

# Programa de Doctorado en Biomedicina

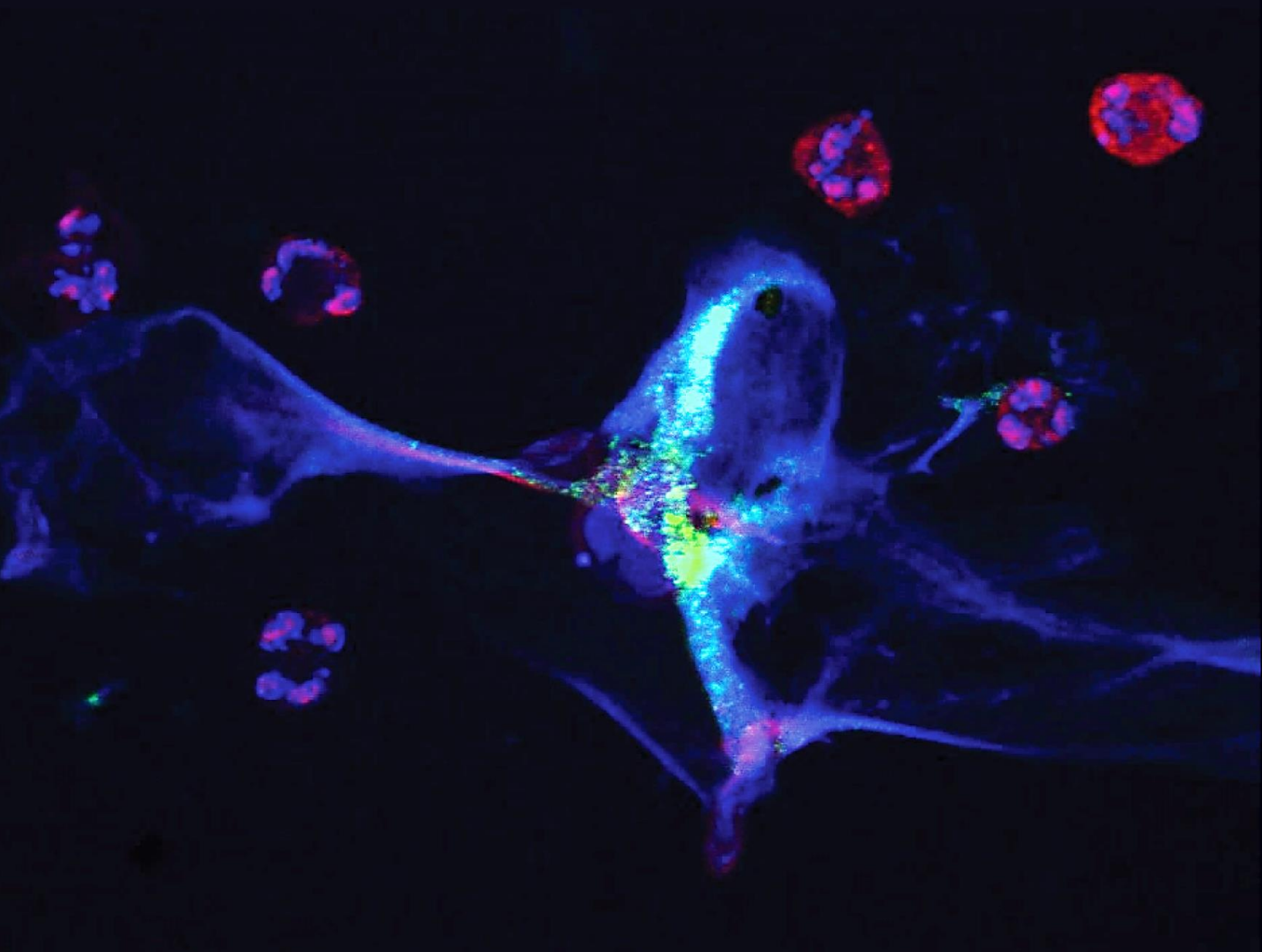


**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

## **Evaluación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) como mecanismo preventivo de la infección por VIH en el aparato genital femenino**

Memoria presentada por **Laura Moreno de Lara** para optar al título  
de Doctora por la Universidad de Granada

**Granada 2024**



# Evaluación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) como mecanismo preventivo de la infección por VIH en el aparato genital femenino

TESIS DOCTORAL

Bajo la dirección de Marta Rodríguez García  
y Ana C. Abadía Molina

**Laura Moreno de Lara**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Laura Moreno de Lara  
ISBN: 978-84-1195-186-9  
URI: <https://hdl.handle.net/10481/89484>



A mis padres.

“Culture does not make people. People make culture. If it is true that the full humanity of women is not our culture, then we can and must make it our culture.”

Chimamanda Ngozi Adichie

Con el propósito de garantizar una salud plena y justa para todas las mujeres, esta tesis contribuye a la representación de la mujer como población de interés en investigación.

Gracias a todas las que lo hicieron posible.

## Agradecimientos

Me gustaría empezar estos agradecimientos con mis directoras de tesis, Ana y Marta. Ana, nos conocimos en 2016 cuando buscaba un grupo para realizar el Trabajo Fin de Máster. Me abriste las puertas de tu laboratorio y, desde ese día, siempre has confiado en mí. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de comenzar el increíble camino de la investigación, por impulsarme a crecer en este mundo y por haber estado tan pendiente de mí los meses de adaptación en Boston. Siempre te estaré muy agradecida por toda la ayuda que me has prestado. Marta, nuestro encuentro llegó un poco más tarde, en 2019, en la cafetería de la facultad en la que nos volveremos a encontrar con esta tesis bajo el brazo. Aunque siento que ese momento ocurrió ayer, nos ha llovido (y nevado) desde entonces. Muchas gracias por cada uno de los consejos que me has dado durante estos años; por tu fe ciega en mí, en mi intuición y en mis ideas; por esos momentos en los que nos contagiábamos la una a la otra el entusiasmo y la alegría con resultados increíbles o con buenas noticias, pero también por haber sido refugio y tranquilidad en las no tan buenas. Ha sido un placer formar parte de un proyecto tan precioso, y me siento afortunada de haber podido vivir esta aventura de la mano de una persona tan inteligente, talentosa y carismática como tú.

I would also like to thank my lab mates, department members from Tufts University, and students who rotated with us. Fran and Sid, thank you for all the moments we shared during these years. Thank you, Pilar, Kuljeet, Manuel and Sheila for all your help, particularly at the beginning of this journey. Thank you, Kimberly (my fridge looks much better now with your green line magnet on it), Wendelin, Chris, Aleah, Bao, and Ashley. Anna and Allie, I would especially like to thank you for being my first American friends, and for every 'buenos días' you said every morning to make me feel home. Doing experiments was so much funnier with you both in the tissue culture room, singing and dancing around when our brains were struggling calculating 2+2, but yours were completely ready to learn the spontaneous Spanish words that I used to express my disagreement with mistakes and timers.

I also want to thank Christina, for being very supportive and for providing us the amazing viral like particles used in this thesis; Chuck, for all your help and suggestions; and all the donors for participating.

