentración final de 1%, para valorar el efecto de la fijación sobre la señal fluorescente emitida por el DAF-2T. En este caso, el daño producido por el PFA a las membranas celulares, puede alterar los gradientes de las ERN a uno y otro lado de la membrana por lo que entendimos necesario valorar sus efectos en este ensayo.

Detección del DAF-2DA en el analizador FACScalibur: el aducto DAF-2T presenta una excitación a 490 nm y tiene una emisión de fluorescencia (color verde) a 515 nm que puede ser detectada en primera fluorescencia (FL1).

4) RESULTADOS

1) Cultivos *in vitro*, ensayos de proliferación celular y determinación de apoptosis.

1a) Efecto de dadores de $\cdot\text{NO}$ e inhibidores de la NOS en la proliferación de PBMC de individuos normales.

En las PBMC en condiciones basales (ausencia de activación linfocitaria) los registros obtenidos estuvieron todos próximos al nivel mínimo de sensibilidad del equipo, por lo que no se detectaron cifras significativas de incorporación de timidina. La adición a los cultivos de SNAP, NOC-18 y L-NAME no introdujo modificaciones (datos no mostrados).

Tanto con SNAP como con NOC-18 y L-NAME se observó una significativa inhibición dosis dependiente de la proliferación inducida por anti-CD3 y PHA (figura 1A). Como se puede observar, la inhibición por NOC-18 fue de menor magnitud siendo significativos los valores de inhibición a las dosis mas altas utilizadas (80 μM). Teniendo en cuenta la diferente vida media del SNAP (5 hs) y del NOC-18 (20 hs), podemos explicar el efecto inhibitor mas pronunciado del SNAP, debido a que se producen niveles mas altos de $\cdot\text{NO}$ en el medio de cultivo durante las primeras horas. Estos resultados sugieren un efecto inhibitor dosis dependiente del $\cdot\text{NO}$ sobre la proliferación celular. Paradójicamente el L-NAME como potente inhibidor de la NOS también produce una inhibición significativa en la proliferación inducida por CD3 y PHA. Estos datos sugieren que la proliferación se vería favorecida o inmodificada en un rango de concentraciones moderadas o "fisiológicas" de $\cdot\text{NO}$ mientras que la ausencia o exceso del mismo tendrían un mismo efecto inhibitor.

La estimulación simultánea con anti-CD3, PHA e IL-2 indujo similares respuestas inhibitorias tanto para el SNAP como para el L-NAME (figura 1B). Contrariamente en presencia de IL-2 se observó un aumento significativo de la proliferación con NOC-18 a dosis bajas (20 μM), mientras que a dosis mas elevadas el efecto inhibitorio de la proliferación fue sensiblemente menor al observado en ausencia de IL-2.

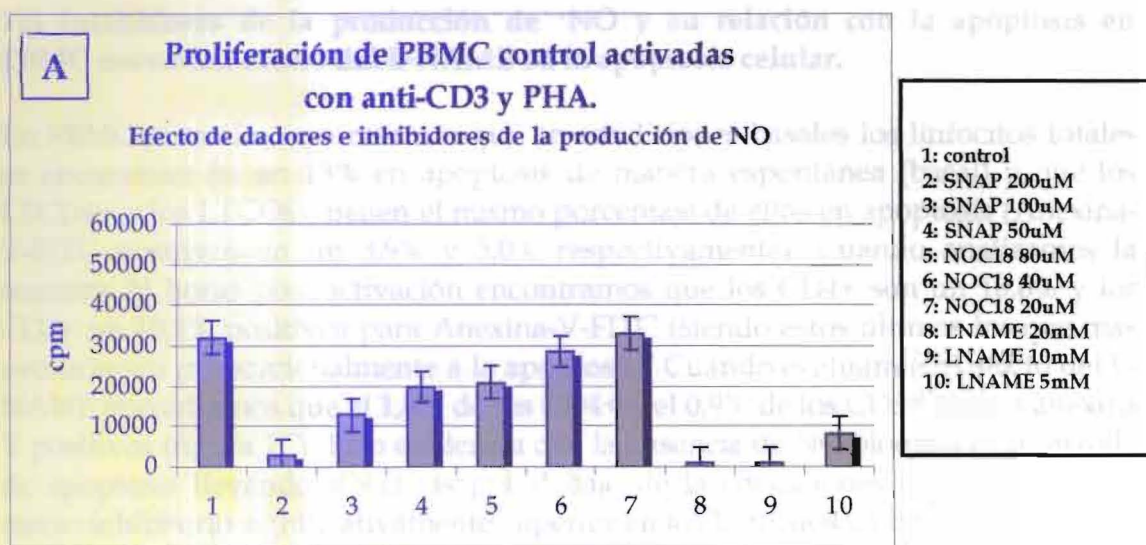


Figura 1A: Proliferación de PBMC con activación linfocitaria con anti-CD3 y PHA. Efecto de la presencia de dadores de *NO (SNAP: 2 - 4 y NOC18: 5 - 7) e inhibidores de la producción de *NO (L-NAME: 8 - 10) a diferentes concentraciones.

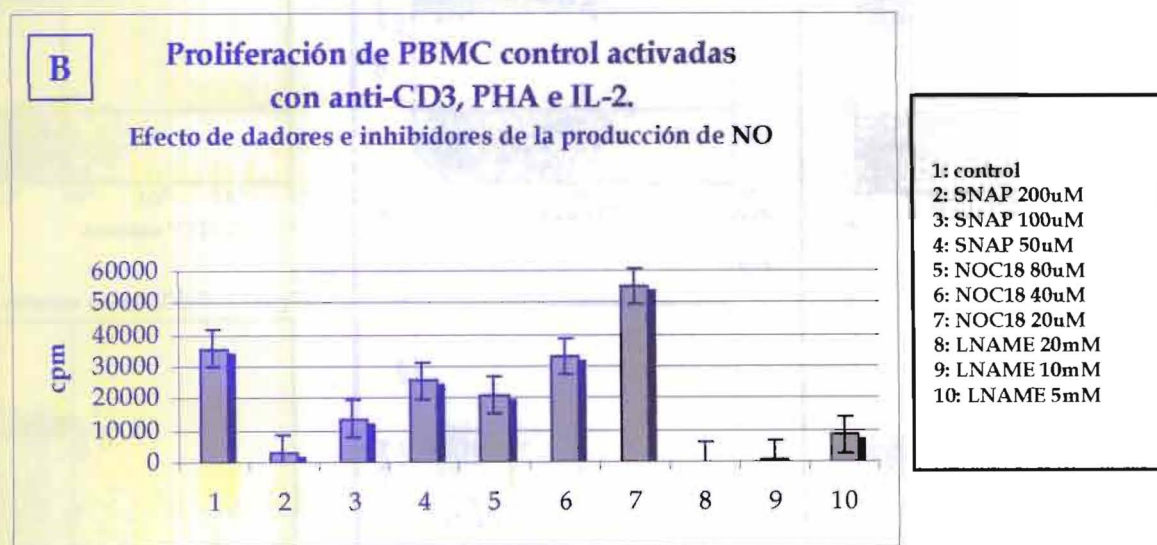


Figura 1B: Proliferación de PBMC con activación linfocitaria con anti-CD3, PHA e IL-2. Efecto de concentraciones crecientes de dadores de *NO (SNAP: 2 - 4 y NOC18: 5 - 7) e inhibidores de la producción de *NO (L-NAME: 8 - 10).

1b) Inhibidores de la producción de NO y su relación con la apoptosis en PBMC normales: efecto del L-NAME en la apoptosis celular.

En PBMC normales encontramos que en condiciones basales los linfocitos totales se encuentran en un 13% en apoptosis de manera espontánea (basal) y que los LTCD4+ y los LTCD8+ tienen el mismo porcentaje de ellos en apoptosis (Anexina-V-FITC positivos en un 3,9% y 5,0% respectivamente). Cuando analizamos la muestra 24 horas post-activación encontramos que los CD4+ son un 10,6% y los CD8+ un 10,1% positivos para Anexina-V-FITC (siendo estos últimos los que más evolucionan proporcionalmente a la apoptosis). Cuando evaluamos el efecto del L-NAME encontramos que el 1,8% de los CD4+ y el 0,9% de los CD8+ fueron anexina V positivos (figura 1C). Esto evidencia que la ausencia de NO bloquea el desarrollo de apoptosis llevándola a cifras por debajo de las condiciones basales siendo el efecto inhibitorio significativamente superior en los linfocitos CD8+.

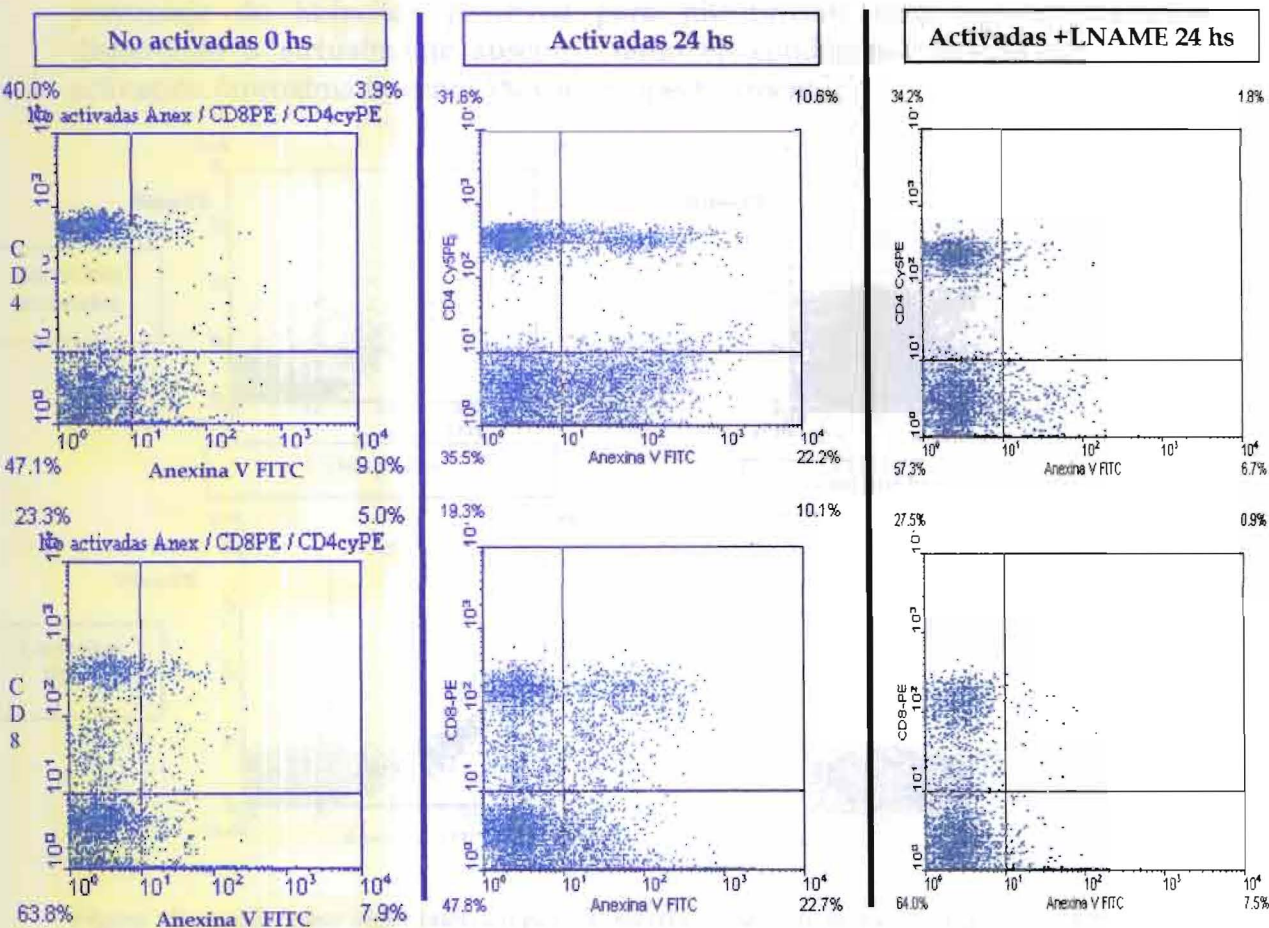


Figura 1C: Análisis por citometría de flujo sobre PBMC control. Sobre gate linfocitario se analizan las PBMC a 0 hora, 24 hs post activación y 24 hs post-activación en presencia de L-NAME. Arriba: análisis anexina-FITC Vs. CD4-Cy5PE. Abajo: análisis anexina-FITC Vs. CD8-PE

1c) Determinación por citometría de flujo de la presencia de nitrotirosina y su asociación con apoptosis en PBMC normales y de pacientes VIH+.

comparado contra las células normales, y con el tiempo de activación.

Realizaremos la discusión utilizando datos de diferentes muestras sanguíneas que fueran representativas de nuestras experiencias. Los análisis con PBMC normales a tiempo cero, mostraron que existe un 14,5% de linfocitos Anexina-V-FITC positivos (en proceso apoptótico) y que del total de células un 4,8% son nitrotirosina-PE y Anexina-V-FITC positivas (doble positivas). En las PBMC normales a 24 horas de la activación linfocitaria encontramos que los linfocitos Anexina-V-FITC positivos son el 26,2% de los cuales algo mas de la mitad (15,7%) son también positivos para nitro-tirosina (figura 1D). Como se puede observar en el panel inferior de la figura 1D, en los linfocitos provenientes de PBMC de pacientes VIH+, existe un claro aumento en el porcentaje de células apoptóticas tanto en condiciones basales como de post-activación (23,5% y 37.3% respectivamente). Podemos observar que el porcentaje de linfocitos positivos para nitrotirosina está significativamente disminuido o virtualmente ausente tanto en condiciones basales como post-activación (aproximadamente 5% y 6% respectivamente).

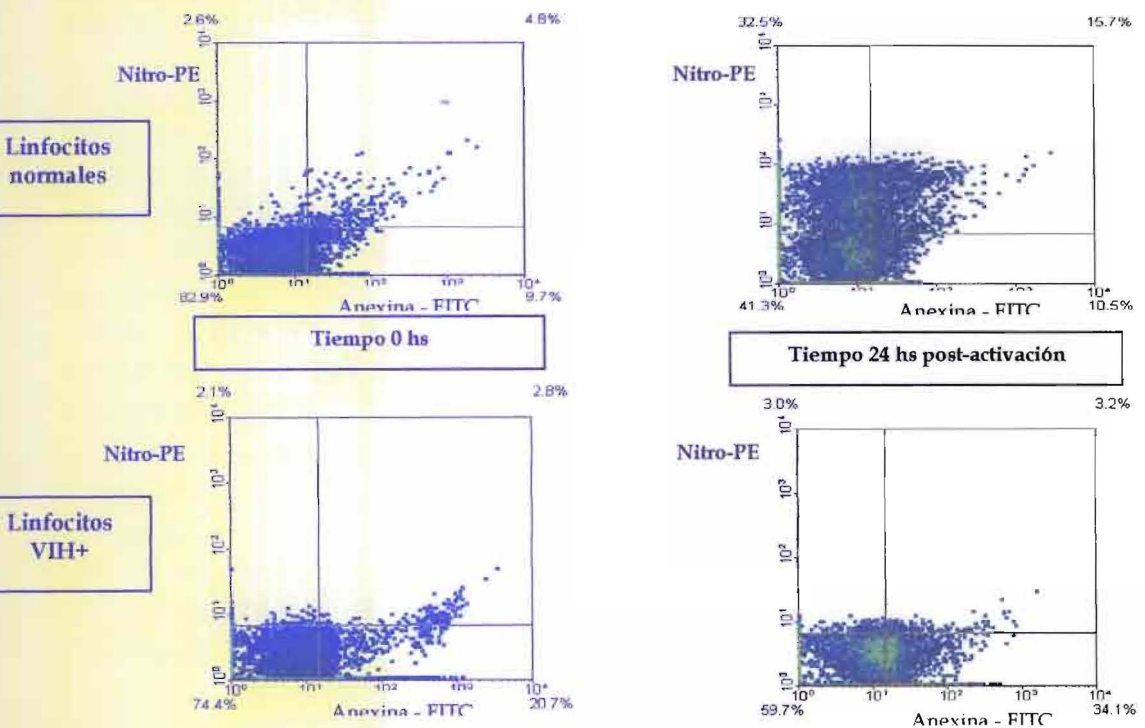


Figura 1D: Análisis por biparamétrico por citometría de flujo de la nitración proteica y proceso de apoptosis de PBMC normales y de pacientes VIH+. El análisis se realizó sobre ventana linfocitaria excluyendo monocitos. Panel superior: linfocitos normales no activados (tiempo 0 hs) y 24 hs post activación. Panel inferior: análisis de linfocitos provenientes de un paciente VIH+ representativo en analizado en idénticas condiciones. Nitro-PE: anticuerpos anti-nitrotirosina conjugados a la Fico-Eritrina; Anexina-FITC: anexina V isotiocianato de fluoresceína.

