

Localización y distribución celular de p22-phox y p47-phox en neutrófilos humanos de pacientes infectados con VIH

Siham Salmen,* Daniela Montilla,* Maryuri London,* Dánely Velázquez,* Lisbeth Berrueta*

* Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela.

Analysis of p22-phox and p47-phox subcellular localization and distribution in neutrophils from human immunodeficiency virus (HIV) infected patients

ABSTRACT

Introduction. During human immunodeficiency virus (HIV) infection a dysfunction of polymorphonuclear (PMN) cells has been described including a progressively altered superoxide production as disease progression. The NADPH oxidase has been described as a major source of superoxide. The neutrophil NADPH oxidase comprises a plasma membrane-bound cytochrome b558 (which is a heterodimer of one p22-phox and one gp91-phox subunit) and cytosolic subunits, namely p47-phox, p67-phox and p40-phox. During neutrophil activation in response to various agonists, the cytosolic subunits translocate to and associate with the cytochrome b558, a process that results in oxidase activation. Therefore, an altered superoxide production could be a consequence of abnormal distribution or translocation of NADPH oxidase components in response to HIV infection. **Material and methods.** We used several strategies including: confocal microscopy, subcellular fractionation and sucrose gradients, to analyze the cellular distribution of two of the NADPH oxidase components (p22-phox and p47-phox). **Results.** We observed that in resting cells, a substantial proportion of p22-phox from HIV positive patients is distributed in regions close to the cytoplasmic membrane, sediment in high density sucrose fractions and is located in the cytoplasmic insoluble fraction. Additionally, a diffuse cytosolic distribution of p47-phox was observed in neutrophils from HIV infected patients. The results demonstrate an inappropriate cell distribution of NADPH-complex in PMN from HIV positive patients.

Key words. HIV. ROS. Neutrophils. NADPH-oxidase. p22-phox. p47-phox.

RESUMEN

Introducción. Durante la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se ha descrito una disfunción en la capacidad de los polimorfonucleares (PMN) para producir superóxido conforme progresa la enfermedad. El complejo NADPH-oxidasa, fuente principal de superóxido, está constituido por varias proteínas: citocromo b558 (conformado por gp91-phox y p22-phox) y el componente citosólico (p47-phox, p67-phox y p40-phox). La activación de este complejo enzimático es regulada, en parte, por la localización y redistribución de sus componentes en compartimientos subcelulares y su ensamblaje es inducido durante la activación por agonistas. Alteraciones en la regulación de la producción de superóxido durante la infección pudieran ser consecuencia de defectos en la localización y distribución del complejo NADPH-oxidasa. **Material y métodos.** Se emplearon técnicas de fraccionamiento subcelular, inmunofluorescencia y gradientes de densidad en sacarosa para analizar la localización y migración de dos de los principales componentes del complejo (p47-phox y p22-phox) en PMN de pacientes infectados con VIH. **Resultados.** A diferencia de los controles, previo a la estimulación, la proteína p22-phox se distribuye hacia la periferia cercana a la membrana plasmática de los neutrófilos de los pacientes infectados y una proporción de ella sedimenta en las fracciones de alta densidad en gradientes de sacarosa y en la fracción citoplasmática insoluble. Mientras que p47-phox mantiene una distribución difusa en el citoplasma, independientemente del estímulo. Estos resultados demuestran alteraciones en la redistribución de componentes del complejo NADPH-oxidasa en PMN de pacientes infectados por VIH.

Palabras clave. VIH. Neutrófilos. Especies reactivas del oxígeno (ROS). NADPH-oxidasa. p22-phox. p47-phox.

INTRODUCCIÓN

Los neutrófilos tienen un papel crítico en la defensa contra microorganismos invasores. En respuesta a una variedad de estímulos, los fagocitos migran desde la circulación sanguínea hasta el tejido dañado; como consecuencia de su activación inducen la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). Este proceso involucra la activación del complejo NADPH oxidasa encargado de generarlos.¹

Se han reportado alteraciones en la producción de superóxido en neutrófilos de pacientes VIH+, evidenciado por una producción basal incrementada,^{2,3} pero con incapacidad para responder apropiadamente a estímulos,⁴⁻⁶ esto último evidenciado durante la fase de SIDA.⁴ La producción basal excesiva de ROS que no es compensada de manera adecuada por las moléculas antioxidantes puede contribuir con el estrés oxidativo, el cual también puede participar de manera importante en la patogénesis de la infección por VIH⁷⁻⁹ e incrementar la susceptibilidad a sufrir muerte celular.¹⁰

Varios componentes del virus han sido asociados como moduladores de la liberación de radicales libres e incrementar la susceptibilidad celular a estos componentes, tal es el caso de Nef-VIH-1 y Tat, ambos asociados con incremento en la producción de superóxido y con disminución de la tolerancia celular a los radicales libres.^{11,12} Varios mecanismos se han propuesto para explicar la activación de la producción de radicales libres, por ejemplo: activación de las rutas de las MAPK,¹³ la remodelación del citoesqueleto de actina,¹⁴ o por la fosforilación de p47phox componente citosólico del complejo NADPH-oxidasa.¹⁵

El complejo NADPH oxidasa está formado por un componente de membrana denominado citocromo *b₅₅₈*, un heterodímero constituido por gp91-phox y p22-phox y que en reposo se localiza entre 75 y 90% en la membrana de los gránulos específicos de los neutrófilos, entre 5 y 15% en las vesículas secretoras y solo 10% en la membrana plasmática.^{1,16,17} Durante la activación celular el citocromo *b₅₅₈* es reclutado hacia la membrana plasmática, ubicándose en parches en los microdominios de membrana o *Rafts* lipídicos.^{18,19} El otro componente, el citosólico, está constituido por p47-phox, p67-phox, p40-phox y Rac2.¹ La localización subcelular de estos componentes, en particular p47-phox en leucocitos polimorfonucleares en reposo, es básicamente citoplasmática, distribuida de manera difusa en contacto con el resto de las proteínas citoplasmáticas,

p40-phox y p67-phox. Tras la estimulación estas proteínas migran hacia la membrana, aumentando su reclutamiento en las fracciones insolubles a detergentes.^{19,20}

OBJETIVO

Evaluar si la alteración en la producción de ROS observada en los neutrófilos de pacientes infectados por VIH podría estar asociada a cambios en la localización y distribución de las proteínas del complejo NADPH oxidasa (p22-phox y p47-phox), en los distintos compartimentos celulares, analizando mediante microscopia de fluorescencia gradientes continuos de densidad en sacarosa y fraccionamiento subcelular para comprender los mecanismos que conducen al defecto en la producción de ROS durante la infección por VIH.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos y anticuerpos

Los anticuerpos policlonales cabra anti-p47-phox humano (C-20), conejo anti-p22-phox humano (FL-195), anti-IgG de cabra conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) y anti-IgG de conejo conjugado a HRP fueron adquiridos de *Santa Cruz Biotechnology* CA, USA.

Los anticuerpos anti-IgG de cabra conjugado a rodamina y anti-IgG de conejo conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína) se obtuvieron de *Jackson ImmunoResearch Laboratories*, West Grove, PA, USA. El Phorbol-12-myristato-13-acetato (PMA), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), Poli-L-lisina, sacarosa, se obtuvieron de *SIGMA Chemical Company*, ST Louis, MO. USA. Bis-acrylamide, acrylamide, 2-mercaptoetanol, Tritón X-100 y el persulfato de amonio (APS), se adquirieron en *BIO-RAD* CA, USA. El RPMI-1640 con L-Glutamina (0.3 g/L) más HEPES se adquirió de *GIBCO, BRL®*, Gaithersburg MD, USA. El Ficoll-Hypaque™ (Lymphoprep) se adquirió de *NYCOMED Pharma*, AS, Oslo, Norway. El luminol fue adquirido de *Pierce, Rockford, IL, USA*.