Gracias también a mi familia. Mamá y papá, gracias por haber sido el principal apoyo que he tenido siempre, por creer en mí, por haber estado incondicionalmente cada vez que os he necesitado, y por haber puesto tanto empeño en que os sintiese tan cerquita a través de una pantalla. Félix, gracias por celebrar conmigo cada éxito, por las palabras tan bonitas que siempre has usado (y usas) para referirte a mí, y por haber sido la voz de la calma y la cordura cuando los miedos me encontraban. Este trabajo también es el resultado de haber podido contar con unos referentes como vosotros tres y por el infinito respaldo, ánimo y amor que siempre me habéis dado. Abuela y Titi, sin duda alguna, esta tesis existe gracias a todas esas

tortillas de patatas y mayonesas caseras que han sido motor de felicidad y energía durante tantos años. Rosa, gracias por todo tu cariño, ánimo, optimismo y esa maravillosa firmeza en celebrar siempre las cosas buenas. Cuento contigo para brindar por ésta. Titos, Irene, María y demás familia, gracias por estar siempre plenamente dispuestos para celebrar reencuentros en Bobadilla, por todo el cariño y por esos abrazos que tanto me recargaban de energía. Tyri, sé que, si estuvieras aquí, sentirías la alegría y emoción que supone este momento en mi vida. Estarías ahora mismo saltando como loco de contento. Gracias a ti también por haberme recibido siempre con tanto amor y por haber cuidado a todos durante este tiempo. Ahora, cuida a los de arriba, que también me acuerdo mucho de ellos.

A mis amigas Águeda, Marta, Nieves, Silvia, Carmen y Cristina, por ser las amigas que más orgullosas están del mundo. Gracias por haber estado siempre tan atentas, por vuestra disponibilidad absoluta con cada visita, por los tropecientos audios de WhatsApp poniéndonos al día, por los ánimos y por ese cariño y amor infinito que no se nos va a acabar nunca.

Al origen de todo: el 244. Gracias a Rocío, Salva, Tatiana y resto de miembros del laboratorio, entre esas paredes descubrí que quería dedicarme a la ciencia, y eso fue en parte también gracias a vosotros y vuestro compañerismo.

A mi familia bostoniana (Sabattttt). Esta experiencia habría tenido un color mucho más gris sin vosotros. Gracias por cada jueves de cervecitas para que la semana no se hiciera tan larga, por los faialenses y sus infartantes campeonatos de fútbolín, por haber sido los mejores compañeros de aventuras americanas y haber sido arropo cuando el frío pegaba fuerte. Gracias a todos, pero especialmente a Lola, mi amiga, aunque también mi hermana según vendedores ambulantes de perritos. Qué suerte haber podido conocer y tener en mi vida a una persona tan alegre, dispuesta, divertida y atenta como tú. Mil gracias por haberme acompañado durante todo este recorrido, desde los pequeños ratitos después del trabajo en el Sissy K's o derivados, hasta los grandes debuts como 'yo quiero bailar toda la noche', 'dakiti' o 'el baile del egipcio'.

Y, por último, a mi Rafa. Gracias por haber sido ese muro en el que poder descansar cada vez que las fuerzas se tambaleaban. Gracias por haberme cuidado tanto, por tu empatía, por tu cariño, por confiar siempre en mí y convencerme y repetirme mil veces todas las cosas que soy capaz de hacer. Gracias por haberte asegurado siempre de hacerme sentir que no estaba sola en esto, por alegrarte de las cosas buenas que me pasan casi más que yo misma, y por recordarme cada día que soy fuerte y valiente. Todo el mundo debería tener un Rafa en su vida, pero yo tengo la suerte de haber encontrado al original.



# Índice de contenidos

<b>Resumen .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>31</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>34</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>44</b>
<b>Discusión .....</b>	<b>80</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>85</b>
<b>Índice de ilustraciones, figuras y tablas .....</b>	<b>86</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>91</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>94</b>

## Resumen

Las mujeres representan la mitad de la población infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en el mundo. A pesar de que el número de nuevos diagnósticos en mujeres en edad reproductiva está descendiendo, las tasas de contagio están incrementando en mujeres mayores de 50 años. La principal vía de adquisición del VIH en mujeres es por transmisión sexual; sin embargo, la tasa de contagio por contacto sexual es baja, indicando la presencia de mecanismos de inmunidad innata que protegen el tracto genital femenino (TGF) de infecciones. Entre las células del sistema inmunológico innato que residen en la mucosa genital, los neutrófilos son los leucocitos más abundantes. Los neutrófilos se caracterizan por presentar un amplio abanico de respuestas frente a patógenos, entre las que encontramos: degranulación, liberación de especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), fagocitosis o la liberación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs, *neutrophil extracellular traps*). Las NETs son estructuras en forma de red compuestas por fibras de ADN y recubiertas por proteínas con actividad antimicrobiana. Los neutrófilos liberan estas NETs con el fin de atrapar e inactivar patógenos.

Nuestro grupo de investigación demostró en publicaciones anteriores que los neutrófilos genitales de mujeres en edad reproductiva (premenopáusicas) liberan NETs de manera inmediata en respuesta al VIH. Además, estas NETs se caracterizan por tener la capacidad de inactivar al virus de manera irreversible, lo que representa un mecanismo protector innato de la mucosa genital frente a la infección por VIH. Sin embargo, aún se desconocen los eventos moleculares subyacentes involucrados en el reconocimiento viral y la liberación de NETs, así como hasta qué punto la protección innata de la mucosa cambia en el tracto genital femenino con el envejecimiento.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron muestras humanas del tracto genital femenino (24-77 años) y de sangre (18-72 años) procedentes de mujeres donantes. Estas muestras fueron procesadas para la obtención de suspensiones celulares y purificación de neutrófilos. Las células se estimularon *in vitro* con partículas virales de VIH (PV-VIH) para inducir y evaluar la liberación de NETs. Los resultados obtenidos demostraron que la formación de NETs en respuesta a VIH está impedida en neutrófilos genitales y de sangre procedentes de mujeres postmenopáusicas, reduciéndose de forma progresiva a medida que éstas envejecen. Los neutrófilos genitales y sanguíneos liberaron NETs tras reconocer el material genético del VIH a través de dos receptores tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) endosomales: TLR7 y TLR8. TLR8 está involucrado en la liberación temprana de NETs (0-15 min) y TLR7 en la liberación tardía (15 min-2 h). No obstante, también se identificaron diferencias en los mecanismos de liberación de NETs entre los neutrófilos de sangre y del TGF. En los neutrófilos sanguíneos, la envoltura del VIH es también reconocida, induciendo la liberación de NETs y un rápido incremento en los niveles de calcio intracelular. Esta respuesta de calcio se redujo significativamente en mujeres a medida que aumentaban en edad, suponiendo también