Podemos resumir diciendo que en PBMCs de sujetos VIH+ observamos un aumento en la proporción de células apoptóticas tanto en condiciones basales como post-activación comparado contra las células normales. Por el contrario, los niveles de proteínas intracelulares nitradas post-activación son extremadamente bajas o inexistentes en sujetos VIH+, lo que evidencia una ausencia de asociación entre la nitración y la apoptosis y a la vez una escasa producción de agentes nitrantes en VIH+, pudiendo explicarse tanto por una disminución en la producción de $\cdot\text{NO}$, de superóxido u otras especies reactivas, o bien de una disminución de ambos.



Fig. 1. Nitración de proteínas en PBMCs de sujetos VIH+.

Se muestra la nitración de proteínas en PBMCs de sujetos VIH+ y VIH-. La nitración se detecta por la presencia de la banda de NT (nitrotyrosine) en la parte superior de la imagen. La banda de actin (actin) se muestra en la parte inferior de la imagen como control de carga. La nitración es significativamente mayor en las células de sujetos VIH+ que en las de sujetos VIH-.



2) Expresión del mRNA de la iNOS en PBMC normales y de pacientes VIH+:

Expresión del mRNA de la iNOS en PBMC normales: en las PBMC normales activadas con anti-CD3 y PHA encontramos que en condiciones basales (0 hora) no detectamos la presencia de la iNOS, pero que progresivamente comienza a ser identificada, siendo evidente a 4 horas, llegando a su máxima expresión a 7 horas de iniciado el estímulo, comenzando luego a descender. Como control de cantidad de material se utilizó la enzima constitutiva GAPD (figura 2A).

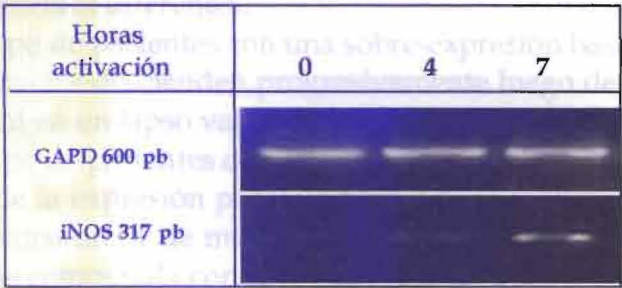


Figura 2A: fragmento amplificado de la iNOS por PCR observados en gel de agarosa al 1% tinción con bromuro de etidio. Cinética de inducción de la iNOS humana con PBMC normales.

En las PBMC normales comparamos la expresión cinética de la inducción de la iNOS en condiciones basales y en cultivo sin activación y post-activación linfocitaria con anti-CD3 mas PHA, en ausencia o presencia de IL-2. En la figura 2B observamos que en PBMC en condiciones basales no se detecta la expresión de la iNOS. En PBMC en cultivo con o sin estímulo activador linfocitario encontramos que la iNOS se expresó a 7 hs, seguida de un franco descenso a 12 hs. En el caso donde la activación linfocitaria se realizó con los tres estímulos de manera simultánea (anti-CD3, PHA e IL-2), la expresión de la iNOS fue claramente identificable a 4 hs, aumentando a 7 hs, haciéndose máxima a 12 hs (figura 2B).



Figura 2B: fragmento amplificado de la iNOS por PCR observados en gel de agarosa al 1% tinción con bromuro de etidio. Comparación de cinéticas de inducción de la iNOS humana.

Estos resultados demuestran claramente una inducción en la expresión de la iNOS en PBMCs normales, mediada por la sola exposición a la superficie de cultivo así como por activadores linfocitarios específicos, en donde la intensidad y tiempo post-activación de su expresión se ven potenciadas por la adición de IL-2.

Detección de la expresión de la iNOS en PBMC de pacientes VIH+ por RT-PCR: cuando estudiamos la expresión de la iNOS en pacientes VIH+ encontramos claramente dos perfiles diferentes:

A) un grupo de pacientes con una sobre-expresión basal de transcritos para la iNOS cuyos niveles descienden progresivamente luego de la activación hasta su desaparición total en un lapso variable de entre 4 y 7 horas.

B) un grupo de pacientes con ausencia de dichos transcritos en condiciones basales, en donde la expresión post-activación no fue detectable o bien se observó una expresión transitoria y de muy baja intensidad, expresión que fue considerada como sub-óptima comparada con la contraparte normal.

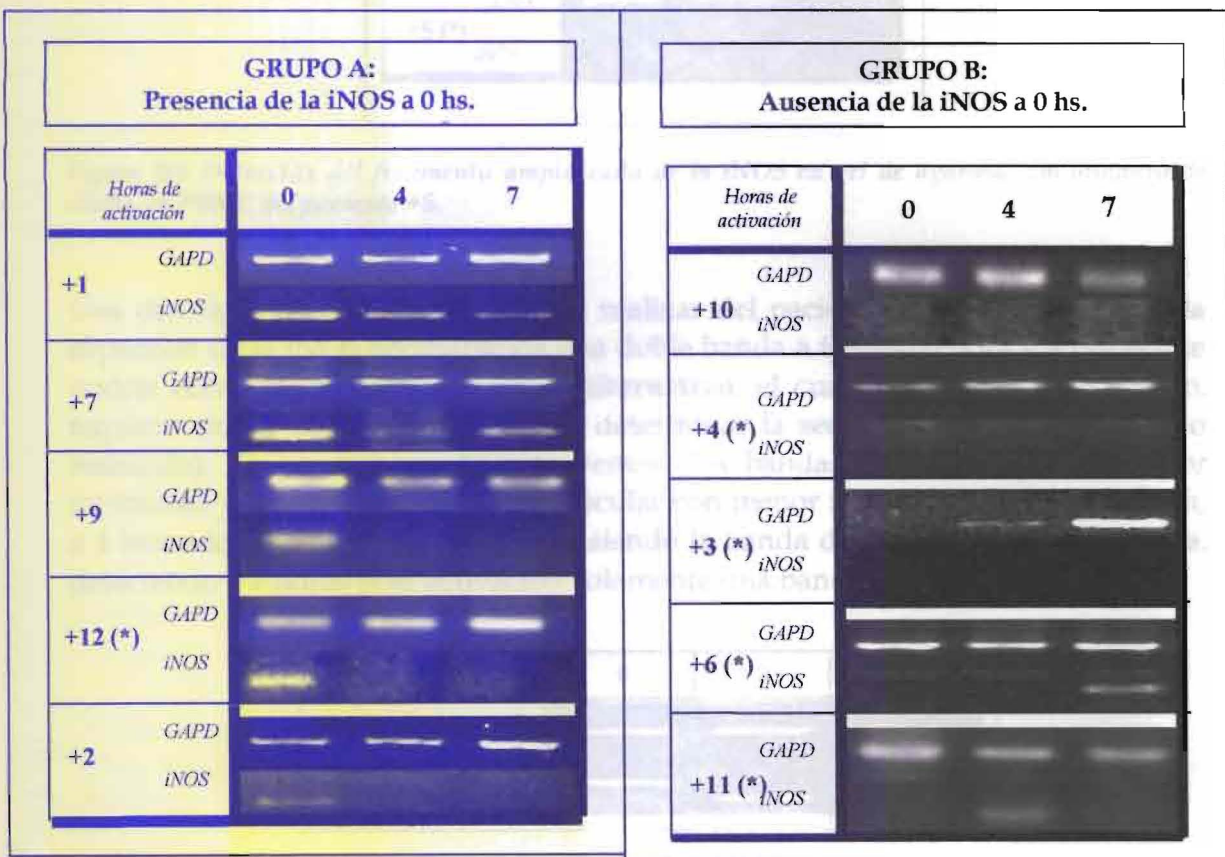


Figura 2C: Detección del fragmento amplificado de la iNOS en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio realizado en 10 pacientes VIH+.

Queremos destacar que dentro del grupo A, obtuvimos muestras sanguíneas en dos ocasiones diferentes del paciente +1 (lapso de separación de 3 meses), siendo procesadas y analizadas con el mismo protocolo de trabajo, obteniendo resultados con idénticas características en las dos oportunidades. En la primera muestra, el motivo de consulta fue un cuadro no infeccioso (figura 2C). En la segunda muestra el motivo de consulta fue una neumopatía aguda comunitaria (dato no mostrado).

El paciente +5 no se incluyó en el balance del total de los casos del grupo B ya que se trata de una situación excepcional (figura 2D). La ausencia en la expresión de la iNOS probablemente podría haber estado influida por la presencia de un factor asociado: la utilización de hidrocortisona como parte del tratamiento de la neumonía a *Pneumocistis Carini*.

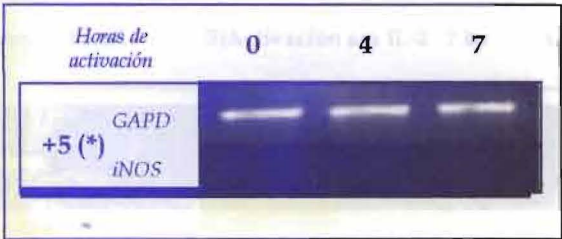


Figura 2D: Detección del fragmento amplificado de la iNOS en gel de agarosa con bromuro de etidio, en PBMC del paciente +5.

Una descripción particular queremos realizar del paciente +7: en este caso, en la expresión de la iNOS encontramos una doble banda a tiempo 0 hora y 4 horas que podría corresponder a un **splicing alternativo**, el cual para poder confirmarlo, requiere clonar dichos fragmentos y determinar la secuencia de los mismos (no realizado). En condiciones basales vemos dos bandas, la de 317 pb de mayor intensidad y otra de menor peso molecular con menor intensidad en su expresión, a 4 horas la situación es a la inversa siendo la banda de 317 pb la menos intensa, detectando a 7 horas post activación solamente una banda a 317 pb (figura 2E).

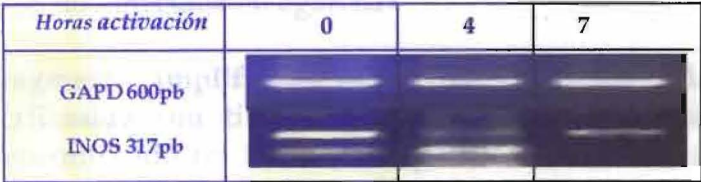


Figura 2E: Detección del fragmento amplificado de la iNOS en gel de agarosa con bromuro de etidio, en PBMC del pacientes +7. Probable splicing alternativo en la expresión de la iNOS.

Efecto de la activación linfocitaria en presencia de IL-2 en la expresión de la iNOS en PBMC normales y de pacientes VIH+:

En las PBMC normales la activación linfocitaria en presencia de IL-2 produjo un aumento en la magnitud de la expresión de la iNOS así como un aumento en su expresión temporal. La potenciación en la expresión de la iNOS la encontramos de forma no constante en PBMC de algunos pacientes VIH+, donde el efecto de la IL-2 fue mas evidente fue en el paciente +1, en el cual a 7 hs sin IL-2 la expresión de la iNOS era débil (tendiendo a desaparecer) pero a 7 hs en presencia de IL-2 se produjo una clara recuperación de la expresión basal de la iNOS, llegando (o superando) el nivel de expresión inicial (figura 2F).

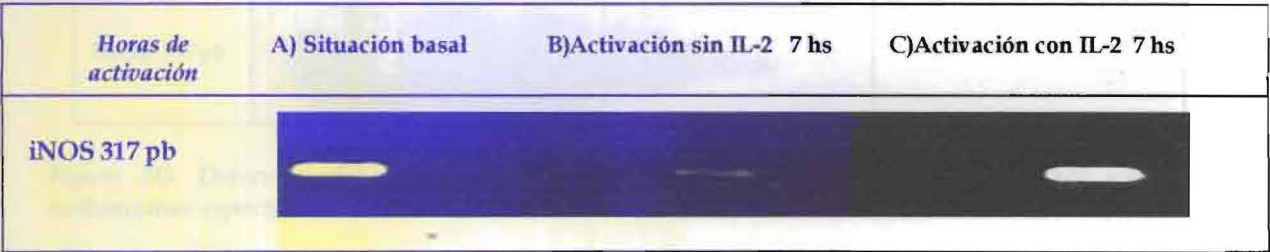


Figura 2F: Detección del fragmento amplificado de la iNOS en gel de agarosa con bromuro de etidio, en PBMC del paciente +1.

Identificación del fragmento amplificado por RT-PCR de la iNOS por métodos de mayor resolución: con el objetivo de aumentar la sensibilidad en la detección de los transcritos de la iNOS observados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, utilizamos dos métodos alternativos de mayor sensibilidad: a) tinción en plata sobre geles de electroforesis en poli-acrilamida y b) mediante técnicas de southern blot sobre DNA amplificado utilizando sondas radioactivas específicas de la iNOS. Seleccionamos material amplificado PCRs de tres pacientes: +1 (iNOS claramente identificada en agarosa), +2 (iNOS observada solamente a 0 hora en agarosa) y +3 (iNOS no detectada en agarosa).

Detección del fragmento amplificado de la iNOS mediante electroforesis en geles en poli-acrilamida con tinción con plata: usamos geles en diferentes concentraciones encontrando un bandeo inespecífico sin aumentar la resolución obtenida con los geles de agarosa con bromuro de etidio para identificar la iNOS (datos no mostrados).

Detección del fragmento amplificado de la iNOS mediante sondas radioactivas marcadas con ³²P: con este método en el paciente +1 confirmamos la tendencia a desaparecer de la iNOS observada en los geles de agarosa. En el caso del paciente +2, pudimos mejorar la resolución ya que identificamos con una mayor intensidad la expresión de la iNOS a tiempo 0 hs, volviéndose identificable la expresión a 4 hs (que no observábamos en los geles de agarosa). En el paciente +3 no detectamos la iNOS en ninguno de los tres carriles, de la misma manera que en los ensayos con geles de agarosa (figura 2G).

Pacientes	+1			+2			+3		
Horas Activación	0	4	7	0	4	7	0	4	7
iNOS 317pb									

Figura 2G: Detección del fragmento amplificado de la iNOS detectados mediante sondas radioactivas específicas.

3) Detección de la enzima iNOS mediante Western Blot.

Si bien en nuestro laboratorio se puso a punto la técnica utilizando como controles positivos macrófagos murinos, en los ensayos que realizamos con PBMC humanas no logramos detectar la presencia de la iNOS (datos no mostrados). Esto posiblemente pueda estar evidenciando el bajo nivel de expresión de la proteína madura, lo cual es coherente con los datos disponibles en la bibliografía. Por tanto no pudimos analizar en este trabajo la presencia de la proteína madura sabiendo que no siempre la presencia del mRNA específico se correlaciona con el nivel de la proteína que traduce. Este podría ser uno de los ensayos a re-estudiar en un futuro.

4) Detección de nitritos en el sobrenadante de cultivos de PBMC. Utilización de la técnica de Griess.

En cuanto a la curva de calibración con nitrito de sodio (control positivo), no encontramos diferencias entre su realización en medio RPMI o en buffer KRP. Las curvas de calibración mantuvieron una proporcionalidad directa, con valores máximos para 62,50 uM de 0,52 de D.O. y valores mínimos para 0,12 de 0,001 de D.O. (tabla 4e).

Nitrito de Sodio (uM)	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,95	0,97	0,48	0,24	0,12
D.O. (570nm)	0,520	0,263	0,133	0,070	0,036	0,020	0,010	0,006	0,002	0,001

Tabla 4: datos nitrito de sodio en RPMI.

Todas las medidas realizadas en plasma y en sobrenadante de cultivos de PBMC normales y de pacientes VIH+, tanto en RPMI como en KRP, mostraron cifras por debajo de 0,02 unidades de D.O. (datos no mostrados). Estos resultados evidencian que estamos en un sistema de baja producción de •NO lo cual hace a esta técnica no adecuada y de baja sensibilidad.