Obtención y purificación de polimorfonucleares

Para la realización de este estudio, luego de haber obtenido el consentimiento por escrito de cada uno de los voluntarios y cumpliendo con las normas de Bioética para trabajos científicos en humanos, se ex-

trajo de cada uno de los individuos una muestra de sangre total a fin de cuantificar las poblaciones en sangre periférica, así como la evaluación de la producción de ROS y la determinación de la distribución de proteínas del complejo NADPH-oxidasas en estudio.

Para obtener la población de PMN, se añadió a la jeringa Dextrán a 6% y citrato de sodio (3.8%) como anticoagulante. Después de 30 min de incubación, el plasma depletado de glóbulos rojos fue recuperado y colocado sobre Ficoll-Hypaque densidad 1077, en una proporción 2:1. Seguidamente, se centrifugaron 400 g durante 30 min a 18 °C y los PMN se recuperaron del botón ubicado en el fondo del tubo junto a los glóbulos rojos remanentes; estos últimos fueron eliminados mediante lisis osmótica. Las células fueron lavadas mediante centrifugación a 600 g por 5 min a 4 °C y resuspensión en medio RPMI, por tres veces. La pureza celular se evaluó mediante la coloración con anaranjado de acridina²¹ (1 mg/mL) diluida en PBS 1:25, la viabilidad se determinó mediante la coloración supravital con azul de Trypan y la cuantificación de las células obtenidas durante el ensayo se realizó utilizando un hematocitómetro.

Determinación de la producción de ROS mediante citometría de flujo

Para medir los cambios en la producción de ROS intracelular en los PMNs se empleó un ensayo fluorescente utilizando Dihidrorodamina 123 (DHR-123). Los PMNs purificados se ajustaron a razón de 5×10^5 cel/0.5 mL de medio RPMI-suero bovino fetal a 10% (SBF) y se pretrataron con 1 μ M/mL de DHR-123 durante 10 min a 37 °C en oscuridad, luego fueron incubados con PMA (250 ng/mL) o DMSO durante 10 min. Al finalizar el tiempo de incubación las células fueron lavadas tres veces con PBS-EDTA frío y resuspendidas en el mismo buffer. El análisis se realizó mediante citometría de flujo (*Becton Dickinson FACScan*, San José, CA, USA). Las células ubicadas entre lecturas correspondientes de 10^1 a 10^4 en la escala logarítmica fueron consideradas como positivas y permitió determinar el porcentaje de producción de ROS.

Inmunofluorescencia indirecta

La suspensión de PMN (5×10^6 cel/mL), estimuladas o no con PMA (250 ng/mL) a 37 °C por 5 min, fue colocada sobre laminillas cubiertas con Poli-L-Lisina (1 mg/mL). Posteriormente, las células fue-

ron fijadas utilizando paraformaldehído a 3% (PAF) durante 10 min a temperatura ambiente, lavadas tres veces con PBS y luego permeabilizadas con Tritón X-100 a 0.1% durante 2 min; finalmente, las células fueron lavadas tres veces con una solución de PBS-gelatina a 0.2%.²²

Posterior a la permeabilización las células se incubaron durante 25 min a temperatura ambiente en cámara húmeda y por separado con anticuerpos dirigidos contra dos de las proteínas del complejo NADPH-oxidasas: p22-phox perteneciente al componente de membrana y p47-phox que pertenece al componente citosólico, diluidos en PBS-gelatina a una dilución de 1:20 y 1:40, respectivamente.

Luego de tres lavados con PBS-gelatina se procedió a incubar cada una de las laminillas durante 25 min con los respectivos anticuerpos secundarios:

- Anti-IgG de conejo conjugado a FITC (1:50) dirigido al anticuerpo para p22-phox.
- Anti-IgG de cabra conjugado a rodamina (1:200) dirigido contra anti-p47-phox.

Después de dos lavados con PBS-gelatina, uno con PBS y pasadas por agua destilada, las laminillas se colocaron en líquido de montar (DAVCO) sobre láminas portaobjeto. En el caso particular de las laminillas marcadas sólo con p22-phox, al líquido de montaje se le añadió yoduro de propidio (IP) diluido 1:150 con la finalidad de marcar el núcleo y observar con claridad la ubicación de la proteína en los compartimentos subcelulares. Las observaciones de las preparaciones se llevaron a cabo empleando un microscopio confocal *OLYMPUS Fluo View™ 300*.

Determinación del coeficiente de sedimentación mediante gradiente continuo de densidad de sacarosa

Las células se ajustaron a 20×10^6 cel/mL de RPMI con suero bovino fetal a 10%, se estimularon con 250 ng/mL de PMA durante 5 min a 37 °C y se centrifugaron 800 g por 5 min y el botón celular se resuspendió en 500 μ L de buffer de lisis a 1% (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1 mM PMSF, 1 mM de ortovanadato, 1 μ g/mL leupeptin/aprotinin, 1 μ g/mL pepstatin, 20 mM NaF y 2.5 mM PyNa) durante 15 min en frío.

Posteriormente, el lisado fue centrifugado durante 10 min a 15,000 g, el sobrenadante fue colocado sobre un gradiente de densidad continuo a una concentración de 10 a 35% de sacarosa en un volumen

de 11 mL de buffer de lisis (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato). El gradiente se centrifugó usando una ultracentrífuga con rotor basculante TH-641 (SORVALL RC 90) por un lapso de 18 h a 37,000 g a 4 °C; subsecuentemente, las fracciones fueron colectadas utilizando una bomba peristáltica a razón de 1 mL/min (12 fracciones).²³

Estos experimentos fueron controlados mediante la cuantificación de la concentración de sacarosa, en cada una de las fracciones, utilizando un refractómetro comprobando la continuidad del gradiente y mediante la corrida simultanea de estándares de coeficiente de sedimentación conocidos, tales como:

- Citocromo c (1.9 S).
- BSA (4.3 S).
- Deshidrogenasa láctica (7.4 S).
- Catalasa (11.6 S).

Las proteínas presentes en las fracciones recolectadas fueron precipitadas mediante el tratamiento con 70 µL de ácido tricloroacético a 100% (ATC) en hielo durante 15 min, centrifugadas a 15,000 g por 5 min, luego lavadas con acetona fría y el botón celular resultante fue resuspendido en buffer de muestra (SDS 20%, Tris-EDTA 0.2 M/0.02 M, glicerol 37% y azul de bromofenol 10%), separado mediante electroforesis en geles SDS-PAGE a 10%, siguiendo el procedimiento descrito por Laemmli en 1970.²⁴

Al finalizar la corrida, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Polyvinylidene fluoride). Las membranas se incubaron por un periodo de 2 h a temperatura ambiente en agitación constante con los anticuerpos policlonales primarios (anti-p47-phox y anti-p22-phox) diluidos 1:500 en solución bloqueante, lavadas cinco veces con TBS 1X (50 mM Tris pH8, 300 mM NaCl, 0.1% Tween 20) e incubadas durante 1 h con los anticuerpos secundarios:

anti-IgG de cabra (1:5,000) y anti-IgG de conejo (1:20,000), ambos conjugados con HRP.

Finalmente, las membranas fueron reveladas mediante la impregnación con luminol y detección por autorradiografía. Las bandas fueron analizadas y su intensidad cuantificada mediante un documentador de geles (Gel Doc 2000, Bio-Rad) utilizando el programa Quantity One 4.2.0.

Fraccionamiento subcelular

Este ensayo se realizó con la finalidad de establecer cambios en la ubicación de las proteínas que conforman el complejo NADPH oxidasa en los PMNs de pacientes y controles, en el compartimento celular citosólico insoluble.