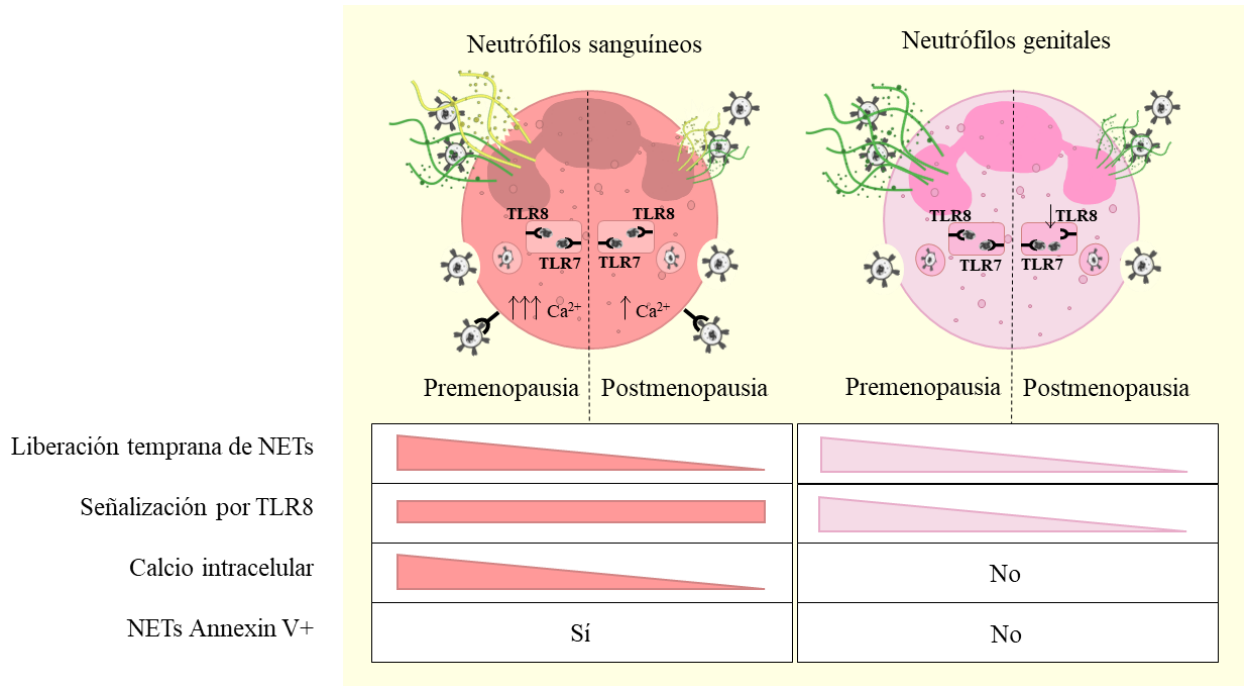
una disminución en la liberación de NETs. Por el contrario, los neutrófilos genitales no mostraron un aumento en los niveles intracelulares de calcio cuando se estimularon con VIH. Los neutrófilos genitales únicamente liberaron NETs tras reconocer el VIH a través de los TLRs endosomales, y la ruta de señalización mediada por TLR8 se vio negativamente afectada en mujeres postmenopáusicas, suponiendo una reducción en la liberación de NETs. Hasta donde sabemos, esta es la primera descripción de diferentes respuestas por parte de neutrófilos de sangre y de tejido ante el mismo patógeno. Además, es la primera demostración de que el envejecimiento a partir de la menopausia afecta la liberación de NETs en respuesta al VIH, lo que proporciona información importante para comprender la susceptibilidad a la infección a medida que las mujeres envejecen. Nuestros hallazgos resaltan que las respuestas de los neutrófilos tisulares no pueden predecirse simplemente a partir de modelos de neutrófilos sanguíneos.

El proceso de liberación de NETs puede implicar la ruptura de la membrana celular del neutrófilo o no comprometer su integridad. Se diferencia entonces entre liberación lítica de NETs, un proceso asociado con inflamación y muerte celular; y liberación no lítica de NETs, que no compromete la viabilidad. En este estudio identificamos por primera vez dos marcadores (anexina V, ANXV; y lactoferrina, LTF) que permitían la tinción específica de NETs producidos a través de vías líticas, lo cual posibilita la diferenciación entre NETs líticos y no líticos. Considerando la incorporación o no de estos marcadores en los NETs, identificamos que los neutrófilos sanguíneos liberaban NETs en respuesta al VIH a través de vías líticas y no líticas. Sin embargo, los neutrófilos genitales realizaban preferencialmente la liberación no lítica de NETs en respuesta al virus. Estos resultados indican que la liberación de NETs en los tejidos genitales no está asociada a inflamación. La inflamación está relacionada con un aumento del daño tisular y un mayor reclutamiento de células inmunológicas. En el contexto de infección por VIH, estas consecuencias potenciarían el contacto entre el VIH y sus células diana. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la liberación de NETs en la mucosa genital desempeña funciones protectoras frente a la adquisición del VIH, suponiendo un mecanismo de la inmunidad innata involucrado en la prevención del contagio por VIH.

En resumen, nuestros resultados indican que la liberación temprana de NETs en respuesta al VIH se reduce progresivamente en las mujeres a partir de la menopausia. Esta reducción se debe a la alteración de mecanismos involucrados en el reconocimiento del VIH, viéndose afectadas diferentes rutas dependiendo de si los neutrófilos son sanguíneos o residentes en la mucosa genital. Además, identificamos que la estimulación con VIH inducía la liberación de un conjunto de NETs que incorporaban anexina V. Estos NETs se visualizaron predominantemente en neutrófilos sanguíneos, sugiriendo propiedades proinflamatorias que estarían ausentes en los neutrófilos de la mucosa genital (Ilustración 1).

Con ello, concluimos que las respuestas de neutrófilos tisulares no pueden ser simplemente extrapoladas a partir de modelos de neutrófilos sanguíneos, que la liberación de NETs por parte de

neutrófilos genitales supone un bajo daño tisular y un mínimo reclutamiento de células diana para el VIH en el tracto genital femenino, y que la reducción de NETs en respuesta con VIH en mujeres postmenopáusicas a medida que avanzan en edad podría representar un factor de mayor riesgo de infección por VIH.



**Ilustración 1. Diferencias entre neutrófilos sanguíneos y genitales durante la liberación de NETs.**

Resumen de las principales diferencias en el proceso de liberación de NETs en respuesta al VIH entre neutrófilos sanguíneos y del tracto genital femenino y su alteración con la edad.

## Introducción

<b>1. Infección por VIH</b> .....	2
<b>2. Epidemiología y estadísticas</b> .....	2
<b>3. Estructura del VIH</b> .....	5
<b>4. Ciclo de replicación del VIH</b> .....	7
<b>5. Vías de transmisión y tratamientos</b> .....	8
<b>5.1. Tratamientos de prevención del VIH</b> .....	9
<b>5.2. Tratamientos del VIH</b> .....	10
<b>6. Factores de riesgo para la adquisición de VIH en mujeres</b> .....	11
<b>6.1. Factores biológicos</b> .....	11
<b>6.2. Factores socioeconómicos</b> .....	13
<b>7. Patogenia de la infección VIH en el aparato genital femenino</b> .....	15
<b>7.1. Células epiteliales</b> .....	16
<b>7.2. Microbioma genital</b> .....	18
<b>7.3. Células inmunológicas</b> .....	18
<b>8. Neutrófilos</b> .....	19
<b>8.1. Mecanismos de reconocimiento de patógenos en neutrófilos</b> .....	21
<b>9. Mecanismos de defensa de los neutrófilos</b> .....	24
<b>9.1. Producción de ROS</b> .....	24
<b>9.2. Degranulación</b> .....	25
<b>9.3. Fagocitosis</b> .....	25
<b>9.4. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)</b> .....	25
<b>10. Neutrófilos y envejecimiento</b> .....	28
<b>11. Neutrófilos y VIH</b> .....	29

# Introducción

La pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana o VIH comienza en junio de 1981, cuando el centro de control de enfermedades (CDC, *Centers for Disease Control and Prevention*) de los Estados Unidos reporta la primera evidencia clínica sobre una enfermedad que, más adelante, se catalogó como Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [1, 2]. Sin embargo, no fue hasta 1983 cuando la investigadora Françoise Barré-Sinoussi publica, desde el instituto Pasteur en Francia, el descubrimiento de un retrovirus como posible agente causante del SIDA [3]. Dicho retrovirus toma oficialmente en 1986 el nombre de ‘Virus de la Inmunodeficiencia Humana’ tras ser anunciado por parte del Comité Internacional de Taxonomía de Virus [1].

## 1. Infección por VIH

El VIH es un retrovirus que infecta a un conjunto de células del sistema inmunológico que expresan el receptor CD4 y los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 en su membrana. Por tanto, se catalogan como principales células diana para el VIH las células T CD4<sup>+</sup>, las células dendríticas y los macrófagos [4, 5]. En la etapa más temprana de la infección por VIH, hay una infección linforreticular sistémica masiva que supone una reducción importante en el número de células T CD4<sup>+</sup>. Los mecanismos de eliminación de las células T CD4<sup>+</sup> incluyen [4]:

- Apoptosis de células infectadas y activadas a través de mecanismos no inflamatorios mediados por caspasa 3.
- Piroptosis de células transeúntes infectadas a través de la activación de caspasa 1. Este mecanismo puede explicar la mayoría de las células T perdidas, y se caracteriza por ser un proceso altamente inflamatorio [4].