5) Determinación de la presencia de nitrotirosina en proteínas de las PBMC normales y de pacientes VIH+ mediante Western blot.

Con el fin de determinar cualitativamente la nitración de proteínas de PBMC normales y de pacientes VIH+, procedimos al análisis por WB de homogeneizados celulares mediante el uso de anticuerpos policlonales anti-nitrotirosina. Como controles negativo y positivo utilizamos albúmina nativa y albúmina nitrada en presencia de peroxinitrito 100 mM. Como se puede observar en la figura 5, la especificidad de la técnica está evidenciada por la fuerte inmuno-reactividad de la albúmina nitrada y la ausencia de la misma en la albúmina nativa (carriles 1 y 2 respectivamente en la figura 5). En el caso de la albúmina nitrada es posible observar bandas adicionales que corresponden a otras proteínas séricas contaminantes del proceso de purificación de la misma.

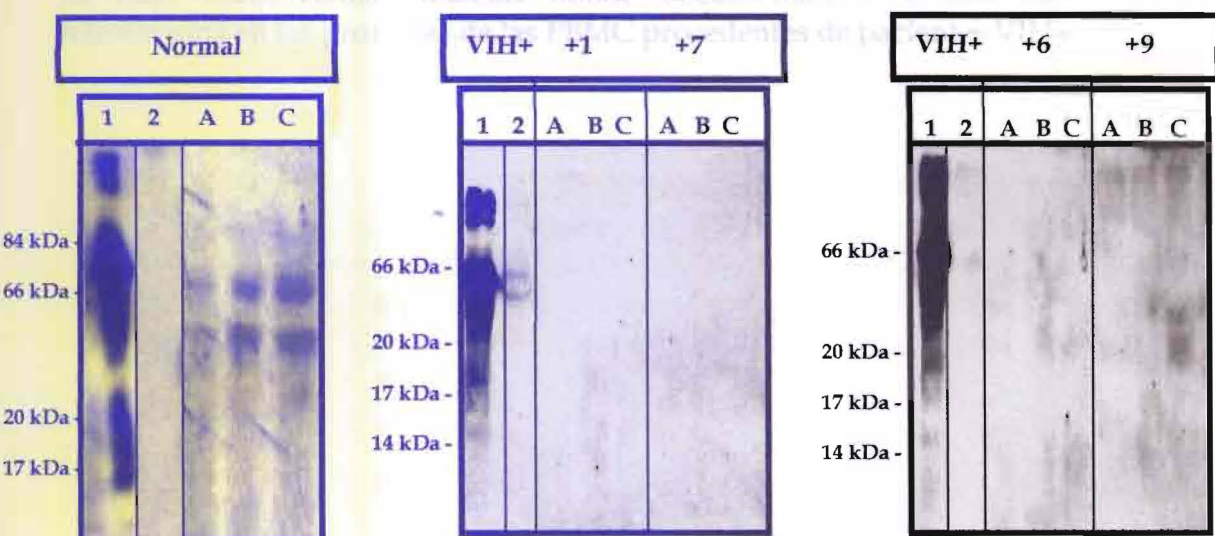


Figura 5: detección de nitrotirosina mediante WB sobre residuos de proteínas de PBMC normales y de 4 pacientes VIH+. Los pesos moleculares aparentes se indican a la izquierda (kDa); 1: albúmina nitrada; 2: albúmina no nitrada; A: PBMC a tiempo 0 hs; B: PBMC a 24 hs sin activación; C: PBMC a 24 hs post-activación.

En el caso de las PBMC normales encontramos dos bandas, una próxima a 66 kDa y otra menor entre 66 y 20 kDa, lo que traduce la presencia de nitrotirosina en múltiples residuos (probablemente de diferentes proteínas). A 24 horas post-activación se observa una (tenue) tercera banda próxima a 20 kDa. Las bandas observadas a 0 hora son de menor intensidad que las observadas a 24 horas y en estas últimas la intensidad es aún mayor en las que tienen 24 horas post-activación. Podemos decir que el perfil de nitración es de similares características, siendo la intensidad de la nitración mayor en las muestras con 24 horas de cultivo (figura 5).

Fig. 5. Efectos de la producción de $^{*}\text{NO}$ en lisados de PBMC normales

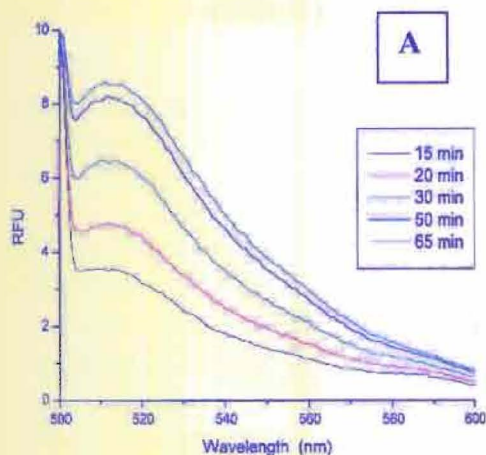
En las PBMC de pacientes VIH+ el patrón de nitración proteica en el WB es completamente diferente al identificado en la situación normal. Al analizar los pacientes +1, +6, +7 y +9 observamos la ausencia de bandas correspondientes a nitrotirosina, pudiendo decir que estamos frente a una ausencia de nitración proteica o a niveles bajos no detectables por esta técnica. En los 4 pacientes analizados no encontramos diferencias en la nitración entre 0 y 24 horas con y sin activación (figura 5).

Nuestros resultados muestran que en PBMC normales encontramos nitrotirosina en diferentes residuos de proteína existiendo diferencias entre la condición basal y la detectada a 24 horas y que de manera contraria, en las PBMC de pacientes VIH+, la característica fue la ausencia en la detección de nitrotirosina tanto a 0 como a 24 horas. Estos resultados van en el mismo sentido que los encontrados por citometría de flujo sobre células intactas donde documentamos la casi ausencia de nitrotirosina en las proteínas de las PBMC procedentes de pacientes VIH+.

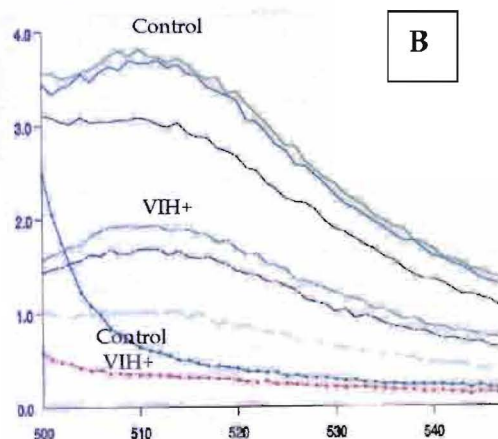
6) Detección de la producción de $\cdot\text{NO}$ en lisados de PBMC normales y de pacientes VIH+. Utilización del 4,5-Diaminofluoresceína (DAF-2) en fluorimetría.

En primer lugar realizamos una curva de calibración con $\cdot\text{NO}$ auténtico a fines de analizar la cinética de reacción del mismo con el DAF-2 y establecer los ajustes de la técnica. En estas condiciones encontramos que la longitud de onda a la que se produce la máxima emisión de fluorescencia es a 510 nm y que el tiempo óptimo para realizar dicha detección es a los 50 minutos de finalizada la incubación de dos horas con el DAF-2 (figura 6, parte A). Logramos identificar muy bajos valores de fluorescencia espontánea que no interfirieron con la detección de la fluorescencia específica y a su vez fueron sustraídos a los valores de emisión obtenidos para el DAF-2. En la figura 6 mostramos un ensayo fluorimétrico representativo del paciente VIH +7 comparado con lisados de PBMC normales. En el mismo mostramos la emisión de fluorescencia del DAF-2T producido por los homogeneizados celulares luego de 24 horas post-activación linfocitaria con anti-CD3 y PHA, donde las unidades de fluorescencia relativa (URF) emitidas a 510 nm fueron de 3,1 para las PBMC normales y de 1,50 para las PBMC del paciente +7.

En suma podemos decir que la fluorescencia detectada en lisados de PBMC luego de 24 horas de activación linfocitaria, fue francamente superior en las PBMC normales comparada contra la fluorescencia encontrada en lisados de PBMC de un paciente VIH+, realizando la comparación luego de normalizadas en número y utilizando los mismos parámetros de tiempo y longitud de onda en el equipo.



Cinética de detección NO-DAF.
(RFU unidades de fluorescencia relativa)



Detección RFU del DAF
Comparación lisados PBMC control Vs VIH+.
(RFU unidades de fluorescencia relativa)

Figura 6: Detección de la fluorescencia del DAF-2T en el FLUO-Star - Galaxy. A) Cinética de detección de la fluorescencia emitida por el aducto NO-DAF (DAF-2T). B) Detección de la fluorescencia del DAF-2T emitida por homogeneizados de PBMC normales y del paciente +7 a 24 horas post-activación linfocitaria. RFU: unidades de fluorescencia relativa; nm: longitud de onda en nanómetros.

7) Detección de la producción de $\cdot\text{NO}$ en PBMC intactas: utilización del DAF-2DA en microscopia de fluorescencia. Comparación entre PBMC normales y de pacientes VIH+.

Las condiciones de trabajo utilizadas para la puesta a punto del cargado del DAF-2DA en las PBMC (concentración, tiempo y temperatura) fueron aquellas que permitieron un mayor rendimiento en la detección de la fluorescencia en las PBMC normales, utilizándolas en adelante como definitivas para los restantes ensayos. Todos los ensayos con PBMC normales fueron realizados por duplicado y en al menos dos oportunidades, encontrando reproducibilidad en los mismos

Detección de la fluorescencia del DAF-2T en PBMC normales: en la figura 7A vemos que en ausencia de estímulo existe una fuerte señal de fluorescencia específica únicamente en células CD14+ (monocitos) tanto al inicio de los cultivos (tiempo 0 hora) como luego de 24 horas de cultivo. A nivel linfocitario (células CD14 negativas) sólo se puede observar una tenue emisión de fluorescencia, cercana a los niveles de fluorescencia basal o espontánea del DAF. Post-activación no se logra un refuerzo en la señal de fluorescencia específica a nivel linfocitario por lo que no podemos demostrar un aumento en la producción de $\cdot\text{NO}$ en estas condiciones. Como era de esperar la presencia de L-NAME en los cultivos inhibió fuertemente la fluorescencia a nivel de los monocitos. La incubación durante 24 horas con D-NAME no indujo cambios en la fluorescencia a nivel de los monocitos (dato no mostrado).

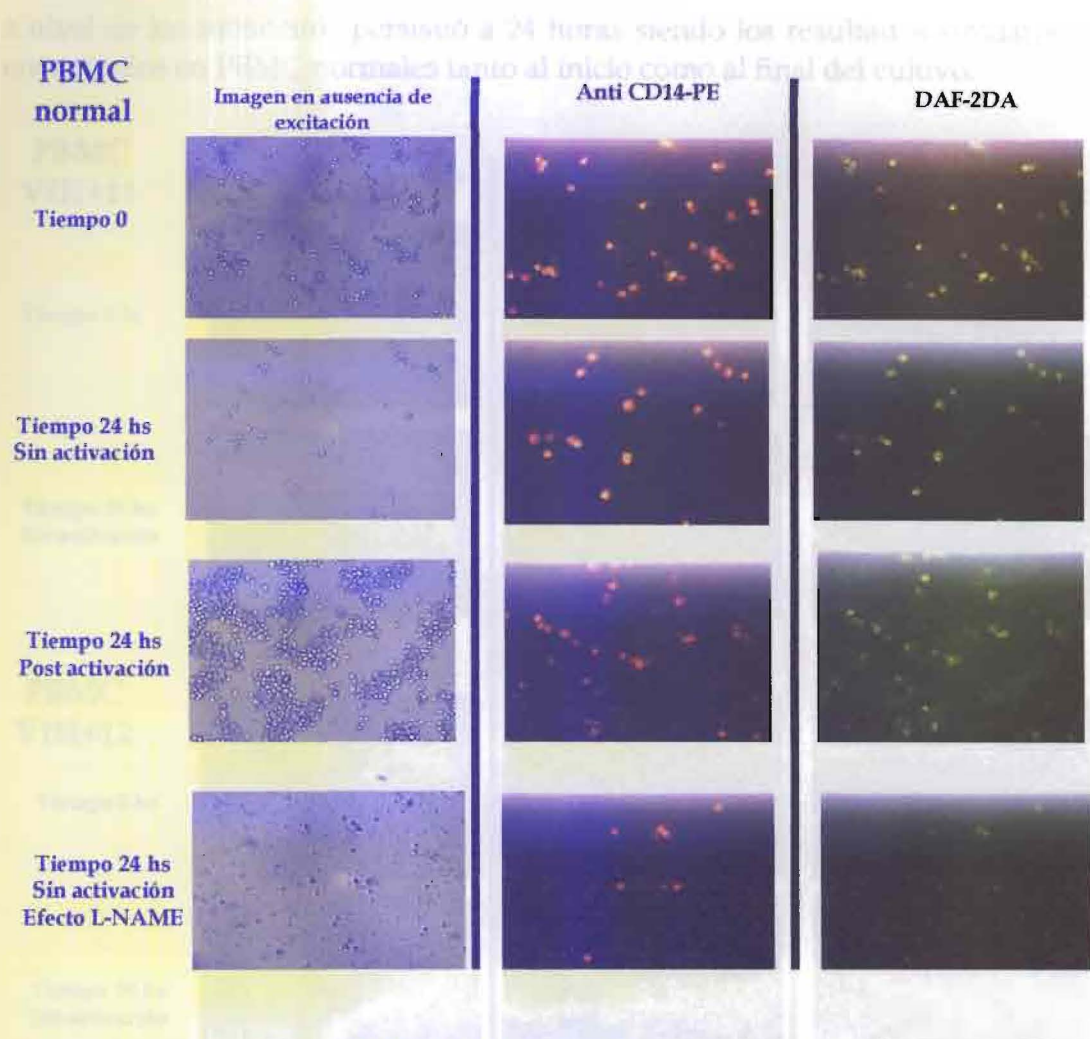


Figura 7A: utilización del DAF-2DA en microcopia de fluorescencia en PBMC normales. Desde arriba hacia abajo se analizan los tiempos 0 hora, 24 horas sin activación, 24 horas post-activación y 24 horas en presencia de L-NAME.

Detección de la fluorescencia del DAF-2T en PBMC de pacientes VIH+: la secuencia y condiciones de trabajo fueron las mismas definidas para las PBMC normales (concentraciones, tiempos y temperaturas). Analizamos 3 muestras procedentes de los pacientes +11, +12 y +13. En los dos primeros pacientes (+11 y +12) analizamos las condiciones tiempo 0 y tiempo 24 sin activación linfocitaria, condicionados por el bajo número de PBMC obtenidos. En el tercer paciente (+13) analizamos tiempo 0 y tiempos 24 horas sin y con activación, con y sin L-NAME.

Pacientes +11 y +12: detectamos fluorescencia emitida por el DAF-2T a nivel de células CD14+ (monocitos) tanto a tiempo 0 hora como a 24 horas sin activación en ambos pacientes. La intensidad de la fluorescencia al inicio del cultivo fue mayor en el paciente +12 comparado contra el pacientes +11 (figura 7B). La fluorescencia

a nivel de los monocitos persistió a 24 horas siendo los resultados similares a los encontrados en PBMC normales tanto al inicio como al final del cultivo.