Fue necesario ajustar las células a razón de 10 x 10⁶ cel/2 mL de RPMI, en presencia o no de PMA, utilizando una concentración de 250 ng/mL durante 5 min a 37 °C en agitación constante, centrifugadas a 900 g durante 5 min a 4 °C; el botón celular o pellet resuspendido en 400 µL buffer A (Hepes: 10 mM; MgCl₂: 1.5 mM; KCl: 10 mM; PMSF: 0.2 mM; aprotinin/leupeptin: 1 mg/mL; DTT: 50 mM; Ortovanadato: 1 mM), mezclando suavemente e incubando en hielo durante 15 min (fracción 1), para promover la ruptura celular mediante lisis hipotónica (en ausencia de detergente). Seguidamente, se aplicó vortex por 10 seg a las suspensiones y se centrifugaron durante 10 min a 15,000 g. De esta centrifugación se obtuvieron las fracciones celulares: citosólica (fracción 2) y nuclear (fracción 3) (Figura 1).

Por un lado, el sobrenadante correspondiente a la fracción citosólica fue transferido a otro tubo y se les agregó el buffer B (Hepes: 300 mM; MgCl₂: 38 mM; KCl: 1.4 M; PMSF: 0.2 mM; aprotinin/leupeptin: 1 mg/mL; DTT: 50 mM; ortovanadato: 1 mM) y se centrifugó durante 2 h a 15,000 g a 4 °C. El pellet correspondiente a la fracción nuclear se incubó con

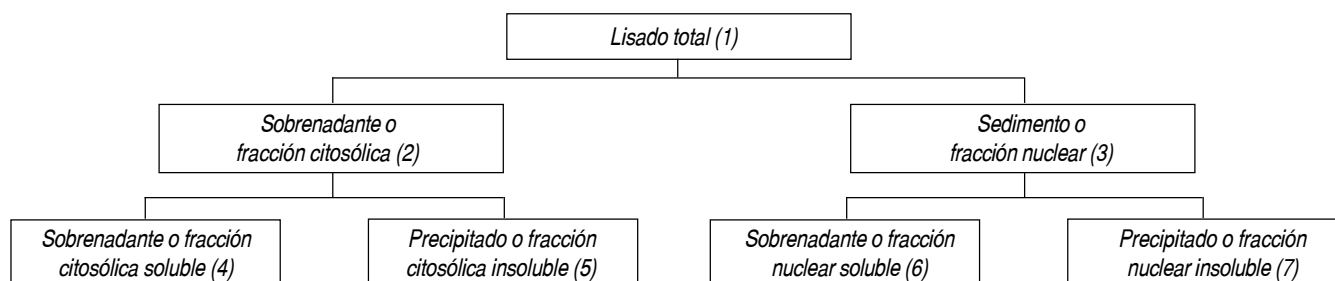


Figura 1. Procedimiento utilizado de fragmentación subcelular. Determinación de p22-phox y p47-phox en la fracción citosólica insoluble de neutrófilos en reposo y posterior a la estimulación.

el buffer C (Hepes: 20 mM; $MgCl_2$: 1.5 mM; NaCl: 420 mM; EDTA: 0,2 mM; DTT: 50nM, PMSF: 0.2 mM, aprotinin/leupeptin 1 mg/mL, ortovanadato 1 mM), por un periodo de 20 min en hielo y luego centrifugó por 10 min a 15,000 g.²⁵ El resultante de cada una de estas centrifugaciones (fracción citoplasmática y nuclear) fue a su vez separado en fracciones solubles (sobrenadante) (fracciones 4 y 6) e insolubles (pellet) (fracciones 5 y 7), respectivamente.

Finalmente, estas últimas fueron sometidas a electroforesis e inmunoblott. Las proteínas transferidas a membranas PVDF fueron tratadas con los anticuerpos anti-p47-phox y anti-p22-phox y sus respectivos anticuerpos secundarios previamente descritos. Las membranas fueron reveladas mediante autorradiografía.

Análisis estadístico

Los parámetros evaluados se expresaron usando la media \pm desviación estándar (DS). Las diferencias entre los promedios de los grupos estudiados se analizaron usando la prueba t-student calculada con el programa Statgraphic Centurion XV.II. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los PMN de los pacientes muestran una producción basal de ROS incrementada

En este estudio se utilizó la determinación cuantitativa de la generación de ROS en polimorfonucleares de pacientes como parámetro de selección de los individuos seropositivos con niveles basales ele-

vados de producción de ROS, para los estudios bioquímicos y de inmunofluorescencia. Para ello, se reclutaron un total de diez controles seronegativos y 14 sujetos seropositivos con una cuenta de linfocitos T CD4+ > 200 cel/mm³ (CD3+CD4+: 575 ± 219 cel/mm³).

Todos los pacientes eran asintomáticos, con diagnóstico de seropositividad para el VIH ≥ 5 años y sin historia de infecciones oportunistas. Todos los individuos admitidos en el estudio (pacientes y controles) mostraron serología negativa para otros agentes virales, tales como hepatitis B, hepatitis C, citomegalovirus y virus Ebstein Barr. Los valores de leucocitos neutrófilos estaban dentro de los parámetros normales en los dos grupos seropositivos estudiados ($3,290$ cel/mm³ $\pm 1,723$ en pacientes vs. $3,795$ cel/mm³ $\pm 1,349$ en controles).

La figura 2A muestra la producción de ROS en PMNs de pacientes comparados con los controles. Puede observarse un incremento en la producción basal de ROS en los individuos seropositivos ($10.7\% \pm 7.5$ CI), cuando se compara con los controles ($4.13\% \pm 1$ CI), lo cual sugiere que estas células se encuentran en un estado de activación previo al estímulo, mientras que la respuesta postestímulo (PMA 250 ng/mL) aún estaba conservada en el grupo de pacientes estudiados (Figura 2B).

Para estudiar la distribución de proteínas del complejo NADPH oxidasa en el contexto de la infección por VIH, se seleccionaron cuatro pacientes con niveles basales de ROS $> 10\%$, en paralelo con cuatro controles. Se analizaron bajo tres distintas perspectivas:

- Localización subcelular de proteínas del complejo NADPH oxidasa en polimorfonucleares de pacientes mediante microscopia de inmunofluorescencia.

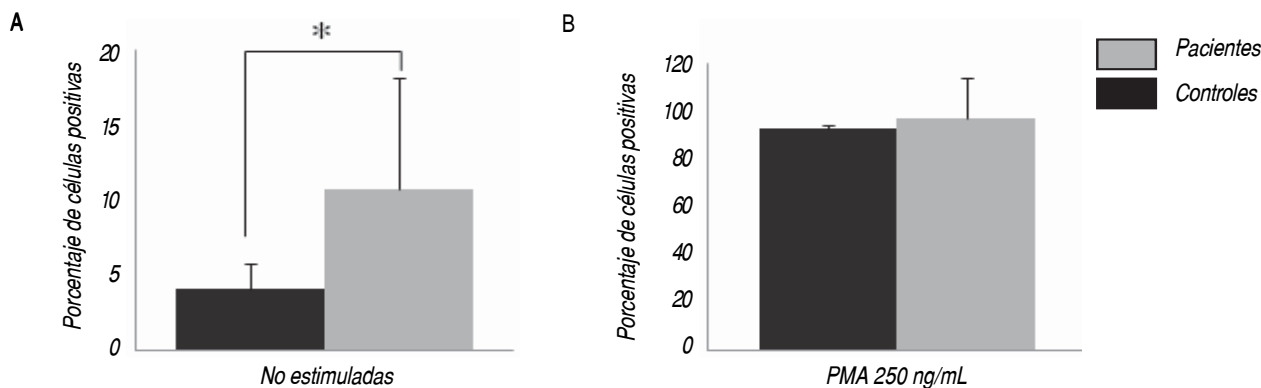


Figura 2. Producción de ROS en condiciones basales (A) y postestímulo (B) de pacientes comparados con controles. * $p < 0.05$.

- Análisis del coeficiente de sedimentación de las subunidades p22-phox y p47-phox dentro del complejo NADPH oxidasa mediante gradientes continuos de densidad en sacarosa.
- Fraccionamiento subcelular e inmunodetección para determinar la localización y comportamiento de las proteínas del complejo en polimorfonucleares de pacientes y controles.