Ante este escenario, el individuo infectado padece una supresión inmunológica que, en ausencia de tratamiento, progresa frecuentemente al estado más avanzado de la infección por VIH: el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida o SIDA. El SIDA se define por el desarrollo ciertos tipos de cáncer, infecciones u otras manifestaciones clínicas graves a largo plazo que pueden concluir con la muerte [5-7].

## 2. Epidemiología y estadísticas

La infección por VIH continúa siendo un problema de salud pública a nivel global con 39 millones de personas infectadas en el mundo y con 1.3 millones de nuevas infecciones en 2022 [7, 8].

Según las estadísticas proporcionadas por el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el SIDA (ONUSIDA) en 2022, se estima que:

- De los 39 millones de personas viviendo con VIH, 1.5 millones son menores de 15 años.
- En el año 2022, el 86% de las personas con VIH sabían que están infectadas y el 76% tuvieron acceso a un tratamiento.
- 630 000 personas murieron a causa de patologías relacionadas con el SIDA [8].

**Tabla 1. Datos epidemiológicos del VIH a nivel mundial.**

	2000	2005	2010	2021	2022
<i>Personas infectadas con VIH</i>	26.6 millones [22.6-31.2M]	28.9 millones [24.5-33.8M]	31.5 millones [26.7-36.8M]	38.7 millones [32.8-45.2M]	39.0 millones [33.1-45.7M]
<i>Nuevas infecciones por VIH (totales)</i>	2.8 millones [2.2-3.8M]	2.5 millones [1.9-3.3M]	2.1 millones [1.6-2.8M]	1.4 millones [1.1-1.8M]	1.3 millones [1.0-1.7M]
<i>Nuevas infecciones por VIH (adultos, +15 años)</i>	2.3 millones [1.7-3.1M]	2.0 millones [1.5-2.6M]	1.8 millones [1.4-2.4M]	1.3 millones [0.95-1.7M]	1.2 millones [0.9-1.6M]
<i>Nuevas infecciones por VIH (niños, 0-14 años)</i>	530 000 [0.36-0.83M]	480 000 [0.33-0.75M]	310 000 [0.21-0.49M]	140 000 [0.1-0.22M]	130 000 [0.09-0.21M]
<i>Muertes relacionadas con el SIDA</i>	1.7 millones [1.3-2.4M]	2.0 millones [1.5-2.7M]	1.3 millones [1-1.8M]	660 000 [0.5-0.9M]	630 000 [0.5-0.9M]

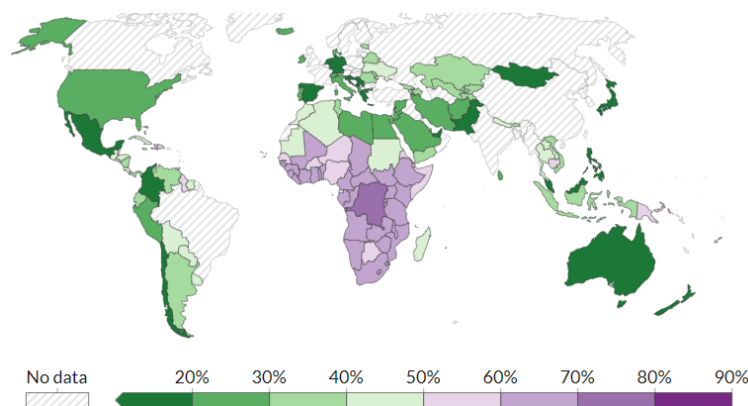
Datos epidemiológicos sobre el número personas infectadas por VIH, nuevas infecciones y muertes a causa del SIDA desde el 2000 al 2022. Datos proporcionados por el Programa Conjunto de ONUSIDA, 2023 [8].

Las mujeres representan el 53% de las personas infectadas por VIH a nivel global [8]. Sin embargo, estos porcentajes varían dependiendo de las zonas geográficas a las que nos refiramos. En países de Europa o Norteamérica, la proporción de mujeres con VIH es menor que la de hombres, siendo las mujeres el 20-40% de las personas infectadas por el virus [9]. Sin embargo, en algunas regiones endémicas tales como el África Subsahariana, este porcentaje de mujeres con VIH asciende hasta un 60-80% (Ilustración 2) [9].

En 2022, se infectaron con VIH alrededor de 4 000 mujeres de entre 15-24 años semanalmente en el mundo [8]. Afortunadamente, el número de nuevos casos de infecciones por VIH en mujeres está descendiendo. Sin embargo, este dato positivo no aplica para mujeres mayores de 55 años, quienes han aumentado el número de nuevos diagnósticos de VIH en algunos países como Estados Unidos [10]. En la

actualidad, el perfil de personas infectadas por VIH se ha desplazado hacia una tendencia de mayor edad [11, 12]. Estos datos podrían ser justificados por los siguientes factores:

- Aumento en el número de personas mayores de 50 años que viven con el VIH:
  - El propio envejecimiento está vinculado con la pérdida de funciones a nivel celular y tisular, incrementando la susceptibilidad y el riesgo de infección por VIH [11, 13].
  - El avance en las terapias antirretrovirales (ART, *antiretroviral therapy*) ha incrementado la calidad y esperanza de vida en las personas infectadas con VIH [11].
- Aumento en el número de nuevos diagnósticos de VIH en personas mayores de 50 años:
  - El estigma anticipado ha sido reportado por numerosos estudios como una de las causas por las que las personas no acceden a someterse a pruebas de VIH. El prevalente discurso moral en países como Kenia o Uganda acerca de que el VIH es una infección que se asocia con la prostitución o el adulterio, resulta en un estigma anticipado que incluye el ridículo público, murmuración o la exclusión social. Este estigma afecta particularmente a las mujeres, quienes además de sufrir el estigma de manera propia, también se pueden ver afectadas por el de las parejas, quienes limitan en ocasiones el acceso de la mujer a cualquier atención relacionada con el VIH por temor a ser asociados con alguien VIH positivo [14]. Las personas mayores también son un grupo que se destaca por sentir vergüenza y miedo a ser testado [15].
  - En consultas médicas no siempre se piensa en testar a las personas mayores para el VIH. Este hecho repercute en una falta de acceso a servicios y asistencia sanitaria de alta calidad. Para cuando estas personas son diagnosticadas de VIH, el virus podría estar en estadios más avanzados de la infección y que la enfermedad haya progresado a SIDA [13, 15].



**Ilustración 2. Mapa de prevalencia del VIH en mujeres mayores de 15 años en 2021.**

Imagen tomada de la web <https://ourworldindata.org/hiv-aids> con datos proporcionados por el Programa Conjunto ONUSIDA, 2023 [8, 9].