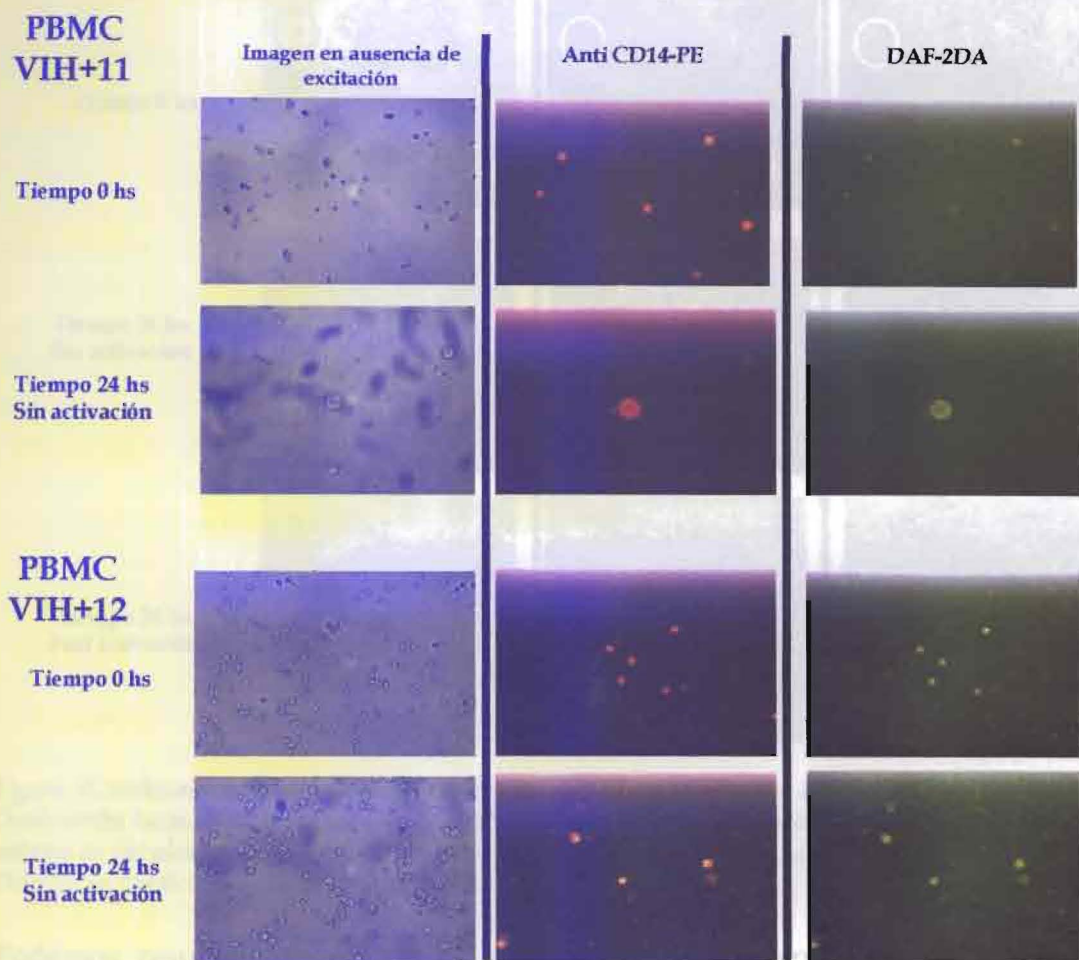


Figura 7B: utilización del DAF-2DA en microcopia de fluorescencia en PBMC de pacientes VIH +11 y +12. Desde arriba hacia abajo se analizan los tiempos 0 hora y 24 horas sin activación.

Paciente +13: en estas PBMC a tiempo 0 hora detectamos fluorescencia emitida por el DAF-2T a nivel de dos tipos celulares: a) en células CD14-PE positivas (los monocitos) y b) a nivel células CD14 negativas (señaladas con un círculo en la figura), mononucleadas y de tamaño mas pequeño que los monocitos observados, características morfológicas que sugieren se traten de linfocitos (figura 7C). En las muestras analizadas con 24 horas con y sin activación linfocitaria la fluorescencia persistió en las células CD14-PE positivas (monocitos) pero ya no se detectaron células CD14-PE negativas que emitieran fluorescencia. Los ensayos realizados con L-NAME sobre las PBMC de este paciente indujeron un franco descenso de la emisión de la fluorescencia, fenómeno que no se produjo con la adición de D-NAME (datos no mostrados).

PBMC VIH +13

Tiempo 0 hs

Tiempo 24 hs
Sin activación

Tiempo 24 hs
Post activación

Sin fluorescencia

Anti CD14-PE

DAF-2DA

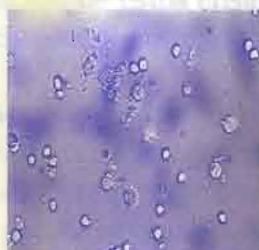
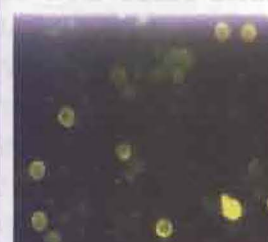
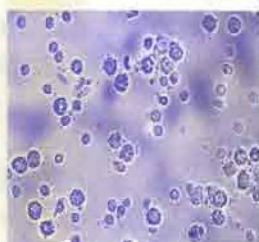
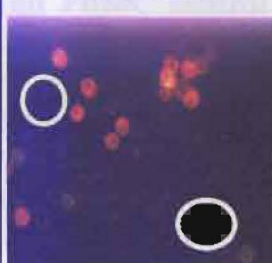
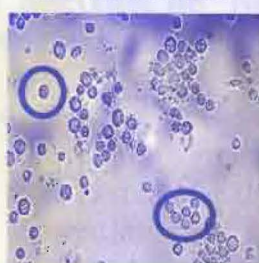


Figura 7C:utilización del DAF-2DA en microscopia de fluorescencia en PBMC del paciente VIH +13. Desde arriba hacia abajo se analizan los tiempos 0 hora y 24 horas sin y con activación. En tiempo 0 horas se señalan en círculos las células mononucleadas CD14 negativas (linfocitos) que emitían fluorescencia con el DAF-2T en condiciones basales.

Podemos resumir diciendo que en PBMC normales encontramos emisión de fluorescencia por el DAF-2T en monocitos tanto en condiciones basales como en condiciones post activación la cual persistió a 24 horas. La fuerte inhibición producida por L-NAME le otorga especificidad al ensayo. En las PBMC de pacientes VIH+ encontramos fluorescencia del DAF-2T en monocitos en condiciones basales que persistió a 24 horas sin activación y post-activación, observando además la presencia de células mononucleadas que en condiciones basales emiten fluorescencia y cuya morfología sugiere se traten de linfocitos. Estos resultados evidencian que las PBMC de pacientes VIH+ producen *NO en condiciones basales y que el mismo es producido tanto por monocitos como por linfocitos, siendo variable la intensidad de la fluorescencia emitida ya que cada uno de los pacientes se encontraba en una situación inmunitaria diferente uno de otro.

8) Detección de producción de $\cdot\text{NO}$ por Citometría de Flujo: utilización del DAF-2DA para la detección de $\cdot\text{NO}$ en PBMC control y de pacientes VIH+ utilizando la Citometría de Flujo.

Inicialmente procedimos a la puesta a punto metodológica del ensayo, utilizando PBMC normales, analizando simultáneamente dos variables: la concentración óptima de trabajo y el tiempo de incubación del DAF-2DA sobre muestras por triplicado. Dichos procedimientos fueron necesarios debido a que no existen reportes en la literatura de análisis por citometría utilizando DAF sobre células mononucleares humanas. La concentración de trabajo del DAF-2DA se estableció en 10 μM luego del análisis de una amplia gama de concentraciones. Establecimos un período óptimo de incubación mínimo con dicha sonda entre 12 y 24 horas para obtener una señal detectable y específica. En cuanto al momento óptimo para el agregado del DAF-2DA a los cultivos, encontramos que la señal de mayor magnitud se observó cuando el agregado se realizó 2 hs después de la activación. Se analizó la realización de estos ensayos sobre células fijadas en PFA al 1% pero la sensibilidad fue francamente inferior a la obtenida con células frescas.

Resultados en PBMC normales: todos los análisis se realizaron sobre una ventana de análisis que incluyó específicamente la población linfocitaria. La población monocitaria fue analizada en ventanas analíticas separadas cuando las condiciones experimentales lo permitieron debido a su baja proporción en las muestras (alto número de adhesión de los macrófagos a la placa de cultivo así como el menor porcentaje en que integran las PBMC). El análisis de los monocitos (CD14-PE positivos) tanto en condiciones de activación como de no activación, mostró emisión de fluorescencia con DAF-2T (dato no mostrado) y fueron utilizados como control positivo de todos los ensayos realizados.

Sobre PBMC normales en condiciones de activación y no activación, en ausencia de DAF-2DA ni marcadas con anticuerpos, seleccionamos los eventos correspondientes a la sub-población linfocitaria en función de la difracción de la luz incidente en diferentes ángulos lo cual es función del tamaño y complejidad interna de las células (FSS y SSC). Sobre dicha ventana (R1 en figura 8A) se realizó el análisis biparamétrico utilizando la fluorescencia emitida por el DAF-2DA en abscisas (FL1) en función de su propiedades morfológicas (SSC).

Sobre la ventana seleccionada y manteniendo los mismos parámetros, analizamos los linfocitos cargados con DAF-2DA en condiciones de activación y no activación. En condiciones de no activación encontramos que el 2% de los linfocitos emiten fluorescencia específica (figura 8A). En condiciones de activación linfocitaria encontramos en FL1 que entre el 4 a 6% de los linfocitos emite fluorescencia específica cuando el estímulo activador fue realizado con una baja concentración de anticuerpos anti CD3 y anti CD28 (figura 8B).

El análisis monoparamétrico de la población linfocitaria cargada con DAF-2T en condiciones de no activación mostró una media de 2,90 (figura 8A) significativamente inferior a la media encontrada en los linfocitos cargados con DA-2T en condiciones de activación cuyo valor fue de 4,96 (figura 8B). Cabe destacar que los valores de las medias descritas están en una escala logarítmica.

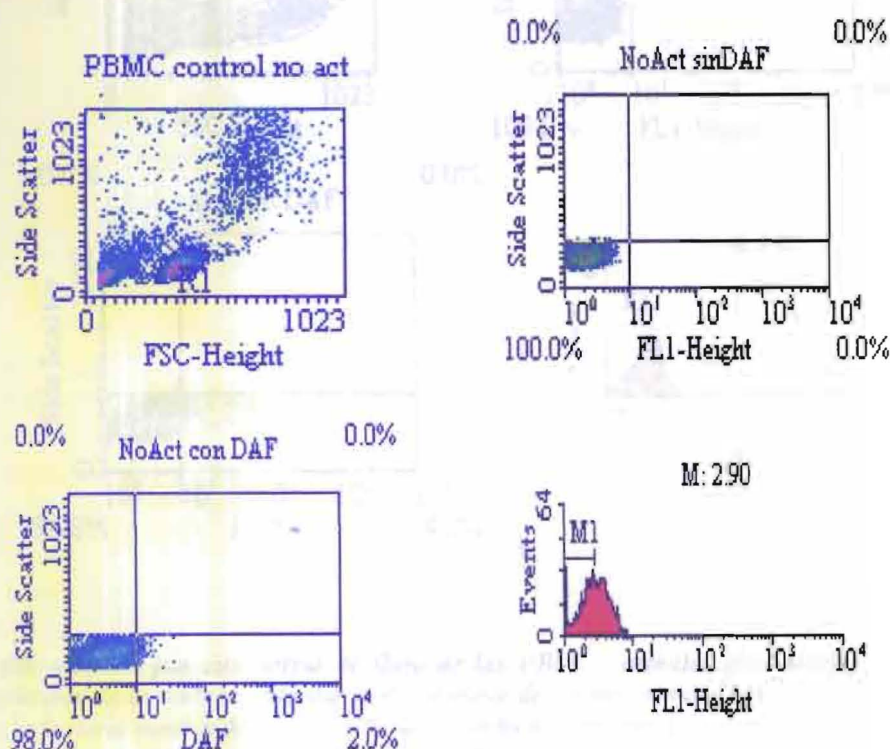


Figura 8A: análisis por citometría de flujo de las PBMC normales sin activación linfocitaria. Arriba selección de la ventana linfocitaria (R1) y ajuste de valores de auto-fluorescencia (sin DAF). Abajo: ventana linfocitaria mostrando que el 2% de los linfocitos emitan fluorescencia para DAF-2T. Análisis monoparamétrico mostrando que la población linfocitaria con DAF-2T presentó una media de intensidad de fluorescencia de 2,90.

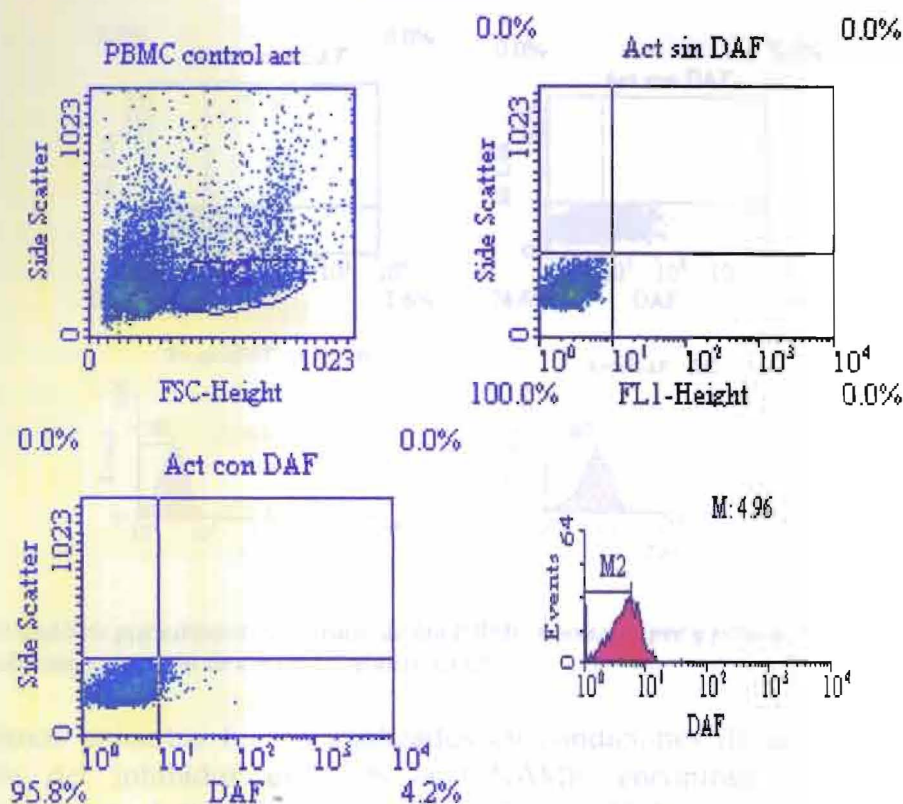


Figura 8B: análisis por citometría de flujo de las PBMC normales post-activación linfocitaria. Arriba selección de la ventana linfocitaria (R2) y ajuste de valores de auto-fluorescencia (sin DAF). Abajo: ventana linfocitaria mostrando que el 4,2% de los linfocitos emitían fluorescencia para DAF-2T. Análisis monoparamétrico mostrando que la población linfocitaria con DAF-2T presentó una media de intensidad de fluorescencia de 4,96.

Cuando las concentraciones del estímulo utilizado fueron elevadas, encontramos un aumento en la fluorescencia del DAF-2T en FL1, detectando hasta un 25% del total de los linfocitos emitiendo fluorescencia. En este caso, la medida de la intensidad de fluorescencia en el análisis monoparamétrico de la población linfocitaria en condiciones de no activación y activación, evidenció una media en 3,79 y 7,10 respectivamente (figura 8C).

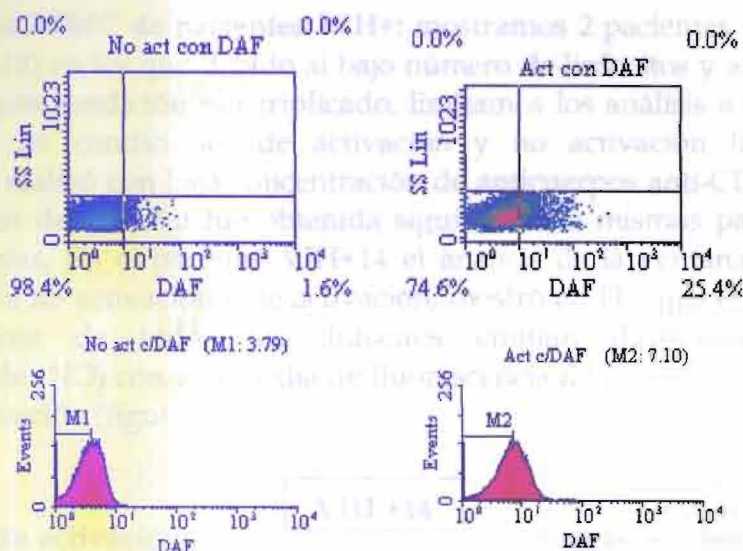


Figura 8C: análisis por citometría de flujo de las PBMC normales pre y post-activación linfocitaria con elevada concentración de anti-CD3 y anti-CD28.