Los PMNs de individuos infectados con VIH muestran cambios en la distribución celular de p22-phox y p47-phox

La distribución celular de las proteínas p22-phox y p47-phox del complejo NADPH oxidasa se analizó mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopía. La figura 3A muestra el patrón de distribución de la proteína p22-phox en polimorfonucleares no estimulados del grupo control. Como puede observarse en este grupo, en concordancia con reportes previos,²⁶ p22-phox se encuentra distribuida en forma uniforme en el citoplasma, asociada a gránulos citoplasmáticos; posterior a la estimulación, la proteína se redistribuye en conglomerados citoplasmáticos y en las adyacencias de la membrana celular en forma de parches^{16,19,27} (Figura 3B).

En contraste, la distribución de la proteína p22-phox en los PMN de pacientes no estimulados está mayormente restringida hacia la periferia de las células, formando grandes conglomerados (Figura 3C), observación que es menos evidente en células estimuladas con una distribución centripeta (Figura 3D). Adicionalmente, otro hallazgo importante son las secciones de fragmentación a nivel nuclear en los PMN estimulados de los pacientes asociados con probable muerte celular.

La distribución de la proteína p47-phox en los polimorfonucleares de controles es mayormente citoplasmática de manera difusa²⁸ (Figura 3E); posterior al estímulo, la proteína se distribuye hacia la periferia de la célula (membrana plasmática y una proporción en gránulos intracelulares) (Figura 3F). Cuando se analizó el patrón de distribución de esta proteína en las células de pacientes se observó que su localización es un poco más compleja y que, previo al estímulo, gran parte de la proteína está distribuida en forma difusa en el citoplasma y centripeta (Figura 3G).

Una vez estimuladas las células de los pacientes, p47-phox mantiene su distribución preponderante en el citoplasma con poca migración hacia la periferia y escasos parches periféricos, además se acentúa la localización centripeta de la proteína (Figura 3H).

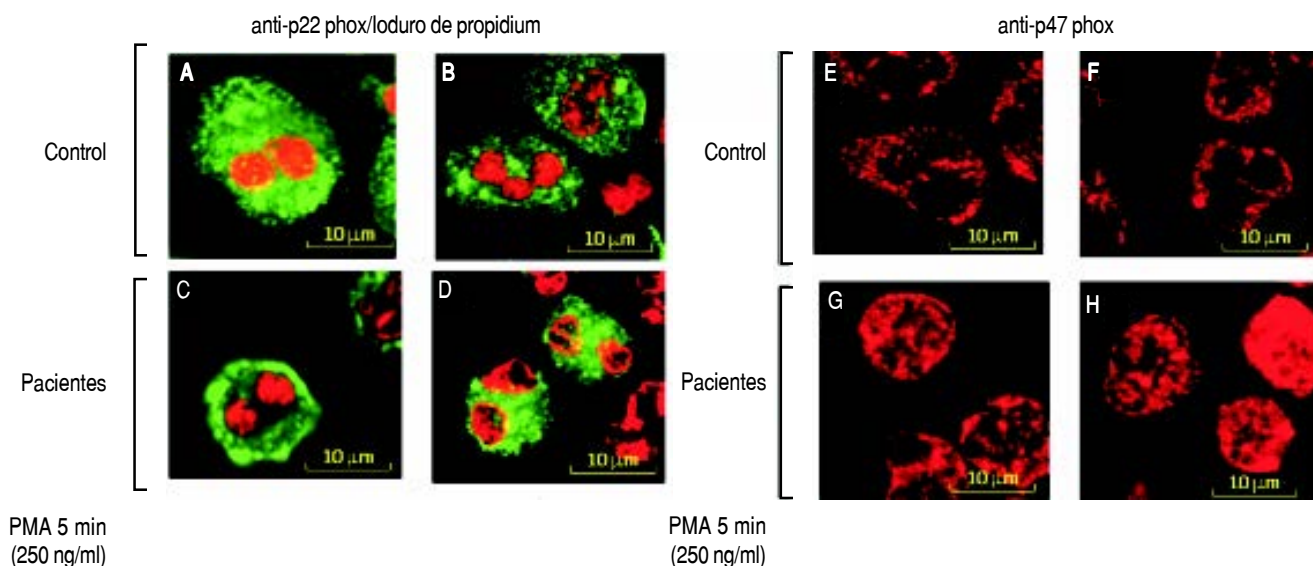


Figura 3. Localización de p22-phox/p47-phox en neutrófilos de pacientes y controles. A-D. Células marcadas con anti-p22-phox a una dilución de 1:20 y luego con anti-IgG de conejo conjugado a FITC (1:50). Los núcleos fueron teñidos con IP (1:150). A-B Células provenientes de controles, previo al estímulo y postestimulación (PMA 250 ng/mL), respectivamente (adquiridas y documentadas con 20X de magnificación). C-D Pacientes sin y con estímulo, respectivamente. Los resultados mostrados son representativos de, por lo menos, cuatro experimentos realizados. E-H. Localización de p47-phox en neutrófilos de pacientes y controles por microscopía de fluorescencia (adquiridas y documentadas con 20X de magnificación). Las células fueron marcadas con anti-p47-phox a una dilución de 1:40 y luego con anti-IgG de cabra conjugado a rodamina (1:200). E y F Células provenientes de controles, previo al estímulo y postestimulación (PMA 250 ng/mL), respectivamente. G y H Pacientes sin y con estímulo, respectivamente. Los resultados mostrados son representativos de cuatro experimentos pareados (cuatro controles vs. 4 pacientes) e independientes.

El fenómeno descrito para ambas proteínas (p22-phox y p47-phox) fue cuantificado y se evidenció que la frecuencia de este patrón celular fue de 40% (± 7 DS) para p22phox y 29% (± 10 DS) para p47phox en los PMN de los pacientes no estimulados y de 34% (± 10 DS) y 21% (± 4 DS), posterior a la estimulación, respectivamente.

Una porción de p22-phox de los PMN de los pacientes sedimenta en las fracciones de alta concentración de sacarosa

La alteración previamente observada en la producción de ROS de PMN de pacientes pudiera estar asociada a un defecto en la distribución de las subunidades de multicomplejo enzimático. Por consi-

guiente, y paralelamente a los experimentos de inmunofluorescencia, se analizó el coeficiente de sedimentación de las proteínas p22-phox y p47-phox en polimorfonucleares de sujetos sanos y pacientes, mediante gradientes continuos de densidad en sacarosa.

Las fracciones de 1 mL (total de 12 fracciones) fueron colectadas progresivamente desde la parte inferior hacia la superior del gradiente (de mayor a menor densidad), a cada una de las fracciones se le determinó el porcentaje de sacarosa y se logró estimar el coeficiente de sedimentación de las proteínas del complejo, utilizando controles con coeficientes de sedimentación conocidos.