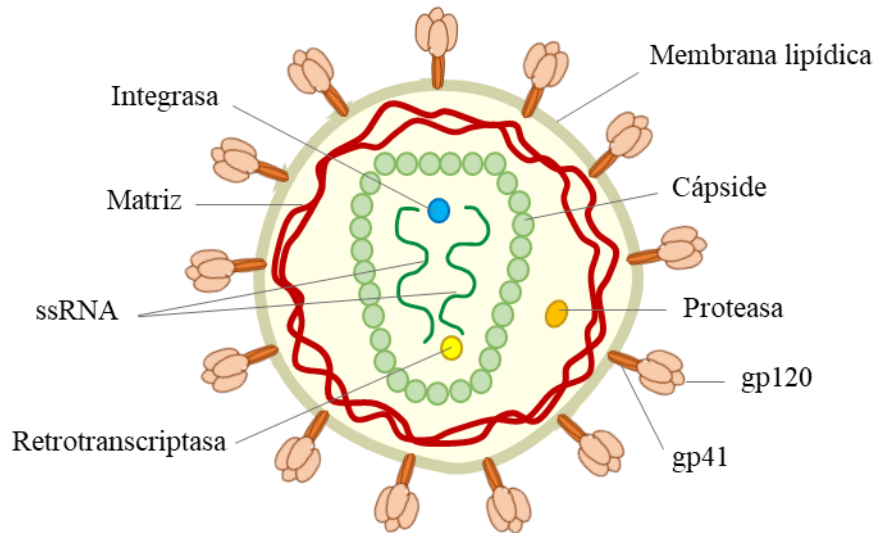
A pesar de que las mujeres componen más de la mitad de las personas infectadas por VIH en el mundo, su representación en los estudios y ensayos clínicos es muy baja [16], excluyendo especialmente a mujeres mayores y a mujeres embarazadas, la cuales son objeto de estudio principalmente para prevenir la transmisión materno-fetal [12, 16-18]. Las mujeres constituyen sólo el 19.2% de los participantes en los estudios sobre fármacos antirretrovirales para el tratamiento del VIH, y el 11.1% en los estudios relacionados con la búsqueda de una cura. Esto podría deberse a que la mayoría de las investigaciones sobre el VIH y los sujetos de estudio (73%) proceden de países de Norteamérica y Europa, donde las mujeres están infrarrepresentadas en comparación con la población total de personas infectadas por VIH en el mundo [16, 17]. Esta baja representación de mujeres en la investigación sobre el VIH conlleva consecuencias muy negativas para este sector, por ejemplo, a pesar de que en 2015 la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó el uso de la terapia oral antirretroviral con fines preventivos para cualquier persona en riesgo de infección por VIH, más adelante se demostró que la efectividad de este tratamiento era alta para hombres que mantenían relaciones sexuales con hombres, pero no para otros grupos, como las mujeres [19].

### 3. Estructura del VIH

El VIH es un lentivirus que pertenece a la familia de los retrovirus, con una estructura que consiste en una envoltura, matriz y dos copias idénticas de ARN de cadena sencilla (ssRNA, *single stranded RNA*) que se encuentran rodeadas por una cápside (p24) [20, 21]. Cada virión de VIH mide aproximadamente 100-120 nm de diámetro y se caracteriza por la presencia de los genes estructurales *gag*, *pol* y *env* [21]:

- El gen *gag* codifica para las proteínas estructurales del núcleo (p24, p7, p6) y la matriz (p17).
- El gen *env* codifica para las glucoproteínas de la envoltura gp120 y gp41, las cuales son reconocidas por los receptores de membrana de las células diana.
- El gen *pol* codifica para las enzimas necesarias para la replicación, las cuales son la retrotranscriptasa (p55/66), la endonucleasa o integrasa (p32) y la proteasa (p10, p12 o p15) (Ilustración 3) [21, 22]

Además de estas proteínas, el VIH cuenta con la presencia de genes accesorios y regulatorios implicados en la modulación de la replicación. Entre los genes regulatorios, encontramos los genes *tat* y *rev*. El gen *tat* codifica para la proteína Tat, una de las proteínas que aparece más temprano durante el proceso de transcripción del provirus del VIH-1, cuya función es promover la expresión de los genes del virus; mientras que el gen *rev*, que codifica para la proteína Rev, facilita la exportación del material genético desde el núcleo hasta el citoplasma [21-23].



### Ilustración 3. Estructura del VIH.

Dibujo representativo del VIH donde se muestra su material genético (ssRNA), proteínas de la envoltura viral (gp120, gp41), membrana lipídica, matriz, cápside y enzimas para la replicación (proteasa, integrasa y retrotranscriptasa).

Entre las proteínas accesorias, encontramos Nef, Vif, Vpr y Vpu y Vpx. Nef está involucrada en varias funciones, entre las que destacamos su capacidad para regular a la baja la expresión del receptor CD4 en las células infectadas [24, 25]; Vpr incrementa la producción de virus en macrófagos primarios y linfocitos T; Vpu es necesaria para la correcta liberación de la partícula viral y Vif aumenta la infectividad [22].

Existen dos tipos de VIH: VIH tipo 1 (VIH-1) y VIH tipo 2 (VIH-2). El VIH-1 es el principal causante de SIDA en el mundo, y VIH-2 se restringe a algunas regiones del oeste y centro África [22].

Las principales diferencias entre VIH-1 y VIH-2 son:

- Ambos tipos de VIH presentan genes estructurales; sin embargo, se diferencian en la organización: VIH-1 manifiesta la presencia de *Vif*, *Vpr* y *Vpu*, mientras que VIH-2 *Vif*, *Vpx* y *Vpr*. Vpx se caracteriza por incrementar la replicación del VIH-2.
- A pesar de que ambos causan SIDA, la enfermedad en el sistema nervioso central es más frecuente en la infección por VIH-2.
- VIH-2 es menos virulento que VIH-1 y la infección tarda más en progresar a SIDA [22].