Los mismos linfocitos fueron analizados en condiciones de activación pero en presencia del inhibidor de NOS el L-NAME, encontrando que inhibía la fluorescencia en el 40 a 50% de estos linfocitos. El fenómeno de inhibición se produjo en tanto en monocitos (dato no mostrado) como en linfocitos activados y no activados (figura 8D). El D-NAME no produjo cambios en la emisión de la fluorescencia (dato no mostrado). Cuando analizamos las diferentes subpoblaciones productoras de $\cdot\text{NO}$, encontramos que post-activación, del total de linfocitos que emitían fluorescencia (25,4%), los Linfocitos NK (CD56+) eran 1,9%, los Linfocitos B (CD19+) un 1,6% y los LTCD4+ y LTCD8+ representaban el restante 21,9% de los linfocitos que emitían fluorescencia con el DAF-2T (figura 8D).

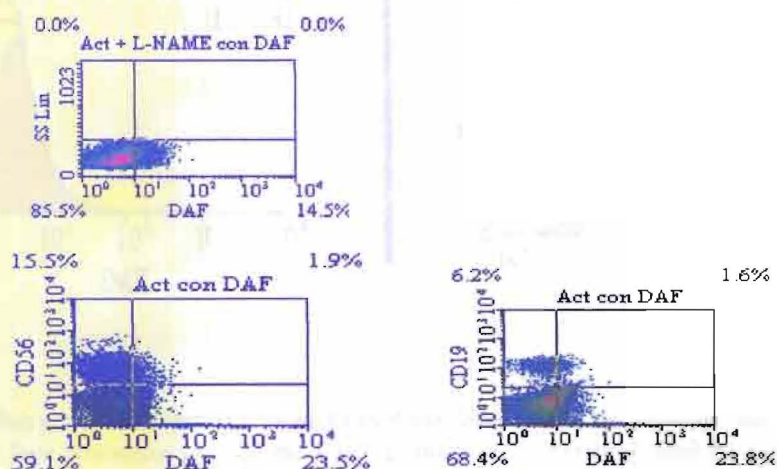


Figura 8D: análisis por citometría de flujo de las PBMC normales post-activación linfocitaria con elevada concentración de anti-CD3 y anti-CD28.

Resultados en PBMC de pacientes VIH+: mostramos 2 pacientes representativos (VIH +14 y +15) en los que debido al bajo número de linfocitos y al requerimiento de ensayar cada condición por triplicado, limitamos los análisis a la detección de fluorescencia en condiciones de activación y no activación linfocitarias. La activación se realizó con baja concentración de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. La adquisición de la señal fue obtenida siguiendo los mismos pasos que en las PBMC normales. En el paciente VIH+14 el análisis de la ventana linfocitaria en condiciones de no activación y de activación, mostró en FL1 que el 5,2% y de 9,4% respectivamente de todos los linfocitos emitían fluorescencia específica (producción de *NO) con una media de fluorescencia de 2,81 los no activados y de 5,78 post-activación (figura 8E).

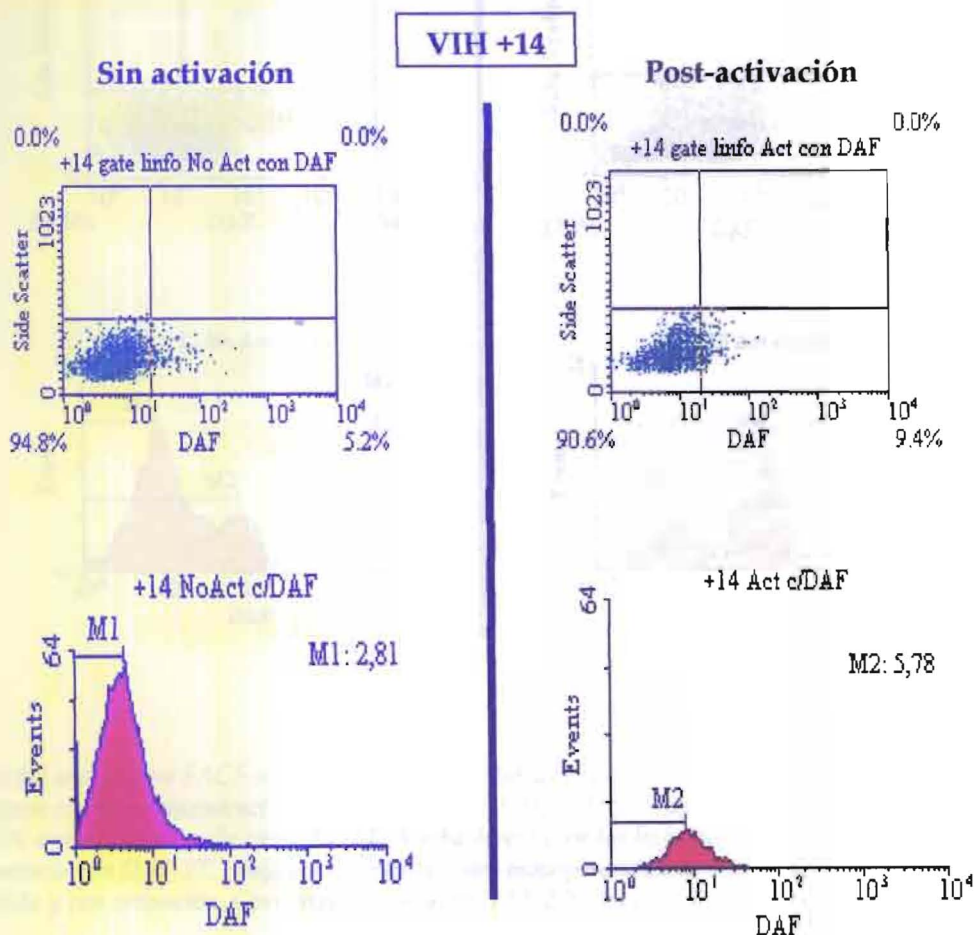


Figura 8E: análisis por FACS sobre la ventana linfocitaria de las PBMC del paciente VIH +14 con activación linfocitaria con baja concentración de anti-CD3 y anti-CD28. Arriba izquierda: en los linfocitos sin activación, el 5,2% emite fluorescencia con DAF-2T. Arriba derecha: en los linfocitos post-activación el 9,4% emiten fluorescencia con DAF-2T. Abajo las representaciones monoparamétricas sobre las ventanas linfocitarias sin activación y con activación. Comparación con y sin DAF-2DA en cada situación.

En el paciente +15 el análisis de la ventana linfocitaria en condiciones de no activación y de activación, mostró en FL1 que el 34,1% y el 62,3% respectivamente de todos los linfocitos emitían fluorescencia (producían $\cdot\text{NO}$). La media de fluorescencia encontrada fue de 9,31 en los no activados y de 40,68 post-activación (figura 8F).

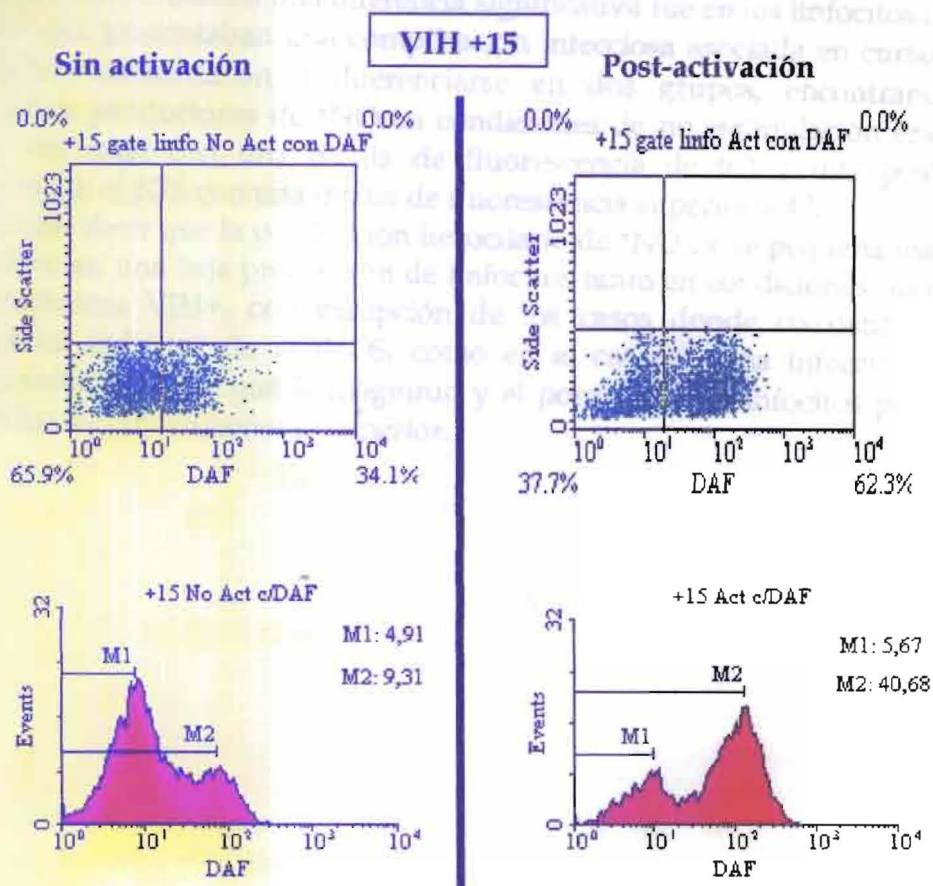


Figura 8F: análisis por FACS sobre la ventana linfocitaria de las PBMC del paciente VIH +15 con activación linfocitaria con baja concentración de anti-CD3 y anti-CD28. Arriba izquierda: de los linfocitos sin activación el 34,1% emite fluorescencia con DAF-2T. Arriba derecha: en los linfocitos post-activación el 62,3% emiten fluorescencia con DAF-2T. Abajo las representaciones monoparamétricas sobre las ventanas linfocitarias sin activación y con activación. Comparación con y sin DAF-2DA en cada situación.

Como hemos observado, la señal de fluorescencia específica encontrada pone en evidencia la producción de $\cdot\text{NO}$ en una baja proporción de linfocitos (2-3%), los cuales sin mediar estimulación producen $\cdot\text{NO}$, duplicándose ese porcentaje post-activación (4-6%), presentando una media de fluorescencia de 3,0 y de 5,0 respectivamente.

Cuando analizamos los pacientes VIH+ encontramos que aquellos que no presentaban una complicación infecciosa asociada al VIH tenían una producción de NO linfocitaria de similares características a los normales. Si bien el porcentaje de linfocitos productores de NO era mayor, las medias de fluorescencia específica encontradas tenían valores próximos a los encontrados en los linfocitos normales. Donde si encontramos una diferencia significativa fue en los linfocitos de pacientes VIH+ que presentaban una complicación infecciosa asociada en curso, donde los linfocitos comenzaban a diferenciarse en dos grupos, encontrando que los linfocitos productores de NO en condiciones de no estimulación eran cerca del 30% del total con una media de fluorescencia de 9,3 y que post-activación superaban el 60% con una media de fluorescencia superior a 40.

Podemos decir que la producción linfocitaria de NO es de pequeña magnitud y se produce en una baja proporción de linfocitos tanto en condiciones normales como en pacientes VIH+, con excepción de los casos donde coexistió un estímulo adicional inductor de la iNOS, como en el caso de una infección oportunista concomitante, en la que la magnitud y el porcentaje de linfocitos productores de NO fue significativamente superior.

5) DISCUSIÓN

Los objetivos generales del presente trabajo consistieron en evaluar la producción de NO a nivel de las PBMC en situación de inmunocompetencia y de inmunodeficiencia asociada a la infección por el VIH-1. Conocidos los efectos moduladores del NO en la respuesta inmunitaria (Bogdan 2000), en particular en la respuesta antiviral (Akaike 2000), (Colasanti 1999) y en la regulación de la apoptosis linfocitaria (Dimmeler 1997), nos orientamos a evaluar la producción de NO a nivel monocitario y linfocitario en las situaciones normal y patológica. En una primera etapa analizamos el rol del NO en la proliferación y la apoptosis en la respuesta normal en nuestro sistema experimental, para posteriormente caracterizar las diferentes subpoblaciones de las PBMC productoras de NO en individuos normales y en infectados por el VIH-1, sugiriendo los potenciales efectos del mismo en situaciones como la inmunodeficiencia.

Participación del NO en la proliferación y la apoptosis de las PBMC de individuos normales. Comenzamos evaluando el rol de dadores de NO e inhibidores de la NOS en las respuestas proliferativas de PBMC normales *in vitro*. Nuestros resultados demuestran que las concentraciones supra-fisiológicas de NO , logradas por NOC-18 y SNAP así como la inhibición de la producción del NO endógeno mediada por el L-NAME fueron capaces de inhibir la proliferación celular. El conjunto de los ensayos evidenció que se produce una inhibición dosis dependiente de la proliferación linfocitaria en presencia de dadores o inhibidores de la producción de NO . Contrariamente, cuando la activación linfocitaria con anti-CD3/PHA la realizamos en presencia de IL-2 y NO en baja concentración, la proliferación se incremento de manera significativa, observando este fenómeno cuando el NO adicional fue aportado por el NOC-18 en concentración 20 μM . Este efecto dosis dependiente del NO en la regulación de la proliferación celular, muestra parte de la complejidad de este mecanismo. Nuestros resultados son concordantes con otros trabajos donde el NO contrarregula el efecto de citoquinas inductoras de la proliferación, conteniendo o potenciando la proliferación de diferentes subpoblaciones (Liew 1995), (Taylor-Robinson 1997).

Con la intención de profundizar en los mecanismos que vinculan al NO endógeno con la apoptosis en las PBMC, utilizamos un inhibidor de la NOS evaluando la presencia de anexina-V sobre la superficie linfocitaria. Nuestras experiencias mostraron que el porcentaje de apoptosis linfocitaria en condiciones basales es duplicado luego de 24 horas de ocurrida la activación linfocitaria con una evolución proporcionalmente mayor en los CD8^+ , resultado coincidente el de otros autores (García 2001). Cuando observamos este mismo proceso en presencia de L-NAME encontramos que el porcentaje de linfocitos en apoptosis a 24 horas de la activación descendió significativamente, llegando a niveles por debajo de los

encontrados en condiciones basales, con un efecto inhibitorio mas profundo en los linfocitos T CD8+.

Las experiencias donde concentraciones de $\cdot\text{NO}$ superiores o inferiores a las fisiológicas (logradas por aporte exógeno o inhibición de la síntesis endógena respectivamente) mostraron inhibir la proliferación celular, estarían sugiriendo una mayor evolución hacia la apoptosis linfocitaria, situación que evaluamos en ausencia de $\cdot\text{NO}$ encontrando una apoptosis descendida. Estos resultados aparentemente contradictorios, donde la inhibición de la proliferación no se acompaña de una apoptosis aumentada, podrían estar traduciendo la existencia de una evolución hacia la anergia, de manera que la ausencia de $\cdot\text{NO}$ puede proteger a la célula de la apoptosis pero induciendo un estado de inactividad o quiescencia como el de la anergia. De esta manera los resultados "paradójicos" entre descenso en la proliferación y descenso en la apoptosis ponen de manifiesto que el $\cdot\text{NO}$ inhibiría la proliferación celular por mecanismos adicionales al desarrollo de la apoptosis (Liew 1995) (Taylor-Robinson 1997).

Nuestros resultados constituyen un aporte mas que sostiene el doble rol asignado al $\cdot\text{NO}$ en la regulación de la respuesta inmunitaria normal, donde el efecto de su presencia está estrechamente ligado a la concentración a la que se encuentre en el medio celular (efecto dosis dependiente).

Relación nitrotirosina y apoptosis en PBMC normales y de pacientes VIH+: otra forma de evaluar el efecto del $\cdot\text{NO}$ en el desarrollo de la apoptosis linfocitaria en nuestras condiciones experimentales, fue considerar que el efecto beneficioso (Bogdan 2000) o perjudicial del $\cdot\text{NO}$ (Boven 1999) depende en gran medida de sus especies reactivas derivadas, poniendo particular interés en el peroxinitrito. Contrariamente al $\cdot\text{NO}$, el peroxinitrito es un potente agente oxidante con la capacidad de nitrar residuos fenólicos en las proteínas, lo que constituye una huella molecular de su producción. En trabajos previos de nuestro grupo (Brito 1999) se demostró que el peroxinitrito es producido en las respuestas inmunes normales, pero en ellos no se evaluó la capacidad del peroxinitrito de inducir apoptosis. Conocido el rol pro-apoptótico del $\cdot\text{NO}$ y en base a los resultados previos, decidimos evaluar la producción de peroxinitrito a través de la presencia de nitrotirosina en la superficie linfocitaria y como se relaciona con el proceso apoptótico en condiciones normales y en la infección por VIH-1.