La figura 4 muestra la inmunodetección de la proteína p22-phox procedente de un gradiente con-

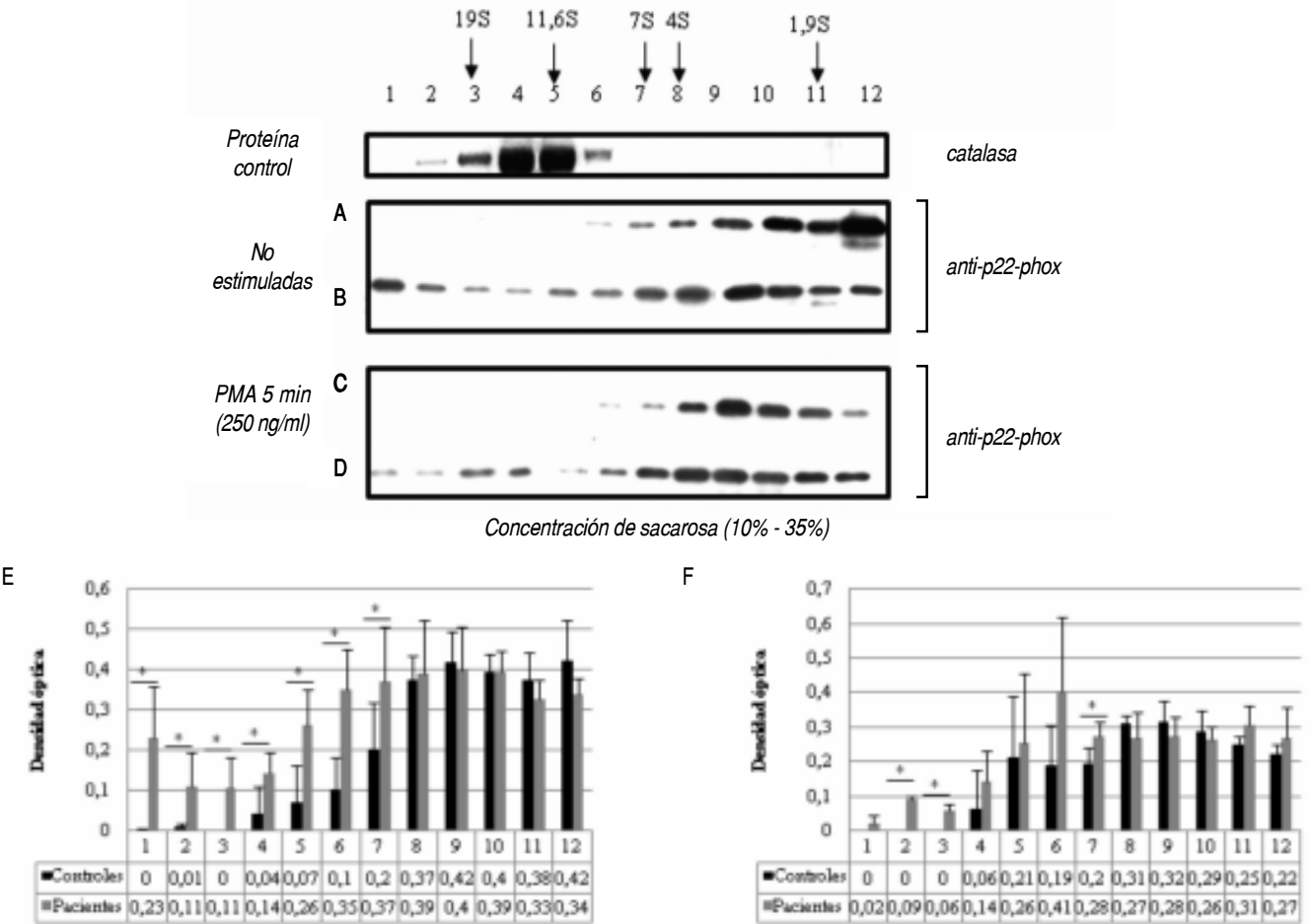


Figura 4. Coeficiente de sedimentación de p22-phox en PMN previo y posterior a la estimulación. A-D. Distribución de la catalasa, cuyo coeficiente de sedimentación es de 11.6 S y fue utilizada como control de coeficiente de sedimentación. Los lisados de controles (n = 4) (A y C) y pacientes (n = 4) (B y D) estimulados con PMA y no estimulados, fueron centrifugados en un gradiente continuo de sacarosa (10-35%) y luego analizados por Western blot usando un anticuerpo primario de conejo anti-p22-phox humano, a una dilución de 1:500 y un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (1:20.000). E y F. Promedio (\pm DS) de las densidades ópticas de las bandas correspondientes a cada una de las fracciones analizadas en ambos grupos. *p < 0.05.

tinuo en sacarosa. Como puede observarse la mayor proporción de p22-phox sedimenta a baja densidad (entre 4 y > 1 S) en lisados provenientes de células de controles previo al estímulo (Figura 4A); posterior a la activación con PMA se observa un desplazamiento de la proteína en fracciones de mayor densidad (4-3 S) (Figura 4C). Este patrón de distribución fue distinto en lisados de PMN provenientes de pacientes; previo a la estimulación una porción de p22-phox se distribuye en fracciones de baja densidad (aproximadamente entre 7 S y 2 S), mientras que otra porción de la misma sedimenta hacia las fracciones de alta densidad (> 19 S) (Figuras 4B y 4E).

Posterior al estímulo ocurre un desplazamiento hacia las fracciones de menor densidad; sin embar-

go, mantiene una distribución difusa (entre 19-11.6 S y 7-1.9 S) (Figuras 4D y 4F). La densidad de las bandas en cada fracción fue cuantificada en ambos grupos (cuatro controles y cuatro pacientes) (Figuras 4E y 4F), se evidencian diferencias estadísticamente significativas en la distribución de p22-phox en las fracciones de alta densidad.

En cuanto a la proteína p47-phox, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas en su patrón de sedimentación entre pacientes y controles. Como puede observarse en la figura 5A, p47-phox en controles y previo al estímulo la proteína sedimenta entre fracciones de mediana y baja densidad (entre 4 S y 1.9 S), observación que concuerda con lo reportado previamente.²⁹ Posterior al estímulo, p47-phox se concentra mayormente en fracciones