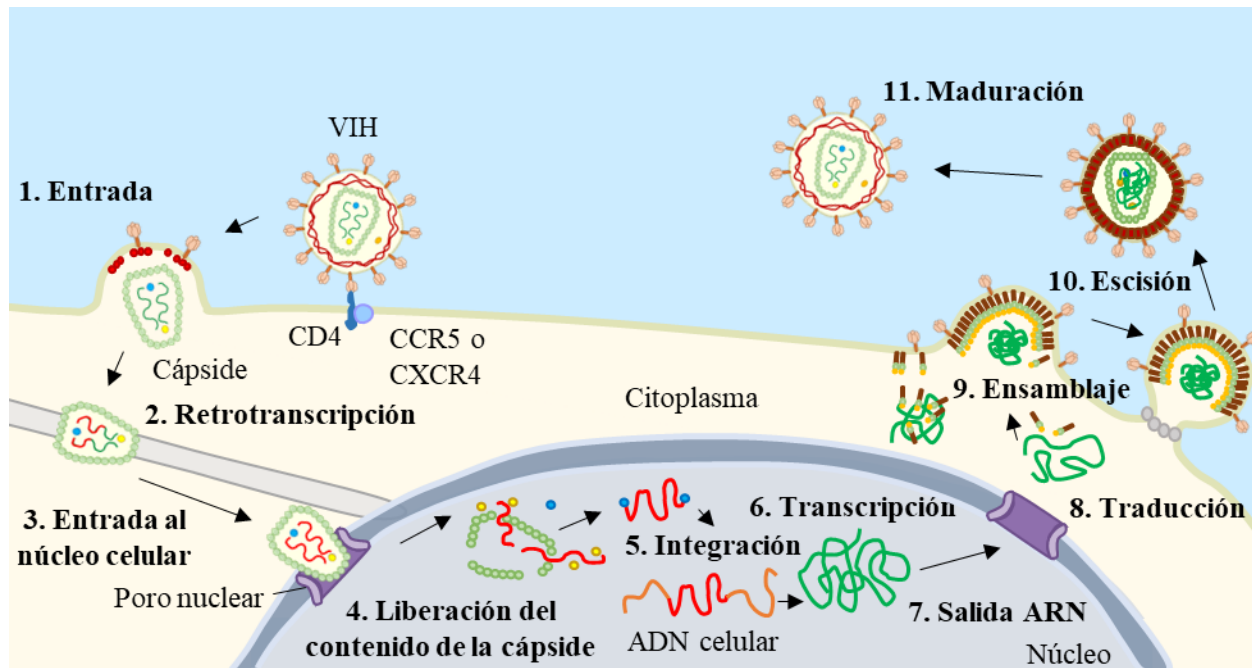
## 4. Ciclo de replicación del VIH

El ciclo de replicación del VIH comienza con la unión de gp120 y gp41 a la membrana celular. En primer lugar, la proteína gp120 establece dos uniones con la célula diana u hospedadora: una unión de alta afinidad con la molécula de superficie CD4, y otra a un correceptor de quimiocinas, que puede ser CCR5 o CXCR4 [20]. Las variantes de VIH que utilizan el correceptor CCR5 se denominan como R5, y las que usan el correceptor CXCR4, X4. Aunque ambas variantes se presentan en los fluidos corporales, la VIH R5 es entendida como la principal variante que media la transmisión y establece infección en las mucosas genitales y anales. La variante VIH R5 domina los estadios más tempranos; mientras que la variante VIH X4 se ve involucrada en los más tardíos, cuando la infección progresa [26, 27]. Una vez establecido este primer contacto entre gp120 y los receptores celulares, la proteína gp41 interacciona promoviendo la fusión entre la envoltura vírica y la membrana plasmática celular [20].

Tradicionalmente, se pensaba que una vez ocurría la fusión, se vertía el contenido de la cápside en el citoplasma celular y comenzaba el proceso de retrotranscripción. Sin embargo, recientes avances en el campo han demostrado que, tras la fusión, se inserta la cápside intacta en el citoplasma. Una vez en el citoplasma, la cápside viaja a través de una red de microtúbulos hasta alcanzar los poros nucleares. Debido a que el tamaño de la cápside es mayor que el de los poros nucleares, la cápside necesita interactuar con proteínas y factores celulares que faciliten el acoplamiento a los poros nucleares y el consecuente transporte al interior del núcleo celular. Una vez en el núcleo celular, otras proteínas celulares median la liberación del contenido de la cápside. Durante este trayecto, dentro de la cápside, la enzima retrotranscriptasa comienza a retrotranscribir el ARN viral en ADN proviral de doble cadena, y finaliza el proceso en el interior del núcleo. La completa retrotranscripción desencadena el desprendimiento de la cápside para así liberar el ADN viral que, con la ayuda de la integrasa, se integra en el ADN celular [28].

Una vez integrado el ADN, la propia maquinaria de la célula hospedadora transcribe el ADN proviral en ARN mensajero, el cual es exportado hasta el citoplasma para ser traducido en las proteínas virales [20]. Los genes *pol* y *gag* codifican para las proteínas precursoras Pol y Gag que, tras ser escindidas con la ayuda de la proteasa viral, formarán el núcleo de la partícula de VIH; mientras que el gen *env*, formará las glucoproteínas de la envoltura viral, sintetizando el precursor molecular gp160 que, una vez cortado por las proteasas virales, da lugar a gp120 y gp41 [22]. Una vez sintetizados los componentes del virus, éstos son reclutados a sitios específicos de la membrana plasmática. La proteína Gag une a uno de sus extremos el material genético del VIH, para unirlo con la membrana plasmática a través de su otro extremo. La acumulación de proteínas Gag en la membrana plasmática induce la formación de una protuberancia de la membrana, formando una estructura esférica. En este punto, unas proteínas conocidas como ESCRT

escinden el cuello de la membrana plasmática para liberar al medio extracelular el virión inmaduro y comenzar con el proceso de maduración. Durante esta última etapa, las proteasas del VIH separan las proteínas Gag liberando el resto de las proteínas para su correcta reorganización en los distintos compartimentos del virus (Ilustración 4) [22, 29, 30]. A diferencia de las células T, cuando la célula infectada es un monocito o macrófago, los viriones se acumulan en vacuolas intracelulares que después son liberadas [22].



**Ilustración 4. Ciclo de replicación del VIH.**

Representación del proceso de infección del VIH. El VIH entra en el interior de las células diana tras establecer un contacto con CD4 y CXCR4/CCR5 que permite la fusión y liberación de la cápside en el interior de la célula. Una vez dentro, en la cápside comienza la retrotranscripción del ARN del virus a ADN, mientras ésta viaja hasta el núcleo celular con la ayuda de poros nucleares. En el núcleo celular, se produce la integración del ADN viral en el ADN celular. A continuación, el ADN se transcribe, se libera al citoplasma y se traduce, produciendo también las proteínas codificadas en el genoma del virus. Por último, se produce el ensamblaje del virión inmaduro, escisión y liberación al medio extracelular y maduración.

## 5. Vías de transmisión y tratamientos

El VIH se encuentra en fluidos corporales (sangre, leche materna, semen, o por secreciones vaginales, rectales o presemiales) y se adquiere a través del intercambio de éstos con una persona infectada [7]. Las principales vías de transmisión son por contacto sexual (vía de transmisión predominante para mujeres y hombres a nivel global), por transmisión materno-fetal, durante el embarazo o parto, o por el uso compartido de instrumentos de inyección tales como jeringuillas [31].

Actualmente, no existe cura para el VIH. Sin embargo, existen terapias antirretrovirales que reducen la carga viral en las personas infectadas por VIH, frenando el proceso de replicación viral, la aparición de síntomas y reduciendo el riesgo de transmisión [7].

El uso de las terapias antirretrovirales se aplica para tres propósitos principales: 1) para reducir la infectividad en personas VIH positivas, 2) para prevenir la infección en individuos VIH negativos cuando se usa como profilaxis posterior a la exposición (PEP, *post-exposure prophylaxis*) a fluidos infectados con VIH, y 3) para prevenir la infección en individuos VIH negativos que se encuentran en alto riesgo de contagio cuando se administra como profilaxis de preexposición (PrEP, *pre-exposure prophylaxis*) [32].

### **5.1. Tratamientos de prevención del VIH**

Una de las estrategias centrales para evitar la expansión del VIH se basa en el uso de la PrEP. La PrEP fue aprobada por primera vez en Estados Unidos por la Agencia Reguladora de Alimentos y Medicamentos (FDA, *Food and Drug Administration*) en 2012, aceptando el uso oral de Truvada (emtricitabina y tenofovir disoproxil fumarato) en adultos VIH negativos en riesgo de infección; y cuatro años más tarde se aprobó por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*) [1, 33]. La PrEP se compone de una combinación de inhibidores de la retrotranscriptasa, siendo la combinación oral de tenofovir y emtricitabina la más común, que se caracteriza por requerir una administración diaria [34]. Sin embargo, a pesar de que su función preventiva demostró resultados exitosos en hombres, en mujeres su eficacia es menos clara [35-37]. La administración oral de la PrEP mostró eficacia en ensayos clínicos que incluían mujeres y hombres heterosexuales, pero los resultados no se estratificaron por género. La realización de ensayos clínicos que únicamente incluían mujeres no mostró efectos protectores tras la administración oral de la PrEP [36, 38-41]. Esta falta de protección se observó al suministrar tenofovir tanto en su forma tópica como oral, con la excepción del ensayo CAPRISA 004, que demostró una protección parcial tras la administración de tenofovir en gel antes y después del contacto sexual. Otro ensayo también demostró protección parcial frente al VIH mediante el uso del anillo vaginal Dapivirine. Actualmente, la terapia antirretroviral con fines preventivos en mujeres se está focalizando en el desarrollo de métodos alternativos que supongan una administración local en el aparato genital femenino, como anillos vaginales o geles, o el uso de implantes subcutáneos [36].