En linfocitos de PBMC encontramos por citometría de flujo que tanto en condiciones basales como luego de 24 horas post-activación, existe un porcentaje de apoptosis linfocitaria significativamente mayor en los linfocitos de pacientes VIH+ que en linfocitos normales, resultados coincidentes con los referidos en la bibliografía (Badley 2000). En cuanto a la nitración proteica celular, la misma la evaluamos con un anticuerpo policlonal anti-nitrotirosina por WB (en PBMC) y por citometría de flujo (en linfocitos). En ambos métodos detectamos niveles

extremadamente bajos o ausentes de nitrotirosina en PBMC y linfocitos de pacientes VIH+ contrariamente a los encontrados en individuos normales en los que detectamos un grado de nitración basal que se incrementa francamente post-activación.

Estos resultados indican que en la activación linfocitaria la producción de especies nitrantes es un hecho normal de la respuesta inmunitaria y que en el caso de los infectados por el VIH se produce una alteración que lleva a su descenso. Las cantidades extremadamente bajas (o inexistentes) en los niveles de proteínas intracelulares nitradas post-activación en los linfocitos de pacientes VIH+, podrían evidenciar una ausencia de asociación entre la nitración y la apoptosis. La baja producción de peroxinitrito u otros agentes nitrantes en PBMC de pacientes VIH+, podría ser explicada tanto por una producción de $\cdot\text{NO}$ globalmente disminuida y/o que la producción de $\cdot\text{NO}$ este conservada pero no se den las condiciones de reacción con otras especies reactivas del oxígeno como el super-óxido para generar peroxinitrito u otras eventuales especies nitrantes. De tratarse de una disminución significativa de la producción de $\cdot\text{NO}$ esta podría deberse a tres causas principales: a) una alteración a nivel transcripcional del gen de la iNOS, b) una alteración post-transcripcional (falta de cofactores, splicing alternativo, modificaciones post-traduccionales) que puedan afectar la producción de la proteína o su actividad funcional y c) que la mayor parte del $\cdot\text{NO}$ producido se consuma en diversos caminos (destinos) diferentes al de la situación normal (acción antiviral-microbicida inactivando enzimas virales) (Persichini 1998) (Persichini 1999).

Como explicación adicional posible, queremos remarcar que el fenómeno de nitración proteica puede tener un bajo rendimiento en las concentraciones y condiciones biológicas encontradas *in vivo* (Pfeiffer 2001) (Radi 2004) pudiendo también explicar los resultados encontrados en los pacientes VIH+.

Expresión del mRNA de la iNOS y de la enzima iNOS en PBMC normales y de pacientes VIH+. La producción de $\cdot\text{NO}$ y de peroxinitrito forman parte de la respuesta inmunitaria normal (Bogdan 2000), donde la fuente productora de $\cdot\text{NO}$ a nivel monocitario es la iNOS que se expresa normalmente luego de un estímulo inductor. Este dato nos llevó estudiar la expresión de la iNOS en los individuos normales y en los infectados por el VIH, empleando para esto la detección mediante ensayos de RT-PCR en cultivos de PBMC. Este método es el mas ampliamente utilizado para demostrar la presencia de la iNOS (Bukrinsky 1995), (Adamson 1996), existiendo otras posibilidades como su detección por WB, resultado que no obtuvimos en nuestras condiciones experimentales pero que ha sido reportado por otros autores (Tiscornia 2004).

Los resultados obtenidos mediante Nested-PCR en las PBMC normales mostraron la ausencia de la iNOS en condiciones basales, seguido de una clara inducción en la

expresión post-activación, expresándose con mayor intensidad a 7 hs. En cultivos en ausencia de estimulación también detectamos la expresión de la iNOS, evidenciando que el contacto de las PBMC con el medio extracelular es capaz de lograr la su expresión (de baja intensidad). En nuestro modelo experimental pensamos que la iNOS detectada corresponde a la iNOS monocito-macrofágica, pero como el estímulo activador utilizado es linfocitario T específico, no podemos descartar que la producción de NO también sea mediada por la eNOS linfocitaria T (Reiling 1996) o por una probable isoforma de la iNOS a es nivel. La activación linfocitaria podría inducir la expresión progresiva de la iNOS por dos vías no excluyentes: a) activación linfocitaria seguida de un aumento en la producción de citoquinas que regulan positivamente la expresión de la iNOS monocitaria y b) que el estímulo de activación induzca directamente la expresión de una NOS linfocitaria T. El estímulo adicional con IL-2 (junto con anti-CD3/PHA) produjo un aumento en la expresión temporal de la iNOS, pudiendo considerar a esta citoquina como potenciadora de su expresión, ya que se mostró infectiva por si sola para inducirla (dato no mostrado).

Para valorar la expresión de la iNOS en pacientes VIH+, las electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio se mostraron tan eficientes como los métodos de mayor sensibilidad utilizados. Estos métodos alternativos mas onerosos y complejos, no mejoraron la sensibilidad de detección planteando que la electroforesis en agarosa reflejó con alta sensibilidad la presencia o ausencia de la iNOS y es en base a ella es que realizaremos nuestra discusión.

La presencia o ausencia de la expresión de la iNOS en las PBMC en cultivo en condiciones basales nos permitió separar los pacientes VIH+ en dos grupos.

En el grupo A (presencia de la iNOS en condiciones basales) los pacientes presentaban cantidades superiores a 300 LTCD4+/ul, excepto un paciente (+12) el cual se encontraba en una situación de inmunodeficiencia severa (etapa SIDA). Este paciente cursaba una tuberculosis junto a una hepatitis tóxica medicamentosa (que contraindicaba los fármacos antituberculosos), lo cual constituía una infección activa por *Mycobacterium tuberculosis* que contribuyera en la expresión de la iNOS.

El otro punto de interés dentro del grupo A, fue el progresivo descenso en la expresión de la iNOS post-activación linfocitaria, llegando en algunos casos a desaparecer. Esta cinética de inhibición progresiva post-activación linfocitaria es completamente inversa a lo encontrado en los controles normales.

La expresión en condiciones basales (sin estimulación experimental) de la iNOS podemos explicarla de dos maneras. La primera estaría dada por la presencia de un desequilibrio en la producción de citoquinas con predominio Th1 (producidas

por linfocitos Th1 espontáneamente activados), fenómeno que se plantea puede producirse en casos de VIH sin inmunodeficiencia severa (Bahbouhi 2004). La segunda explicación posible sería que la iNOS detectada se tratase de una iNOS linfocitaria T, teniendo como evidencia a su favor que pudiera ser solo detectada en los pacientes con elevado número de LTCD4+.

La inhibición progresiva en la expresión de la iNOS post-activación linfocitaria podemos explicarla por tres mecanismos posibles, los que actuarían de manera aislada o simultánea, en diferente o igual proporción. La primera posibilidad y tal vez la mas factible, es que la activación de linfocitos ya crónicamente estimulados, los lleve a la inactivación por el sobre-estímulo impuesto (anergia o muerte post activación o estado refractario a una nueva estimulación) (Abbas 2004). La segunda posibilidad es que el predominio Th1 se vea alterado luego de la activación linfocitaria al reclutarse los linfocitos Th2 (hasta entonces en reposo) desplazando el equilibrio hacia el predominio Th2 capaz de inhibir la expresión de la iNOS (Ganster 2000), (Romagnani 1996). Una variación que no podemos descartar es que los linfocitos reclutados con la activación experimental sean Linfocitos T reguladores (CD4+ CD25+) capaces de producir IL-10 y (en menor medida) TGFbeta, potentes citoquinas inhibitoras de la expresión de la iNOS (Vodovotz 1997). La tercera posibilidad podría ser que el estímulo mediado por PHA es capaz de estimular con mayor eficiencia las respuestas de tipo Th2 en lugar de la de tipo Th1 (Taylor-Robinson 1994).

En el grupo B (ausencia de la iNOS en condiciones basales) los pacientes se encontraban en etapa SIDA, con excepción de uno de ellos (+10) el cual tenía un estado de inmunodepresión moderado a severo (234 LTCD4+/ul). En todos los casos las cifras de LTCD4+ eran inferiores a 300/ul. En dos pacientes se pudo observar una débil y transitoria ("retardada") expresión de la iNOS post-activación linfocitaria, probablemente relacionada con la complicación infecciosa asociada en ese momento.

La ausencia en la expresión de la iNOS tanto en condiciones basales como posterior al estímulo activador linfocitario podemos explicarla de dos maneras. La primera estaría relacionada a los casos de inmunodepresión severa (SIDA) donde existe un descenso de las respuestas Th1 y un mantenimiento de las respuestas de linfocitos Th2 que sumado al estímulo experimental se potenciaría y reclutaría mas linfocitos Th2, incrementando el desequilibrio aún mas hacia ese predominio inhibiendo la expresión de la iNOS. Otra probable explicación sería que existiera una relación directa entre la baja representación de la población linfocitaria y los disminuidos niveles de la iNOS. En este sentido nos preguntamos: el bajo número de LTCD4+ hace que la concentración de citoquinas Th1 sea baja o es que se trata de una isoforma linfocitaria T de la iNOS? Existen datos sobre la existencia de una

NOS endotelial en linfocitos T y B de sangre periférica humanos normales (Reiling 1996), pero no disponemos de datos de una iNOS linfocitaria T humana.

Podemos plantear que para la expresión de la iNOS, el predominio Th1 (presente en pacientes con inmunodeficiencia leve) es responsable de su inducción y de manera contraria, el predominio Th2 (presente en la inmunodeficiencia severa) es el responsable su inhibición, pudiendo constituir la expresión de la iNOS un marcador indirecto de la relación Th1/Th2 en el curso de infección por VIH-1, sabiendo que puede verse influenciada transitoriamente por la presencia de complicaciones infecciosas intercurrentes. Este concepto es aplicado por diversos autores (Kolb-Bachofen 2000), (Bogdan 1998) en la patogenia de las enfermedades autoinmunitarias.

La recuperación en la expresión de la iNOS posterior al agregado de IL-2 observada en algunos pacientes, podría ser una evidencia de la importancia de la respuesta Th1 en la expresión de la iNOS. El efecto beneficioso del uso de IL-2 como tratamiento adyuvante a la HAART podría (Chun 1999) (parcialmente) ser explicado por la inducción de la iNOS lograda con este estímulo. Pensamos que la adición de IL-2 podría lograr la recuperación en la expresión de la iNOS, actuando a 4 niveles: 1) producir un "rescate" de los Th1 que van a la apoptosis, 2) actuando en la regulación del gen de la iNOS, 3) contrarregulando "el disparo" en la producción de IL-4 desencadenado por el PHA o 4) potenciando el efecto de otras citoquinas.

Considerando nuestros resultados nos hacemos dos preguntas: a) los cambios en la expresión de la iNOS son producidos por la infección por el VIH, por las infecciones oportunistas o por las alteraciones inmunitarias resultantes de ambos? y b) constituye la expresión de la iNOS un marcador indirecto de la relación Th1/Th2 presente en la infección por VIH-1?. Obviamente para llegar a una correcta respuesta deberíamos utilizar una muestra con un número mayor de pacientes VIH+ con y sin infecciones oportunistas y realizar más experiencias.

Tomados en conjunto estos resultados permiten remarcar tres aspectos de fundamental importancia relacionados con la expresión de la iNOS y la progresión al SIDA:

a) la iNOS en el curso de la infección por el VIH-1 aparece con un nivel de sobre-expresión (patológico) en condiciones basales en pacientes con inmunodeficiencia leve y su expresión no se detecta (a pesar de un estímulo adecuado) en los pacientes con inmunodeficiencia severa.

b) la expresión de la iNOS podría estar condicionada por el nivel de citoquinas predominante en ese momento, el cual a su vez depende de al menos dos variables: el estadio de la infección VIH-1 y la existencia de infecciones oportunistas.

c) la expresión de la iNOS podría constituir un marcador indirecto de la relación Th1/Th2 en las diferentes etapas de la infección. En este sentido la mayor expresión de la iNOS equivale a una mayor proporción de respuestas Th1 lo que se asocia a etapas menos evolucionadas de la enfermedad y contrariamente la disminución o ausencia de la iNOS estaría revelando una respuesta Th2 y una mayor evolución de la enfermedad. Este comportamiento puede sufrir variaciones transitorias en función de la existencia de complicaciones infecciosas intercurrentes las cuales claramente inducen un refuerzo en la expresión de la iNOS "similar o mayor" al encontrado en sujetos normales.

Determinación de la producción de especies reactivas del nitrógeno. La demostración de la expresión del mRNA de la iNOS y la imposibilidad de detectar la enzima por WB, fueron los resultados previos antes de analizar la producción de $\cdot\text{NO}$ en las PBMC. En una primera etapa evaluamos la producción de $\cdot\text{NO}$ en las PBMC en su conjunto y en una segunda etapa evaluamos la producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel de las diferentes sub-poblaciones celulares dentro de las PBMC.

Detección de nitritos. Nuestra primera aproximación a la producción de $\cdot\text{NO}$ en las PBMC la hicimos detectando la presencia de nitritos (compuestos estables de reacción del $\cdot\text{NO}$). La determinación de nitritos por el método de Griess no tuvo la sensibilidad adecuada para detectar valores significativos tanto en plasma como en sobrenadantes de cultivo de PBMC normales y de pacientes VIH+. No pudimos lograr la detección de nitritos referida en múltiples trabajos que basan su análisis en la detección de nitritos en plasma o cultivo de PBMC (Mossalayi 1999), (Hermann 1997), (Groeneveld 1996), (Torre 2002). Nuestros resultados evidencian que estamos en un sistema de baja producción de $\cdot\text{NO}$ lo cual hace a esta técnica no adecuada y de baja sensibilidad en nuestras condiciones experimentales. Si bien en cultivos de monocitos, la reacción de Griess se ha mostrado eficiente, la confirmación de la producción de $\cdot\text{NO}$ mediante EPR supera su sensibilidad (Bukrinski 1995). Una manera alternativa es medir la actividad de la NOS (estimada por la conversión de arginina en citrulina) (Taylor-Robinson 1994) o medir la detección de nitración en residuos de proteínas mediante WB (Brito 1999).

Detección de $\cdot\text{NO}$ utilizando DAF-2 en fluorimetría: el desarrollo de nuevas herramientas para la detección de $\cdot\text{NO}$ (Nagano 1999) nos permitió ampliar el espectro para detectarlo en nuestro sistema experimental. Con la utilización de DAF-2 encontramos que la fluorescencia detectada en homogenizados de PBMC normales superaron en más del 50% la fluorescencia producida por las PBMC del paciente VIH+. Esta diferencia evidencia que la producción de $\cdot\text{NO}$ realizada por PBMC normales post-activación linfocitaria es significativamente superior a la producción encontrada en las PBMC del paciente VIH+. Este resultado constituye la primera evidencia directa que el $\cdot\text{NO}$ se produce en las PBMC y es detectado en

nuestro diseño experimental siendo nuestro primer dato cuantitativo para diferenciar la producción de $\cdot\text{NO}$ entre la situación normal y la patológica. En trabajos recientes el DAF ha sido utilizado para la cuantificación de la producción de $\cdot\text{NO}$ aplicado en diferentes modelos celulares (Kojima 1998), (Nagano 1999), caracterizando la producción de $\cdot\text{NO}$ en células vivas en condiciones basales (Lopez-Figueroa 2001).

Es importante especificar que la detección cuantitativa de $\cdot\text{NO}$ que realizamos, representaba el total de $\cdot\text{NO}$ producido por las PBMC, no pudiendo identificar si el $\cdot\text{NO}$ presente se produce exclusivamente en los monocitos o también se produce a nivel linfocitario. Si bien existen datos de la producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel linfocitario en ratones (Taylor-Robinson 1994), líneas celulares T y B (Kröncke 1998) así como en linfocitos B normales (Mannik 1995) y patológicos (Tiscornia 2004), no se disponen de fuertes evidencias que demuestren la producción de $\cdot\text{NO}$ por linfocitos T humanos normales ni procedentes de pacientes VIH+.