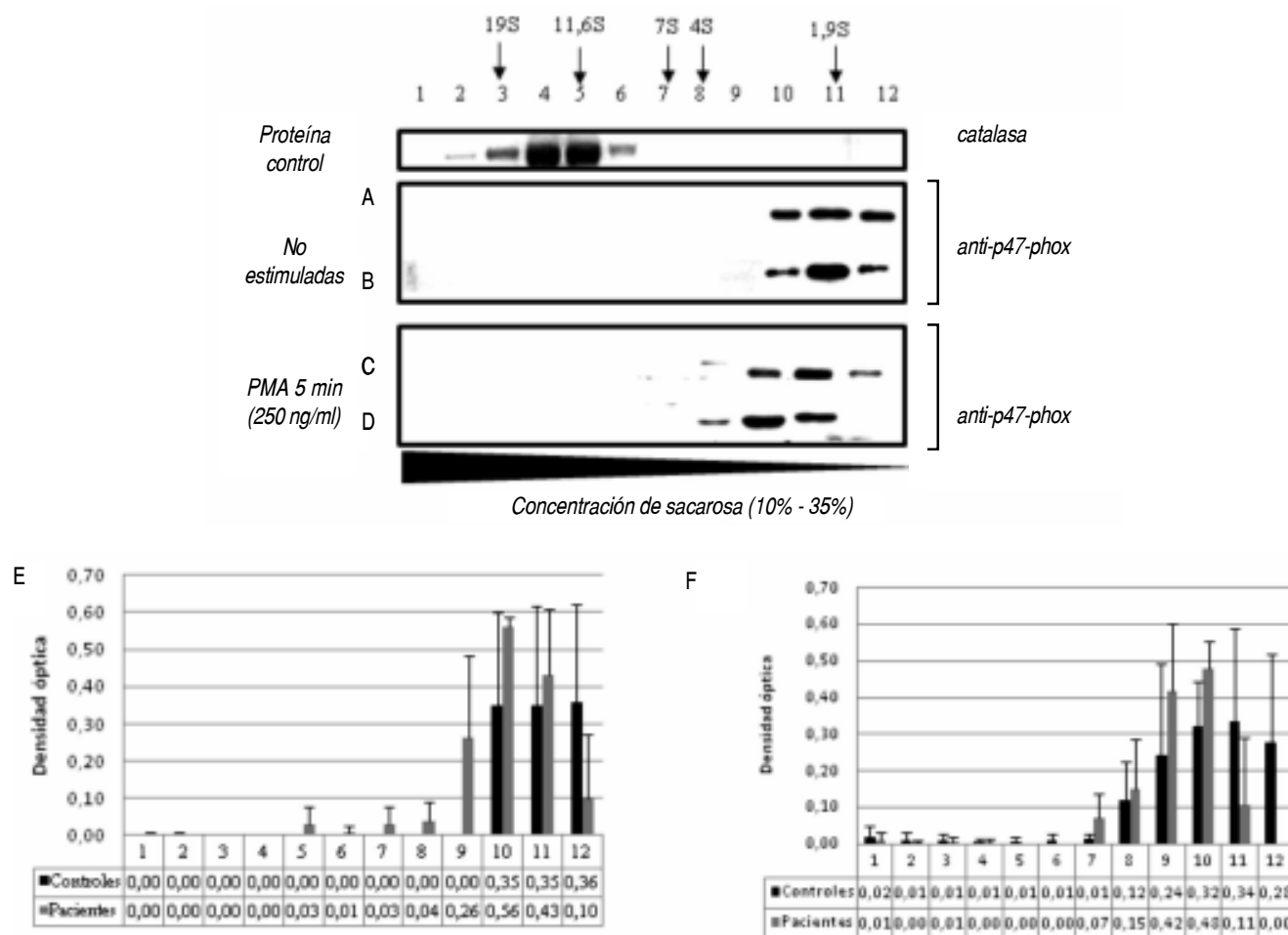


Figura 5. Coeficiente de sedimentación de p47-phox en PMN previo y posterior a la estimulación. Los lisados de controles (A y C) y pacientes (B y D) estimulados con PMA y no estimulados fueron centrifugados en un gradiente continuo de sacarosa (10 a 35%) y luego analizados por Western blott usando un anticuerpo primario de cabra anti-p47-phox humano diluido 1:500 y un anticuerpo secundario: anti IgG de cabra (1:5000) revelados mediante autorradiografía. E y F. Promedio (\pm DS) de las densidades ópticas de las bandas correspondientes a cada una de las fracciones obtenidas de PMN previo y postestimulación analizadas en ambos grupos (cuatro controles y cuatro pacientes). * $p < 0.05$.

de baja densidad (2 S) (Figura 5C). Este patrón de distribución fue similar en los PMN provenientes de pacientes (Figuras 5B, 5D-5F).

**p47-phox y p22-phox
de los PMN en reposo de
los pacientes son reclutadas
a la fracción citosólica insoluble**

Con la finalidad de comprender la dinámica del traslado de las proteínas en estudio dentro de los diferentes compartimentos subcelulares –particularmente su distribución hacia el compartimiento citosólico insoluble (contentivo de proteínas asociadas al citoesqueleto, membranas y organelas)– y complementar los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia y sedimentación en gradientes de densidad, se realizó un fraccionamiento subcelular siguiendo el protocolo descrito en la sección de Material y métodos (Figura 1).

En las figuras 6A-6D se muestra la distribución de p22-phox (figuras 6A y 6C) y p-47-phox (Figuras

6B y 6D) en la fracción citosólica insoluble obtenidas de polimorfonucleares del grupo control y de pacientes, previamente estimulados o no, con 250 ng/mL de PMA. Las figuras 6A y 6D muestran que en los neutrófilos de pacientes, previo al estímulo, p22-phox está ubicada constitutivamente y de manera significativa en la fracción citoplasmática insoluble,²⁶ sin modificaciones significativas posterior al estímulo,¹⁶ de tal manera que p22-phox está concentrada en forma constitutiva en la fracción citoplasmática insoluble. La distribución de p22-phox en la fracción nuclear no mostró diferencias entre pacientes y controles (datos no mostrados).

En las figuras 6B y 6E se analizó la distribución subcelular de la proteína p47-phox. En polimorfonucleares normales, independientemente del estímulo, p47-phox se localiza fundamentalmente en la fracción citoplasmática soluble (datos no mostrados), con una menor proporción en las fracciones insolubles en reposo y un incremento posterior al estímulo (Figuras 6B y 6C), resultados que concuerdan con publicaciones previas;³⁰ en el caso de los pacientes,

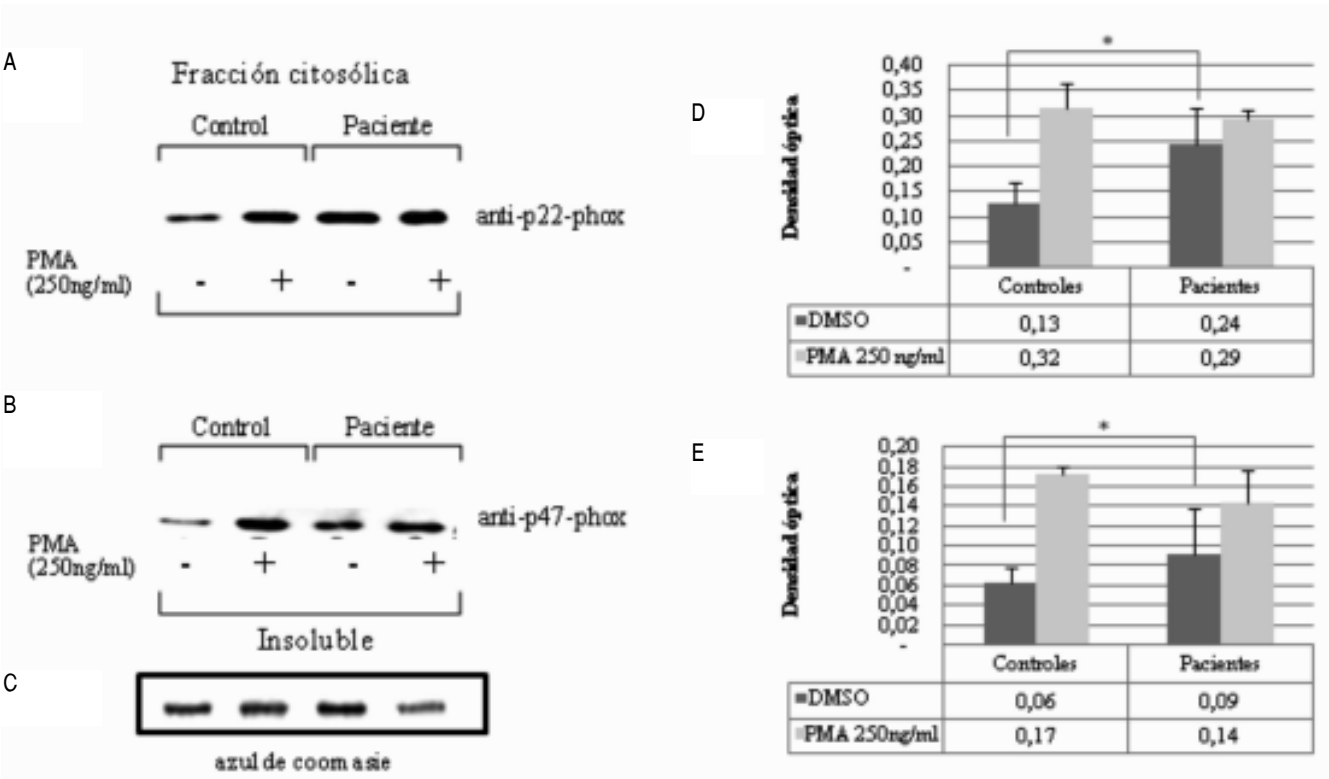


Figura 6. Determinación de p22-phox y p47-phox en la fracción citosólica insoluble de neutrófilos en reposo y posterior a la estimulación. **A.** Distribución de p22-phox en la fracción citoplasmática insoluble de controles y pacientes, sin y con estímulo (PMA 250 ng/mL). **B.** Distribución de p47-phox en la fracción citosólica insoluble de controles y pacientes, sin y con estímulo (PMA 250 ng/mL). **C.** Control de carga, la tinción de la membrana con azul de coomassie. **D y E.** Promedio (\pm DS) de las densidades ópticas de las bandas correspondientes a la detección de p22-phox y p47-phox en la fracción citosólica insoluble, analizados en ambos grupos (cuatro controles y cuatro pacientes). * $p < 0.05$.

se observa un mayor reclutamiento de esta proteína en la fracción insoluble del citoplasma en células no estimuladas sin cambios significativos posterior a la estimulación (Figura 6B). No se observaron diferencias significativas en la fracción nuclear insoluble entre controles y pacientes (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó si la alteración en la producción de especies reactivas del oxígeno, observada en neutrófilos de pacientes, podría estar asociada a cambios en la localización o distribución de proteínas del complejo NADPH oxidasa en los compartimentos celulares en los PMN de sujetos infectados con VIH.