Podemos decir que si bien será necesario realizar estas experiencias en un número mayor de pacientes, la utilización del DAF-2 en la determinación de la producción de $\cdot\text{NO}$ en lisados de PBMC normales y de pacientes VIH+ es una técnica sensible y de alta eficiencia como herramienta cuantificadora.

Detección de $\cdot\text{NO}$ utilizando DAF-2DA en microscopia de fluorescencia: el uso del DAF-2 nos aproximó a la cantidad en la que se produce el $\cdot\text{NO}$ en condiciones normales y patológicas, pero sin discriminar que subpoblaciones eran las responsables de su producción. La utilización del DAF-2DA en microscopia de fluorescencia representó una herramienta útil para detectar la producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel intracelular, evaluando cualitativamente y comparativamente la producción de $\cdot\text{NO}$ en las distintas sub-poblaciones que integran las PBMC con la particular desventaja de no poder realizar medidas cuantitativas.

La citopenia característica de los pacientes VIH+ constituyó una dificultad importante a considerar ya que nos limitó en la obtención de una adecuada cantidad de células de sangre periférica, a lo que debimos agregar otras variables que aumentaron aun mas el descenso del número de PBMC, destacando: a) el mayor desarrollo de apoptosis espontánea en células CD4+, b) el propio efecto citopático del VIH sobre células CD4+ en cultivo y c) el mayor grado de muerte celular inducido por la activación linfocitaria.

De los resultados observados en PBMC normales podemos decir que existe producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel de los monocitos desde el inicio de los ensayos (tiempo cero hora). Cabe destacar que no podemos considerar como "situación basal" a la condición "tiempo cero hora", siendo condiciones diferentes y no equiparables, ya que el solo hecho de prepararlas para su estudio (aislarlas, exponerlas a condiciones de cultivo, cargar el DAF, marcado con anticuerpos) insinúa cerca de 6 horas, tiempo y condiciones capaces de inducir la expresión de la iNOS como ya lo

demostramos por RT-PCR y como se ha reportado en diversos trabajos (Ganster 2000). Las PBMC normales en cultivo por 24 horas con y sin activación linfocitaria mantuvieron la producción de $\cdot\text{NO}$, siendo inhibida por el L-NAME lo que le otorgó especificidad a nuestro sistema de trabajo y atribuyó a la NOS la producción del $\cdot\text{NO}$ a nivel monocitario.

En las PBMC procedentes de pacientes VIH+ la producción de $\cdot\text{NO}$ se observó restringida a la población monocitaria (CD14-PE positivas) y en niveles similares a los encontrados en PBMC normales, tanto en condiciones de ausencia o presencia de activación linfocitaria. En el caso de las PBMC del paciente +13 encontramos células CD14-PE positivas (monocitos) y células CD14-PE negativas (mayoritariamente linfocitos) que emitían fluorescencia por DAF-2T, pudiendo tratarse tanto de linfocitos NK, T o B. Este resultado constituía la primera evidencia de la producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel de linfocitos procedentes de un paciente VIH+, documentando que la producción de $\cdot\text{NO}$ tenía su origen simultáneamente en monocitos y en linfocitos.

Un hecho de importancia a considerar es que los 3 pacientes VIH+ analizados estaban cursando un proceso infeccioso sobre-agregado a la infección VIH-1. En los tres casos eran infecciones marcadoras de etapa SIDA y que coincidentemente podrían estar condicionando una inducción en la expresión de la iNOS. Cuando analizamos la expresión de la iNOS encontramos que quien no la expresaba en condiciones basales presentaba intensidades de fluorescencia menores en la microscopia.

Mediante la microscopia de fluorescencia fue posible identificar el origen celular de la producción de $\cdot\text{NO}$, confirmando la sabida producción monocitaria (Bukrinski 1995) mediante un nuevo método, identificando además a los linfocitos como fuente celular productora de $\cdot\text{NO}$, constituyendo una fuerte evidencia de la existencia de una isoforma de la NOS a nivel de los linfocitos humanos. EL DAF-2DA en esta técnica ha sido utilizado para identificar la producción de $\cdot\text{NO}$ en líneas celulares humanas y murinas (Kojima 1998), (Nagano 1999), cultivos primarios de linfocitos B normales y patológicos (Tiscornia 2004), de endotelio vascular, del sistema nervioso y de fibroblastos (López-Figueroa 2001), (Takagi 2003), pero hasta ahora no había sido utilizado en PBMC procedentes de pacientes VIH+. En el análisis por microscopia de fluorescencia, luego de la excitación la emisión de fluorescencia por las moléculas decae de manera variable en función del tiempo, disminuyendo de esta manera su identificación visual, por lo que constituye un método de baja sensibilidad. Esto nos llevó a pensar que podría existir producción de $\cdot\text{NO}$ en linfocitos normales y procedentes de pacientes VIH+ pero que requeriríamos un método mas sensible y cuya detección no dependiera de la agudeza visual humana utilizada en la microscopia.

Analizados en su conjunto remarcamos tres datos de mayor jerarquía:

a) el DAF-2DA constituye una excelente herramienta para detectar de manera cualitativa la producción de $\cdot\text{NO}$ a nivel de las PBMC normales o procedentes de pacientes VIH+.

b) confirmamos la producción de $\cdot\text{NO}$ en PBMC de pacientes VIH+, la cual aparece de manera espontánea ya desde el inicio de los ensayos y se mantiene luego de 24 horas de cultivo.

c) la producción del $\cdot\text{NO}$ esta mediada tanto por monocitos como por linfocitos en las PBMC de pacientes VIH+, siendo este el primer dato de su producción a ese nivel en esta patología.

Detección de $\cdot\text{NO}$ utilizando DAF-2DA en citometría de flujo: la utilidad del DAF-2DA como sonda fluorescente capaz de detectar el $\cdot\text{NO}$ a nivel de células intactas nos permitía poder utilizarlo en citometría de flujo, método de mayor sensibilidad que la microscopia de fluorescencia.

Producción de $\cdot\text{NO}$ en PBMC normales: identificamos que en linfocitos normales, luego de 12 a 24 horas de cultivo, en condiciones de no activación, se produjo la emisión de fluorescencia en un bajo porcentaje de los mismos (2-4%), equivalente a decir que solo una pequeña proporción de los linfocitos producen $\cdot\text{NO}$ de manera basal. Luego de la activación con baja concentración de anti-CD3 y anti-CD28, el porcentaje de linfocitos productores de $\cdot\text{NO}$ se duplicó (4-6%), demostrando que la capacidad de producción de $\cdot\text{NO}$ linfocitaria podría ser proporcional al estímulo recibido, confirmando dicho planteo ya que el aumento en las concentraciones del mismo estímulo llevaron a que el 25% de los linfocitos produjeran $\cdot\text{NO}$. El análisis monoparamétrico puso en evidencia que la media de la señal de intensidad de fluorescencia aumentaba claramente en los linfocitos activados, siendo estos los responsables mayoritariamente de la producción de $\cdot\text{NO}$.

En el estudio de las diferentes sub-poblaciones linfocitarias normales que producen $\cdot\text{NO}$, no pudimos utilizar la molécula CD3 ya que se internalizaba luego del estímulo activador (dato no mostrado). Estudiamos las sub-poblaciones con anti-CD25 (marcador de activación) encontrando que la producción de $\cdot\text{NO}$ linfocitaria se daba en mayor proporción en el grupo de los linfocitos activados (CD25+) (dato no mostrado). Identificamos que tanto los Linfocitos NK como los Linfocitos B son capaces de producir en baja proporción el $\cdot\text{NO}$ y que la mayor proporción (86%) de la fluorescencia emitida por el DAF-2T se originaba en linfocitos T.

Producción de $\cdot\text{NO}$ en PBMC de pacientes VIH+: tanto en condiciones de no activación como de post-activación linfocitaria detectamos producción de $\cdot\text{NO}$ a

nivel de los linfocitos procedentes de pacientes VIH+. Estos datos indican la mayor sensibilidad de las técnicas citométricas en la detección de fluorescencia dependiente del DAF en linfocitos comparado con la microscopia de fluorescencia. Uno de los pacientes arriba presentados (+14) presentaba una infección no oportunista tratada con buena evolución. En el encontramos un perfil citométrico de similares características a los encontrados en los linfocitos normales, donde si bien el porcentaje de linfocitos productores de *NO era mayor en el paciente VIH+, las medias de intensidad de fluorescencia en ambos casos eran muy próximas, determinando que las diferencias son no significativas.

El otro paciente analizado (+15) presentaba una tuberculosis pulmonar activa (no tratada), en el cual encontramos diferencias significativas en comparación con la situación normal. En este ensayo encontramos que tanto el porcentaje de linfocitos como las medias de intensidad de fluorescencia por ellos emitida post-activación linfocitaria fue significativamente superior, encontrándose 10 veces por encima de los valores normales. Este resultado apoya el planteo que la producción de *NO está fuertemente condicionada por las infecciones oportunistas coexistentes, contribuyendo con una fuerte inducción en la expresión de la iNOS como lo planteáramos con la expresión del mRNA. Estos resultados apotarían una evidencia mas a la inducción de la iNOS realizada por *Mycobacterium tuberculosis* como ha sido referida por diversos autores (Nicholson 1996), (Kahn 2001).

Mediante la utilización del DAF-2DA en citometría de flujo ha podido evaluarse la producción de *NO en líneas celulares, cultivos primarios de células tumorales y células del endotelio vascular (Navarro-Antolin 2001), (Havenga 2001), no encontrando hasta ahora resultados de su utilización en linfocitos T humanos normales o en PBMC procedentes de pacientes VIH+. Decimos que el DAF-2DA constituye una excelente herramienta para ser utilizada en citometría de flujo, mediante la cual pudimos identificar la producción linfocitaria de *NO y analizar las sub-poblaciones celulares responsables de su producción.

Integración de los resultados y discusión general: Analizando colectivamente los datos discutidos, sería importante comparar los resultados obtenidos en PBMC normales contra los obtenidos en PBMC de pacientes VIH+.

En PBMC normales la expresión del mRNA de la iNOS y la producción de *NO progresivas post-activación linfocitaria, se acompañaron de la producción ERN como el peroxinitrito, cada una de ellas demostradas por RT-PCR, fluorescencia del DAF (por fluorimetría, microscopia y citometría) y presencia de nitrotirosina (por WB y citometría) respectivamente. Encontramos que en los individuos inmunocompetentes la producción de *NO se realiza tanto a nivel de monocitos-macrófagos como de linfocitos, con una intensidad variable dependiendo del tipo

de activación linfocitaria utilizada, teniendo dentro de sus efectos demostrados la generación de nitrotirosina en las proteínas de las PBMC.

En PBMC de pacientes VIH+ encontramos la iNOS expresada de manera basal en pacientes con inmunodeficiencia leve (número de LTCD4+>300/ul), mientras que en pacientes con inmunodeficiencia severa (LTCD4+<300/ul) no detectamos expresión de la iNOS en condiciones basales, no lográndo una expresión como la observada en los individuos normales. En los pacientes donde se detectó la expresión de la iNOS también pudimos encontrar producción de *NO pero no pudimos correlacionar esta producción con la producción de peroxinitrito ya que encontramos una descendida presencia de nitrotirosina en los residuos de proteínas celulares tanto por WB como por citometría de flujo. En las PBMC de algunos pacientes VIH+ pudimos verificar la producción de *NO en monocitos y al mismo tiempo encontrar fuertes evidencias de la producción de *NO a nivel de los linfocitos T, mediante el uso del DAF-2DA en microscopia de fluorescencia y citometría de flujo. Estos resultados nos permitieron conocer de manera cualitativa el origen celular de la producción del *NO en las PBMC de los pacientes VIH+, pudiendo entonces afirmar que existe producción de *NO a nivel de los linfocitos T, la cual tiene similares características a la producida en los linfocitos de individuos normales, con la excepción de los pacientes que cursan una infección oportunista como la tuberculosis con potencial poder inductor de la iNOS.

En cuanto a la magnitud de su producción, solamente en el paciente +7 pudimos cuantificar la producción de *NO en las PBMC (valorada por DAF-2 en fluorimetría), encontrando que el *NO se produjo en cantidades mas bajas que las encontradas en la PBMC normales a 24 horas post-activación.

Analizando nuestros resultados en el contexto de los datos disponibles en la bibliografía, encontramos que los trabajos que relacionan al *NO y al VIH-1 en una gran proporción apuntan a descifrar la función del *NO, basándose principalmente en modelos que utilizan dadores de *NO e inhibidores de la NOS y de la iNOS, valorando replicación viral, número de LTCD4+ y desarrollo de apoptosis (Mossalayi 1999), (Hermann 1997), (Mannick 1999), (Jiménez 2001), (Blond 2000), (García 2001) los que presentan resultados contrapuestos, mostrando que el *NO cumple con un doble rol, una función protectora pero a la vez perjudicial, refiriéndose al *NO como un "amigo-enemigo" (Torre 2002), dependiendo para ello de múltiples variables y condiciones biológicas.

Los trabajos que específicamente valoran la producción de *NO en PBMC de pacientes VIH+, muestran claramente una posición de consenso en relación a la injuria del *NO sobre el sistema nervioso central (Adamson 1996). A nivel de las PBMC de pacientes VIH+, está claramente demostrada la producción de *NO a nivel de células de la estirpe monocitaria (Bukrinsky 1995) (Adamson 1996), por lo

que nuestros resultados agregarían una prueba mas de su producción a ese nivel pero por un método hasta ahora no utilizado en el VIH.

En cuanto a la producción de $\bullet\text{NO}$ a nivel de linfocitos T nuestros resultados aportan una fuerte evidencia de su producción a ese nivel. Son escasos los reportes de la literatura concernientes a la producción de $\bullet\text{NO}$ por linfocitos humanos, encontrando su producción en líneas celulares (Kröncke 1998), en linfocitos NK humanos (Cifone 2001), en linfocitos B humanos (Mannick 1995), (Tiscornia 2004) en tanto que en linfocitos T su producción ha sido sugerida en modelos murinos (evaluando producción mediante la reacción de Griess y la actividad de la NOS) (Taylor-Robinson 1994). En linfocitos T humanos se demostró la presencia de eNOS (su mRNA y la proteína correspondiente) en linfocitos normales de sangre periférica y de amígdala, pero no se evaluó la presencia de producción de $\bullet\text{NO}$ o el efecto de inhibidores de la NOS en estos ensayos (Reiling 1996). En la bibliografía disponible no encontramos evidencia de la producción de $\bullet\text{NO}$ a nivel de linfocitos humanos en la infección por VIH-1, por lo que nuestros resultados realizarían una contribución en lo metodológico y un aporte original en lo concerniente a la patogenia de la infección por el VIH-1.

En los datos disponibles en la bibliografía el hallazgo de producción de $\bullet\text{NO}$ en ausencia de nitración proteica *in vitro* en el VIH-1, constituiría también un resultado original.

Los nuevos métodos de detección en tiempo real de producción del $\bullet\text{NO}$ (Nagano 1999), utilizando el DAF-2 y el DAF-2DA, han sido aplicados en microscopia de fluorescencia sobre líneas celulares de rata (Lopez-Figueroa 2001), fibroblastos humanos (Takagi 2003), linfocitos B humanos (Tiscornia 2004), células del endotelio vascular bovinas y células del hipocampo de ratas (Kojima 1998). En cuanto a su utilización en citometría de flujo encontramos su aplicación en líneas celulares, células del endotelio vascular humano y bovino (Navarro-Antolin 2001), (Havenga 2001), tejido cardiaco humano (Strijdom 2004), no encontrando trabajos disponibles relacionados con su uso en PBMC normales ni de pacientes VIH+.

En el marco de la información actual disponible, creemos que nuestro trabajo realiza una contribución metodológica en cuanto a la caracterización de la producción de $\bullet\text{NO}$ en las sub-poblaciones de las PBMC, realizando aportes en el conocimiento de la patogenia de la infección por el VIH-1, donde los resultados más relevantes a destacar son:

- la expresión diferencial de la iNOS según la severidad de la inmunodeficiencia, pudiendo su expresión ser influida por las diferentes infecciones asociadas al VIH-1.

-la corroboración de la producción de $\bullet\text{NO}$ a nivel monocitaria por un método hasta ahora no utilizado en esta patología sumado a la descripción de la producción de $\bullet\text{NO}$ a nivel de los linfocitos T en pacientes VIH+.

-a pesar de la expresión de la iNOS y la producción de $\bullet\text{NO}$ detectadas en PBMC de pacientes VIH+ encontramos una significativa disminución en la presencia de nitrotirosina en las proteínas celulares que sugieren la disminución en la producción de peroxinitrito.

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

Luego de realizar el análisis comparativo entre las PBMC en individuos normales y pacientes VIH+, poniendo particular énfasis en las sub-poblaciones celulares productoras de NO , y tratando de encontrar una proyección clínica aplicada de los diferentes aspectos estudiados, remarcaremos como conclusiones los cinco puntos siguientes:

1) existe una disminución progresiva del mensajero inducible de la iNOS en la progresión de la infección llegando a una desaparición total en las etapas avanzadas de la enfermedad (SIDA).

2) contrariamente a la ausencia de este mensajero en condiciones basales en sujetos normales, existe una sobre-expresión basal del mismo en PBMC de algunos pacientes VIH+, lo cual hemos postulado que es la consecuencia de dos condiciones asociadas: a) un estado de hiperactivación crónica del sistema inmune y b) de la etapa evolutiva de la infección VIH en la que se encuentra el paciente (proponiendo como límite de corte el valor de $300 \text{ LTCD4}^+/\mu\text{l}$).

3) la producción de NO evaluada por diferentes métodos cuantitativos y semicuantitativos no nos permitió observar diferencias significativas entre las PBMC de individuos normales y de pacientes VIH+. Adicionalmente, existe una sobreproducción de NO en aquellos pacientes que cursan infecciones oportunistas. La disminución significativa del mensajero de la iNOS con una producción conservada de NO , plantea un hecho discordante. La explicación más plausible es la producción de NO por otras isoformas de la NOS (constitutivas) como la endotelial, las cuales han sido descritas en estas subpoblaciones celulares, y que puedan encontrarse sobre-expresadas y ser responsables de la producción de NO . La confirmación de esta hipótesis requiere de experiencias adicionales.

4) contrariamente a las PBMC normales en donde la producción de NO está predominantemente restringida a las sub-poblaciones monocito-macrófago, en los pacientes VIH+ las poblaciones linfocitarias producen NO , a niveles equivalentes a los encontrados en monocito-macrófago. Este hecho podría también explicar que el compartimiento linfocitario fuera el responsable del mantenimiento de la producción de NO en los pacientes VIH+.

5) la producción de NO en PBMC de pacientes VIH+ no se asoció a la presencia de nitrotirosina en los residuos de proteínas celulares contrariamente a lo observado en PBMC normales. Esto podría ser explicado por una disminución en la capacidad de los monocito-macrófagos y eventualmente linfocitos, en la producción de especies reactivas del oxígeno capaces de reaccionar con el NO .

para producir derivados con alta capacidad oxidante y nitrante, como por ejemplo el peroxinitrito. A favor de esta hipótesis están las múltiples referencias bibliográficas demostrando la anergia de la mayoría de los efectores celulares inmunitarios.

En base a estas conclusiones **nuestras perspectivas de trabajo** estarán sujetas a las siguientes hipótesis:

a) la expresión de la iNOS y la producción de $\cdot\text{NO}$ durante la infección por el VIH-1 podría estar condicionada por el nivel de citoquinas predominante en ese momento, el cual a su vez depende de al menos dos variables: el estado de la infección y la existencia de infecciones oportunistas.

b) la expresión de la iNOS podría constituir un marcador indirecto de la relación Th1/Th2 presente en las diferentes etapas de la infección, sabiendo que la existencia de complicaciones infecciosas intercurrentes influirán transitoriamente en la expresión de la iNOS y en los niveles de citoquinas.

c) es sabido que en el curso de la infección el grado de descenso de la población de LTCD4^+ está íntimamente asociada a la frecuencia e intensidad de episodios infecciosos. De acuerdo a nuestros resultados, planteamos que en las PBMC procedentes de pacientes VIH+ que cursan una infección oportunista, la producción de $\cdot\text{NO}$ en concentraciones supra-fisiológicas podría ser el principal desencadenante de la apoptosis y el consecuente descenso de los LTCD4^+ observado en el transcurso de dichas complicaciones.

La utilización del DAF-2DA mostró ser una excelente herramienta para ser utilizada en microscopia de fluorescencia y citometría de flujo, mediante la cual pudimos identificar la producción linfocitaria de $\cdot\text{NO}$ y analizar las sub-poblaciones linfocitarias responsables de su producción tanto en linfocitos normales como procedentes de pacientes VIH+, constituyendo una contribución metodológica de alto valor para evaluar sistemas celulares con baja producción de $\cdot\text{NO}$.

Pensamos que las hipótesis de trabajo planteadas quedan respondidas parcialmente, en el sentido que demostramos el descenso progresivo en la expresión de la iNOS, pero no pudimos cuantificar claramente la producción del *NO en los infectados por el VIH-1. Pensamos que la evaluación correcta de estos fenómenos debería realizarse en muestras de pacientes VIH+ sin tratamiento antirretroviral y sin cursar una complicación infecciosa reciente, situación poco frecuente de encontrar en la práctica clínica como para acceder a un número de muestras significativo, pero que incluiremos en nuestros próximos trabajos para arribar a una respuesta definitiva.

Como paso inmediato pretendemos establecer la correlación entre las fluctuaciones en los niveles de *NO en condiciones basales y post-activación, en la inducción de la apoptosis francamente aumentada en las personas infectadas por el VIH-1. Pensamos que la utilización de herramientas como el DAF-2DA en citometría de flujo y la utilización de dadores de *NO e inhibidores de la NOS, contribuirían en la identificación de nuevos mecanismos patogénicos que eventualmente podrían transformarse en elementos de valor pronóstico-evolutivo y blanco terapéutico.

Referencias bibliográficas.

- Abbas, A., y col. 2004. *Inmunología molecular y celular*. 5ª edición, Elsevier 2004.
- Adamson, D., y col. 1996. Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS demencia and induction by HIV-1 gp41. *Science* 274:1917.
- Akaike, T., y col. 2000. Nitric oxide and virus infection. *Immunology* 2000, 101:3000
- Albina, D., y col. 1993. Nitric oxide mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 150:5080.
- Altfield, M., y col. 2000. Th1 to Th2 shift of cytokines blood of HIV-infected patients is detectable by reverse transcriptase polymerase chain reaction but not by enzyme-linked immunosorbent assay under nonstimulated conditions. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23:287.-
- Badley, A., y col. 2000. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. *Blood* 2000. 96:2951.
- Bahbouhi, B., y col. 2004. Dynamics of cytokine expresión in HIV productively infected primary CD4+ T cells. *Blood* 2004; 103:4581.
- Blond, D., y col. 2000. Nitric oxide synthesis enhanced HIV-1 replication in primary human macrophages. *Journal of Virology* 74:8904.
- Bogdan, C. 1998. The multiplex function of nitric oxide in (auto) immunity. *J Exp Med* 187:1361
- Bogdan, C., y col. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* 12:64.
- Boven, L., y col. 1999. Increased peroxynitrite activity in AIDS dementia complex: implications for the neuropathogenesis of HIV-1 infection. *J. Immunol.* 162:4319.
- Brito, C., y col. 1999. Peroxynitrite inhibits T-lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death. *J. Immunol.* 162:3356.
- Bukrinsky, M., y col. 1995. Regulation of nitric oxide synthase activity in human immunodeficiency virus type1 (HIV-1) infected monocytes: implications for HIV-associated neurological disease. *J. Exp. Med.* 181:735.
- Cayota, A., y col. 1990. Preferential replication of HIV-1 in memory CD4 T-cells from asymptomatic HIV-seropositive patients. *Lancet*, 336:941.
- Cayota, A., y col. 1996. In vitro anti-oxidant treatment recovers proliferative responses of anergic CD4+ lymphocytes from HIV-infected individuals. *Blood* 87:4746.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. *Anal. Biochem.* 162:156.
- Chun, T., y col. 1999. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected, resting CD4+ T cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 5:651
- Cicala, C., y col. 2000. HIV-1 envelope induces activation of caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells. *PNAS* 97:1178
- Cifone, G. 2001. Natural killer and nitric oxide. *Intern Immunopharm* 2001; 1513.
- Clerici M., y col. 1993. A Th1/Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection *Immunol Today* 1993. 14:107.
- Colasanti, M., y col. 1999. S-nitrosylation of viral proteins: molecular bases for antiviral effect of nitric oxide. *IUBMB Life*, 48:25.
- Davey, R., y col. 2000. Immunologic and Virologic Effects of Subcutaneous Interleukin 2 in Combination With Antiretroviral Therapy A Randomized Controlled Trial. *JAMA* 284:183.
- Dimmeler, S., y col. 1997. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edge role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997; 1:275.
- Doherty, T., y col. 1995. T-cell regulation of macrophage function. *Curr Opin Immunol* 7:400.
- Fauci, A., y col. 1996. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med.* 124:654.
- Fauci A. 2002. Enfermedad por el VIH: SIDA y procesos relacionados. Cap 309, Principios de Medicina Interna 15ª edición, Harrison, 2002.

- Fauci, A. 2003. HIV and AIDS: 20 years of science. *Nature Medicine* 2003, 9: 839.
- Ganster, R., y col. 2000. Molecular regulation of iNOS. In *Nitric Oxide, biology and pathobiology*, Luoís Ignarro, Academic Press. Cap 8, 129.
- García, M., y col. 2001. Characteristics of nitric oxide induced apoptosis and its target cells in mitogen-stimulated PBMC from HIV+ subjects. *Immunol Invest* 2001, Nov; 30:267.
- Graziosi, C., y col. 1994. Lack of evidence for the dichotomy of Th1 and Th2 predominance in HIV-infected individuals. *Science* 265:5169
- Groeneveld, P., y col. 1996. Increased production of nitric oxide correlates with viral load and activation of mononuclear phagocytes 1996 in HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis* 1996. 28:341.
- Havenga, M., y col. 2001. Simultaneous detection of NOS3 protein expresión and nitric oxide productions using a flow cytometer. *Analytical Biochemistry* 2001. 290:283.
- Hermann, E., y col. 1997. Role of nitric oxide in the regulation of lymphocyte apoptosis and HIV-1 replication. *Int. J. Immunopharmac.* 19:387.
- Hersberger, S., y col. 2004. CCTTT-repeat polymorphism of the inducible nitric oxide synthase is not associated with HIV pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 2004, 137:566.
- Huie, R., y col. 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18:195.
- Ignarro, L. 1995. *Nitric Oxide. Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications.* *Advances in Pharmacology* 34:71.
- Jiménez, J., y col. 2001. Regulation of HIV-1 in human T lymphocytes by nitric oxide. *Journal of Virology* 75:4655.
- Kahn, D., y col. 2001. Adjuvant immunotherapy is dependent on inducible nitric oxide synthase. *J.Exp.Med.* Jun 2001; 193:1261.
- Klein, S., y col. 1997. Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry. *AIDS* 11:1111.
- Kojima, H., y col. 1998. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70:2446.
- Kolb-Bachofen, V., y col. 2000. Role of nitric oxide synthase in autoimmune or other immune - mediated diseases. In *Nitric Oxide, biology and pathobiology*, Luoís Ignarro, Academic Press. Cap 50, 811.
- Kröncke, K. 1998. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol* 113:147.
- Ledru, E., y col. 1998. Differential susceptibility to activation-induced apoptosis among peripheral Th1 subsets: correlation with Bcl-2 expression and consequences for AIDS pathogenesis. *J Immunol* 160:3194
- Li, J., y col. 1999. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 274:17325.
- Liegler, T., y col. 1998. Diminished spontaneous apoptosis in lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected long-term nonprogressors. *J. Infect. Dis.* 178:669
- Liew, F. 1995. Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide. *Curr. Opin. Immunol* 7:396.
- López-Figueroa, M., y col. 2001. Characterization of basal nitric oxide production in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001. 1540:253.
- Mannik, J., y col. 1995. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79:1137.
- Mannik, J., y col. 1999. Nitric oxide modulates HIV-1 replication. *J. Acquir Immune Defic Syndr* 22:1.
- Mellors, J., y col. 1996. Prognosis in HIV-1 Infection Predicted by the Quantity of Virus in Plasma. *Science* 272:1167.
- Meyaard, L., y col. 1992. Programmed Death of T Cells in HIV-1 Infection. *Science* 257:217.
- Moncada, S., y col. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Inves* 21:361.
- Mossalayi, M., y col. 1999. Critical role of nitric oxide during the apoptosis of peripheral blood leukocytes from patients with AIDS. *Mol. Med.* 5:812.

- Nagano, T. 1999. Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 14:283.
- Navarro-Antolin, J., y col. 2001. Nitrosative stress by ciclosporin A in the endothelium: studies with the NO-sensitive probe DAF-2DA using flow cytometry. *Nephrol Dial Transplant* 2001. 16(suppl1):6.
- Nicholson, S., y col. 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J.Exp.Med.*, May 1996; 183:2293.
- Nicotera, P. 1997. Nitric oxide: inducer or supresso of apoptosis? *Trends. Pharmacol. Sci.* 18:189.
- Ohnimus, H., y col. 1997. Apoptotic cell death upon contact of CD4+ T lymphocytes with HIV glycoprotein-expressing cells is mediated by caspases but bypasses CD95 (Fas/Apo-1) and TNF receptor 1. *J. Immunol* 159:5246.
- Pace, G. 1995. The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radic. Biol. Med.* 19:523.
- Persichini, T., y col. 1998. Cysteine nitrosylation inactivates the HIV-1 protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250:575.
- Persichini, T., y col. 1999. Nitric oxide inhibits the HIV-1 reverse transcriptase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258:624.
- Pfeiffer, S., y col. 2001. protein tyrosine nitration in cytoquine-activated murine macrophages. *J. Biol. Chem* 276, 36:34051.
- Pietraforte, D., y col. 1994. gp120 HIV envelope glycoprotein increases the production of nitric oxide in human monocyte-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 55:175.
- Programa Nacional VIH-SIDA. Junio de 2004. Situación epidemiología del VIH-SIDA en el Uruguay. Ministerio de Salud Pública, Uruguay. Programa
- Radi, R. 2004. Nitric oxide, oxidants and protein tyrosine nitration. *PNAS*, 101, 12:4003.
- Reiling, N., y col. 1996. Nitric oxide synthase: expression of the endothelial Ca/calmodulin dependent isoform in human B and T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26:511.
- Romagnani, S. 1996. The Th1 / Th2 paradigm in disease. *Molecular Biology Intelligence Unit. Springer.* 1996
- Sherry, B., y col. 2000. Nitric oxide regulates MIP-1alfa expression in primary macrophages ant T lymphocytes: implication for anti-HIV response. *Mol Med*, 6:542.
- Schmidt, H., y col. 1996. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. 1996. *Methods in nitric oxide reserch.* 33:491.
- Stevenson, M. 2003. HIV pathogenesis. *Nature Medicine* 2003. 9:853.
- Strijdom, H., y col. 2004. Direct intracelluar nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: Flow citometric analysis using the fluorescent probe, diamino fluorescein. *J Mol Cell Cardiol* 2004 oct; 37:897.
- Suzuki, Y., y col. 1999. Determinant in human immunodeficiency virus type 1 for efficient replication under cytoquine-induced CD4+ T-helper (Th1) and Th2 type conditions. *J. Virol.* 73:316.
- Taylor-Robinson, A., y col. 1994. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur. J. Immunol* 24:980.
- Taylor-Robinson, A., y col. 1997. Counter-regulation of T helper 1 cell proliferation by nitric oxide and interleukin-2. *Biochem Biophys Res Commun* 233:14
- Takagi, K., y col. 2003. Serum nitric oxide levels in systemic sclerosis patients: correlation between NO levels and clincal features. *Clin Exp Immunol* 134(3):538.
- Tiscornia, A., y col. 2004. Post-transcriptional regulation of iNOS in chronic lymphocytic leukemia B cells in pro- and anti-apoptotic culture conditions. *Leukemia* 2004, 18:48.
- Torre, D. 2002. Nitric oxide in HIV infection: friend o foe. *Lancet Infectious Diseases* 2002 Vol2, 5:273
- Vodovotz, Y. 1997. Control of nitric oxide by production of TGFbeta: mechanistics insights and potential relevance to human disease. 1997. *Nitric Oxide* 1:3.