Con este propósito:

- Se analizó la producción de especies reactivas del oxígeno.
- Se exploró la localización y movilización de proteínas del complejo (específicamente p47-phox y p22-phox) en PMN de sujetos infectados, comparados con sujetos sanos.

Acorde con estudios previos³¹⁻³³ la producción basal de especies reactivas del oxígeno en el grupo de pacientes fue superior a lo observado en los controles, condición que predispone al estrés oxidativo.

En condiciones fisiológicas la producción excesiva de ROS debe ser compensada con sustancias antioxidantes presentes en las células; sin embargo, existen evidencias de que el glutatión intracelular (iGSH), una de las principales sustancias antioxidantes, se encuentra disminuido en células de pacientes; disminución que se profundiza durante la progresión de la enfermedad.^{8,34} Así, cuando la producción excesiva de ROS no es efectivamente compensada por moléculas antioxidantes, puede conducir al estrés oxidativo, el cual desempeñaría un papel importante en la patogénesis de la infección por el VIH a través de varios mecanismos.^{35,36}

- Los ROS sinergizan con varias citokinas proinflamatorias activando al factor de transcripción NF- κ B e induciendo la transactivación de LTR del VIH.³⁶
- Se potencia la producción de citokinas proinflamatorias por los monolitos.^{37,38}
- Incrementa la replicación del virus.³⁹

Con base en estos hallazgos se decidió evaluar si el incremento basal de la producción de especies

reactivas del oxígeno se asociaba con cambios en la distribución de los componentes del complejo NADPH oxidasa.

En este estudio se evidenció que en los neutrófilos provenientes de pacientes, p22-phox está constitutivamente hacia la periferia celular, quizá asociada con la membrana plasmática, con poca o escasa presencia intracelular y con distribución centrípeta posterior a la estimulación. Algunos autores han sugerido que el ensamblaje y activación del complejo NADPH oxidasa en los neutrófilos ocurre con predominio intracelular, debido a que la redistribución de p22-phox posterior al estímulo es predominantemente en compartimentos intracelulares y sólo una porción se dirige hacia la membrana plasmática.

La distribución alterada de p22-phox en los PMN de los pacientes pudiera indicar defectos en el tráfico y redistribución subcelular de esta proteína. Paralelamente, el patrón de distribución de p22-phox en los neutrófilos de los pacientes, difusa entre las fracciones de alta y de baja densidad, se mantiene posterior al estímulo. Esto podría sugerir que p22-phox en los neutrófilos de los pacientes se encuentra constitutivamente formando asociaciones con otros componentes celulares o con proteínas del virus. Pudiera considerarse la asociación constitutiva a componentes de citoesqueleto celular, debido a las observaciones de su ubicación predominante y de manera constitutiva hacia la fracción insoluble (fracción asociada con el citoesqueleto). Sin embargo, no se excluye la posibilidad de que estos cambios pudieran ser conducidos por elementos del virus, soportados por evidencias recientes que muestran una asociación directa entre Nef y p22-phox, demostrándose además que ambas proteínas muestran colocalización intracelular, lo que sugiere mecanismos de modulación directa del virus sobre el complejo NADPH-oxidasa.⁴⁰

p47-phox es uno de los principales componentes citosólicos, con múltiples residuos susceptibles a ser fosforilados; expone epitopes requeridos para el traslado del complejo a la membrana plasmática donde interactúa con el citocromo b588.⁴¹ Así, p47-phox funciona como una proteína adaptadora.⁴² Adicional a los cambios observados en p22-phox, la distribución de p47-phox en los neutrófilos de los pacientes también muestra cambios en las células en estado basal, cambios reflejados a diferencia en la distribución citoplasmática y de localización constitutiva en la fracción citosólica insoluble, hallazgos que en conjunto sugieren un estado de activación constitutiva de estas proteínas.⁴³

Se ha propuesto que uno de los mecanismos involucrados en la disfunción del sistema inmune durante la infección por VIH es el estado de activación crónica del sistema inmune, que no sólo compromete a los elementos de la inmunidad adaptativa, sino también a los componentes de la inmunidad innata.⁴⁴ Una de las poblaciones celulares afectadas son las células dendríticas plasmocitoides (CDp), las cuales durante la infección aguda expresan marcadores de activación, tales como IDO –molécula que se mantiene durante la fase crónica de la enfermedad y se asocia, además, con una inapropiada respuesta adaptativa de células T específicas anti-VIH–.⁴⁵

Los ROS participan en múltiples eventos celulares dentro de los que se incluyen función bactericida y de molécula de señalización,⁴⁶ vinculándose con la activación de la ruta de la MAPkinasa que conecta con las rutas de muerte celular⁴⁷ o con la activación de una nueva forma de muerte conocida como etosis.⁴⁸ Diversos estudios han documentado la producción basal incrementada de metabolitos reactivos del oxígeno en células fagocíticas de pacientes infectados por VIH.^{2,7,10,31,32,35} Por lo que su producción excesiva, sin un adecuado balance, pudiera estar involucrada en la pérdida progresiva de poblaciones celulares efectoras durante la progresión hacia la fase de SIDA.

CONCLUSIONES

Durante la infección por VIH existen alteraciones en la localización subcelular, migración y sedimentación de componentes del complejo NADPH oxidasa; estos cambios pudieran asociarse con el incremento basal de la producción de ROS y, posiblemente, a la elevada tasa de muerte en los PMN de estos pacientes.

La producción constante de ROS no compensada adecuadamente por antioxidantes a largo plazo, condiciona un estado de agotamiento celular que impide que los neutrófilos respondan de manera eficiente a infecciones y a la muerte celular acelerada, eventos que caracterizan las fases terminales de la enfermedad.

Profundizar en estos mecanismos pudiera aportar nuevas estrategias terapéuticas que permitan bloquear la producción excesiva de especies reactivas del oxígeno y, consecuentemente, el agotamiento de los neutrófilos, anticipándose al desarrollo de infecciones oportunistas durante la infección por VIH.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Profesor Elberth Oberto Reyes Graterol por su asistencia durante el uso del microscopio confocal.

Este trabajo fue financiado a través del proyecto F-2000001509 del FONACIT y CDCHT M-998-10-07-B.

REFERENCIAS

1. Babior B. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 42-7.
2. Bandres JC, Trial J, Musher DM, Rossen RD. Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophil and monocytes of men with stage 1 Human Immunodeficiency Virus infection. *J Infect Dis* 1993; 168: 75-83.
3. Trial J, Birdsall HH, Hallum JA, Crane ML, Rodriguez-Barradas MC, de Jong AL, et al. Phenotypic and functional changes in peripheral blood monocytes during progression of human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest* 1995; 95: 1690-701.
4. Muñoz JF, Salmen S, Berrueta L, Carlos MP, Cova JA, Donis JH, et al. Effect of human immunodeficiency virus type 1 on intracellular activation and superoxide production by neutrophil. *J Infect Dis* 1999; 180: 206-10.
5. Pitrak DL, Bak PM, DeMarais P, Novak RM, Andersen BR. Depressed neutrophil superoxide production in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993; 167: 1406-10.
6. Spear GT, Kessler HA, Rothberg L, Phair J, Landay AL. Decreased oxidative burst activity of monocytes from asymptomatic HIV-infected individual. *Clin Immunol Immunopathol* 1990; 54: 184-91.
7. Elbim C, Pillet S, Prevost MH, Preira A, Girard PM, Rogine N, et al. The role of phagocytes in HIV-related oxidative stress. *J Clin Virol* 2001; 20: 99-109.
8. Israel N, Gougerot-Pocidalo MA. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *Cell Mol Life Sci* 1997; 53: 864-70.
9. Piette J, Legrand-Poels S. HIV-1 reactivation after an oxidative stress mediated by different reactive oxygen species. *Chem Biol Interact* 1994; 91: 79-89.
10. Salmen S, Montes H, Soyano A, Hernández D, Berrueta L. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 539-45.
11. Masanetz S, Lehmann MH. HIV-1 Nef increases astrocyte sensitivity towards exogenous hydrogen peroxide. *Virol J* 2011; 8: 35.
12. Zhang HS, Li HY, Zhou Y, Wu MR, Zhou HS. Nrf2 is involved in inhibiting Tat-induced HIV-1 long terminal repeat transactivation. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 261-8.
13. Wu RF, Ma Z, Myers DP, Terada LS. HIV-1 Tat activates dual Nox pathways leading to independent activation of ERK and JNK MAP kinases. *J Biol Chem* 2007 282: 37412-9.
14. Wu F, Gu Y, Xu Y, et al. Human immunodeficiency virus type 1 Tat regulates endothelial cell actin cytoskeletal dynamics through PAK1 activation and oxidant production. *J Virol* 2004; 78: 779-89.
15. Olivetta E, Mallozzi C, Ruggieri V, Pietraforte D, Federico M, Sanchez M. HIV-1 Nef induces p47(phox) phosphorylation leading to a rapid superoxide anion release from the U937 human monoblastic cell line. *J Cell Biochem* 2009; 106: 812-22.
16. Li J, Shah A. Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 19952-60.
17. Sheppard FR, Kelher MR, Moore EE, McLaughlin NJ, Banerjee A, Silliman CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1025-42.

18. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 31-9.
19. Vilhardt F, van Deurs B. The phagocyte NADPH oxidase depends on cholesterol-enriched membrane microdomains for assembly. *EMBO* 2004; 1: 1-10.
20. Wientjes F, Segal A, Hartwig J. Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. *J Leuk Biol* 1997; 61: 303-12.
21. Jahanmehar SA, Hyde K, Geary CG, Cinkotai KI, Maciver JE. Simple technique for fluorescence staining of blood cells with acridine orange. *J Clin Pathol* 1987; 40: 926-9.
22. Berrueta L, Kraeft SK, Tirnauer JS, Schuyler SC, Chen LB, Hill DE, et al. The adenomatous polyposis coli-binding protein EBI is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10596-601.
23. Berrueta L, Tirnauer JS, Schuyler SC, Pellman D, Bierer BE. The APC-associated protein EBI associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr Biol* 1999; 9: 425-8.
24. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
25. Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 2499.
26. Ginsel L, Onderwater J, Franssen J. Localization of the low-Mr subunit of cytochrome b558 in human blood phagocytes by immunoelectron microscopy. *Blood* 1990; 76: 2105-16.
27. Guichard C, Pedruzzi E, Dewas C, Fay M, Pouzet C, Bens M, et al. Interleukin-8-induced priming of neutrophil oxidative burst requires sequential recruitment of NADPH oxidase components into lipid rafts. *J Biol Chem* 2005; 280: 37021-32.
28. Allen LA, DeLeo FR, Gallois A, Toyoshima S, Suzuki K, Nauseef WM. Transient association of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase subunits p47phox and p67phox with phagosome in neutrophil from patients with X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 1999; 93: 3521-30.
29. Lapouge K, Smith SJ, Groemping Y, Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67phox complex in the resting state of the NADPH oxidase. *J Biol Chem* 2002; 277: 10121-8.
30. Omori K, Ohira T, Uchida Y, Ayilavarapu S, Batista EJ, Yagi M, et al. Priming of neutrophil oxidative burst in diabetes requires preassembly of the NADPH oxidase. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 292-301.
31. Elbim C, Monceaux V, François S, Hurtrel B, Gougerot-Pocidalo MA, JE. Increased neutrophil apoptosis in chronically SIV-infected macaques. *Retrovirology* 2009; 24: 29-35.
32. Elbim C, Pillet S, Prevost MH, Preira A, Girard PM, Rogine N, et al. Redox and activation status of monocytes from human immunodeficiency virus-infected patients: relationship with viral load. *J Virol* 1999; 73: 4561-6.
33. Elbim C, Prevot M, Bouscarat F, Franzini E, Chollet-Martin S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. Polymorphonuclear neutrophils from human immunodeficiency virus-infected patients show enhanced activation, diminished fMLP-induced L-Selectin shedding, and an impaired oxidative burst after cytokine priming. *Blood* 1994; 84: 2759-66.
34. Sahaf B, Heydari K, Herzenberg LA, Herzenberg LA. The extracellular microenvironment plays a key role in regulating the redox status of cell surface proteins in HIV-infected subjects. *Archiv Biochem Biophys* 2005; 434: 26-32.
35. Baruchel S, Wainberg MA. The role of oxidative stress in disease progression in individuals infected by the human immunodeficiency virus. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 111-4.
36. Israel N, Gougerot-Pocidalo MA, Aillet F, Virelizier JL. Redox status of cells influences constitutive or induced NF- κ B translocation and HIV long terminal repeat activity in human T and monocytic cell lines. *J Immunol* 1992; 149: 3386-93.
37. Chaudri G, Clark I. Reactive oxygen species facilitate the in vitro and in vivo lipopolysaccharide-induced release of tumor necrosis factor. *J Immunol* 1989; 143: 1290-7.
38. Gougerot-Pocidalo MA, Roche Y, Fay M, Perianin A, Bailly S. Oxidative injury amplifies interleukin-1 activity produced by human monocytes. *Int J Immunopharmacol* 1989; 11: 961-9.
39. Israel N, Hazan U, Alcamí J, Munier A, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F, et al. Tumor necrosis factor stimulates transcription of HIV-1 in human T lymphocytes, independently and synergistically with mitogens. *J Immunol* 1989; 143: 3956-60.
40. Salmen S, Colmenares M, Peterson DL, Reyes E, Rosales JD, Berrueta L. HIV-1 Nef associates with p22-phox, a component of the NADPH oxidase protein complex. *Cell Immunol* 2010; 263: 166-71.
41. Ago T, Kuribayashi F, Hiroaki H, Takeya R, Ito T, Kohda D, et al. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 447-79.
42. Gu Y, Xu YC, Wu RF, Souza RF, Nwariaku FE, Terada LS. TNF α activates c-Jun amino terminal kinase through p47(phox). *Exp Cell Res* 2002; 272: 62-74.
43. Nixon J, McPhail L. Protein kinase C (PKC) isoforms translocate to triton-insoluble fractions in stimulated human neutrophils: Correlation of conventional PKC with activation of NADPH oxidase. *J Immunol* 1999; 163: 4574-82.
44. Boasso A, Shearer GM. Chronic innate immune activation as a cause of HIV-1 immunopathogenesis. *Clin Immunol* 2008; 126: 235-42.
45. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Anderson SA, Dolan MJ, Fuchs D, Shearer GM. HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2007; 109: 3351-9.
46. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007; 87: 245-313.
47. Matsuzawa A, Saegusa K, Noguchi T, Sadamitsu C, Nishitoh H, Nagai S, et al. ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 2005; 6: 587-92.
48. Wartha F, Henriques-Normark B. ETosis: A novel cell death pathway. *Science Signaling* 2008; 1: 1-3.

Reimpresos:

Lisbeth Berrueta, MD, MSc, PhD
 Instituto de Inmunología Clínica
 Facultad de Medicina
 Universidad de Los Andes
 Av. 16 de septiembre
 Edificio Louis Pasteur
 Anexo 1AHULA
 Mérida 5101, Venezuela
 Correo electrónico: lberruet@ula.ve

Recibido el 17 de noviembre de 2010.
 Aceptado el 7 de abril de 2011.