Los últimos avances en PrEP han concluido con el desarrollo del primer inyectable de acción prolongada, aprobado tanto para hombres como para mujeres. Este nuevo método de administración se ha diseñado para ser aplicado en forma de inyecciones intramusculares cada dos meses. El contenido del inyectable se compone de cabotegravir, un inhibidor de la enzima integrasa. Hasta día de hoy, este tratamiento de acción prolongada ha demostrado mejores resultados de efectividad que la administración

oral, puesto que uno de los principales inconvenientes de la posología oral era la adherencia o continuidad al tratamiento. [34]

Además de la PrEP, existen tratamientos que previenen la infección por VIH una vez el individuo se ha expuesto al virus. Este tipo de tratamiento se conoce como profilaxis post-exposición o PEP y se administra dentro de las 72h posteriores a la exposición al VIH. La PEP consiste en un tratamiento combinado de uno o más inhibidores de la retrotranscriptasa y de uno o más inhibidores de la proteasa, que se administran con el fin de bloquear la replicación del virus antes de que el material genético del VIH se integre en el ADN de la célula diana u hospedadora, momento en el cual la infección ya es irreversible [42, 43].

## 5.2. Tratamientos del VIH

El primer medicamento antirretroviral utilizado para el tratamiento de la infección por VIH fue un inhibidor de la retrotranscriptasa, conocido como zidovudine o AZT, aprobado en 1987 [44-46]. Sin embargo, el índice de letalidad se mantuvo alto hasta que surge el concepto de terapia antirretroviral altamente activa (HAART, *highly active antiretroviral therapy*) a mediados de los 90s, una terapia que consiste en la administración oral combinada de varios medicamentos que hacen frente al VIH a través de diferentes de mecanismos de acción [44].

A pesar de que la administración de la HAART consiguió reducir a la mitad el número de muertes por infección por VIH, surgieron nuevos problemas como efectos secundarios, desarrollo de resistencia a los fármacos, o las múltiples tomas al día generaban dificultades para mantener una adherencia al tratamiento prolongada en el tiempo [44]. En el año 2007, se realiza un gran avance terapéutico y se aprueba en España el uso de la combinación de varios inhibidores de la retrotranscriptasa (tenofovir disoproxil fumarato, emtricitabina y efavirenz) como primer régimen de comprimidos en una única toma diaria [44, 47]. A partir de ese momento, se referencia a las terapias antirretrovirales combinadas como cART, en lugar de HAART. La eficacia de la cART incrementó de un 43% a mitad de los 90s a un 78% en 2010, donde se midió su capacidad para mantener la carga viral indetectable durante un mínimo de 48 semanas en aquellos pacientes con menos de 100 000 copias/ml al inicio del tratamiento [44, 48].

La terapia combinada con al menos 3 antirretrovirales diferentes es el tratamiento estándar que se utiliza a día de hoy en personas infectadas con VIH. Existen numerosas combinaciones que actúan sobre diferentes pasos del proceso de replicación del VIH: inhibidores de proteasas, inhibidores/antagonistas de correceptores, inhibidores de la fusión, inhibidores de la retrotranscriptasa e inhibidores de la integrasa [44]. Aunque estas terapias combinadas han avanzado y mejorado su acceso y tolerancia a lo largo de los últimos años, aún persisten los problemas de resistencia y adherencia al tratamiento [49]. Se ha demostrado que,

altas ratios de adherencia a la terapia antirretroviral son esenciales para conseguir una supresión viral y, por lo tanto, evitar la transmisión del VIH [49, 50]. Múltiples estudios han publicado que la adherencia a la terapia antirretroviral varía desde un 27% a un 80% dependiendo de la población que se estudie [49, 51].

Con el objetivo de solventar los problemas de tolerancia y adherencia al tratamiento, se aprueba, en 2020 por la EMA [52, 53] y en 2021 por la FDA [54], una combinación de un inhibidor de la enzima integrasa (cabotegravir) en combinación con un inhibidor de la retrotranscriptasa (rilpivirina) en preparación para inyección intramuscular. Esta combinación es de acción prolongada, permitiendo su administración cada dos meses [55]. Un ensayo clínico con 133 pacientes contagiados por VIH demostró que la administración intramuscular de acción prolongada de cabotegravir + rilpivirina consigue una supresión vírica en el 98.5% de la cohorte. Entre los participantes, 76 pacientes ya mostraban supresión vírica antes de comenzar el tratamiento intramuscular gracias al uso de la terapia antirretroviral oral, pero 57 de ellos sí presentaban carga viral detectable debido a problemas de adherencia al tratamiento oral. Todos los participantes, excepto dos pacientes que mostraban niveles de carga vírica antes de empezar el tratamiento intramuscular, consiguieron presentar una carga indetectable en una media de 26 semanas [54].

Los últimos avances en terapias inyectables de acción prolongada están estudiando el desarrollo de Lenacapavir, un inhibidor de la cápside del VIH que se administra una vez cada 6 meses por inyección subcutánea. Este tratamiento está aún en fase II/III de varios ensayos clínicos (CAPELLA, CALIBRATE, PURPOSE 1 y PURPOSE 2); sin embargo, su uso se aprobó en Europa el 22 de agosto de 2022 para administrarlo, en combinación con otros antirretrovirales, en aquellos adultos que presentan resistencia a múltiples tratamientos para el VIH y que no tienen alternativas terapéuticas para suprimir la carga viral [56].

## **6. Factores de riesgo para la adquisición de VIH en mujeres**

Los factores que exponen a las mujeres a un mayor riesgo de infección por VIH se pueden dividir en factores biológicos y factores socioeconómicos.

### **6.1. Factores biológicos**

La transmisión sexual es la vía más común de adquisición del VIH para hombres y mujeres [57]. Dependiendo del tipo de relación sexual, el riesgo de infección por VIH varía. Un análisis de varios estudios estimó que el riesgo de contraer VIH a través de sexo anal receptivo era el más alto (1.4%, 1 transmisión por cada 71 exposiciones), independientemente de si el receptor es hombre o mujer [58]. Sin embargo,

cuando la relación sexual anal es insertiva, el riesgo de contagio es de 0.11% (1 transmisión cada 909 exposiciones) para hombres circuncidados y de 0.62% (1 transmisión por cada 161 exposiciones) para hombres no circuncidados [59]. De modo interesante, cuando la relación es heterosexual, se estima que el riesgo de transmisión por sexo vaginal receptivo es del 0.08% (1 transmisión por cada 1 250 exposiciones), mientras que a través de sexo vaginal insertivo es del 0.04% (1 transmisión por cada 2 500 exposiciones) [60]. Estos porcentajes pueden verse aumentados cuando se alteran las condiciones fisiológicas. A continuación, mencionamos los principales factores que pueden comprometer y facilitar el contacto del VIH con las células dianas que se encuentran en el aparato genital:

- **Disrupción de la barrera epitelial.** El aparato genital femenino está protegido por una barrera física compuesta por células epiteliales y células estromales, también definidas como fibroblastos especializados, que lo delimita del medio exterior. Bajo esta estructura de protección, se encuentran células del sistema inmunológico, entre ellas células diana para el VIH como células T, macrófagos y células dendríticas [36, 61]. Cualquier mecanismo que vulnere la estabilidad de la barrera epitelial, aumenta la posibilidad de acceso del VIH a las células diana y, por tanto, una oportunidad para infectar. Algunos de estos mecanismos disruptivos se producen durante el contacto sexual, ya que se producen microabrasiones en la mucosa genital femenina en más del 50% de las relaciones sexuales consentidas [36, 62, 63]. Además, el VIH puede atravesar la barrera epitelial mediante mecanismos de difusión. En el epitelio estratificado, utiliza la ausencia de uniones estrechas entre células de las capas más apicales para traspasar la barrera, y en el epitelio columnar, el VIH induce mecanismos de relajación entre las células epiteliales para poder atravesarlo [36, 64, 65]. Curiosamente, a pesar de que las células epiteliales no se han descrito como células diana para el VIH, se ha demostrado que la expresión de receptores y correceptores para el VIH en la membrana de las células epiteliales, permiten la entrada del VIH al medio intracelular y la liberación de viriones con capacidad de infectar [66-69].
- **Alteración en el microbioma vaginal e inflamación.** El aumento de citoquinas y quimioquinas inflamatorias en las secreciones vaginales ha sido asociado con un mayor riesgo de adquisición del VIH [70-72]. La inflamación genital incrementa el riesgo de contraer el VIH debido a que un ambiente proinflamatorio compromete la barrera epitelial [64, 73, 74] y favorece el reclutamiento o activación de las células diana para el VIH [75-78]. El microbioma vaginal es considerado un regulador clave de la inflamación genital y, por tanto, está vinculado con el riesgo de infección por VIH [76, 78]. Múltiples estudios sobre la composición bacteriana en el tracto genital femenino coinciden al afirmar que un microbioma vaginal con una población dominante de *Lactobacillus* proporciona protección antimicrobiana y un ambiente acidificado y antiinflamatorio [79-81]. No obstante, mientras *Lactobacillus crispatus* protege frente la inflamación genital y adquisición del



VIH, *Lactobacillus inners* no confiere protección [72, 78]. Por el contrario, los microbiomas vaginales en los que *Lactobacillus* no es el género dominante se caracterizan por generar ambientes tisulares no óptimos, con una alta diversidad bacteriana, inflamación y mayor riesgo de infección por VIH [82]. El desequilibrio más común en los niveles de bacterias en el microbioma vaginal durante el periodo reproductivo se conoce como vaginosis bacteriana [79]. En la mayoría de las mujeres, la vaginosis bacteriana cursa de forma asintomática. Sin embargo, se ha demostrado que esta disbiosis puede resultar en inflamación y en un mayor riesgo de adquisición del VIH [76, 78]. Recientemente, un estudio publicó que las mujeres con vaginosis bacteriana mostraban propiedades adhesivas reducidas y el VIH presentaba una mayor motilidad en el moco cervical en comparación con mujeres sanas [83]. Este incremento en la motilidad del VIH se detectó también en mujeres con una microbiota donde *Lactobacillus inner* era el género dominante, la cual evoluciona frecuentemente a vaginosis bacteriana [72, 83]. Otro estudio demostró que las secreciones cervicovaginales de las mujeres con vaginosis incrementan la transmigración del VIH *in vitro*. Esto se debe a un incremento de las metaloproteasas en las secreciones vaginales de mujeres con vaginosis bacteriana y podrían ser revertidas con inhibidores de metaloproteasas [84]. De manera importante, la composición del microbioma vaginal cambia a lo largo del ciclo de vida reproductivo de las mujeres [85]. Durante la infancia, el microbioma vaginal es altamente diverso y evoluciona a un microbioma dominado por el género *Lactobacillus* durante la pubertad y los años reproductivos, dominio que disminuye significativamente tras la menopausia. Esta disminución se debe probablemente a los efectos hormonales en la acumulación de glucógeno en las células epiteliales del tracto vaginal, una importante fuente nutricional para el género *Lactobacillus* [86-88].

## 6.2. Factores socioeconómicos

La desigualdad de género y las normativas sociales resultan en una mayor prevalencia de infección por VIH en mujeres de muchos países. Las mujeres están expuestas a un riesgo más alto de infección por VIH cuando (1) tienen un papel limitado en la toma de decisiones y protección durante las relaciones sexuales, (2) cuando la tasa de educación sexual es baja y (3) las tasas de sexo transaccional son altas.

- **Abuso y violencia sexual.** Las estimaciones publicadas por la OMS indican que, a nivel mundial, 1 de cada 3 mujeres (30%) ha experimentado alguna vez a lo largo de su vida violencia física y/o sexual por parte de una pareja íntima, o violencia sexual por parte de alguien que no es su pareja [89]. En países con alta prevalencia de infección por VIH, como en regiones del África

subsahariana, se ha demostrado que las diferentes formas de violencia de pareja (física, sexual y psicológica) aumentan la susceptibilidad al VIH y la progresión de la enfermedad entre las mujeres y niñas. Además del riesgo de exposición al VIH, la violencia y el trauma pueden provocar recuentos más bajos de CD4, cargas virales más altas y una menor adherencia a la prevención y el tratamiento [90-92]. En estas regiones, las mujeres que han sufrido violencia física o sexual por parte de su pareja tienen 1.5 veces más probabilidades de contraer el VIH que las mujeres que no han sido expuestas a este tipo de violencia [89].

- **Acceso limitado a educación y educación sexual.** Las nuevas infecciones por VIH entre chicas/mujeres adolescentes y jóvenes son substancialmente más altas que entre chicos/hombres de la misma edad [93]. Se ha demostrado que un mayor rendimiento educativo entre mujeres y niñas está relacionado con mejores resultados en materia de salud reproductiva y sexual. Además, se ha demostrado una correlación directa entre el nivel educativo de mujeres y niñas y el riesgo de contraer el VIH: las niñas sin educación tienen el doble de probabilidades de contraer el VIH que aquéllas que han asistido a la escuela [94]. En un estudio realizado en Irán, un grupo de mujeres participantes en el estudio apenas conocía sus derechos sexuales y no habían recibido ninguna educación en este ámbito. En esta investigación muchas conocieron por primera vez el concepto de violencia sexual [95].
- **Pobreza.** Las mujeres con mayores índices de pobreza suelen verse forzadas a adoptar comportamientos que incrementan el riesgo de infección por VIH, como por ejemplo: el sexo transaccional e intergeneracional, el matrimonio precoz y las relaciones que las exponen a la violencia y el abuso. Las mujeres más pobres y con menor nivel educativo pueden tener menos conocimientos sobre los riesgos y, por lo tanto, ser menos capaces de adoptar conductas para reducir el riesgo de contagio por VIH [96].
- **Sexo transaccional.** Las relaciones sexuales entre mujeres jóvenes y hombres mayores son comunes en muchas partes del mundo, con niveles particularmente altos tanto en África oriental y meridional como en África occidental y central. En muchos casos, estas relaciones son de naturaleza transaccional, caracterizándose por ser relaciones sexuales no comerciales y no matrimoniales motivadas por la suposición implícita de que el sexo se intercambiará por apoyo material u otros beneficios como comida, protección o estatus social.

## 7. Patogenia de la infección VIH en el aparato genital femenino

Como ya hemos definido en apartados anteriores, la vía más común de adquisición de VIH en mujeres es la transmisión sexual. Por tanto, el tracto genital femenino constituye uno de los principales portales de entrada para el VIH en mujeres [97].

El aparato genital femenino se divide en tracto inferior y tracto superior. El tracto inferior está compuesto por la vagina y el ectocérvix y está protegido por un epitelio escamoso estratificado, que se compone de células epiteliales superficiales, intermediarias y basales. El grosor del epitelio escamoso se mantiene constante en las mujeres durante el ciclo menstrual. Por el contrario, el tracto superior, que se compone por el endocérvix, el endometrio, las trompas de Falopio y los ovarios, está recubierto por un epitelio columnar en monocapa. En el endometrio, las células epiteliales columnares proliferan durante el ciclo menstrual y forman glándulas en la fase secretora. La zona de transformación es el lugar donde el epitelio columnar del tracto superior contacta con el epitelio escamoso del tracto inferior. Sobre la superficie epitelial del tracto inferior y el endocérvix hay moco, cuya consistencia varía a lo largo del ciclo menstrual y se vuelve espeso y viscoso en la fase secretora. Además, también podemos encontrar una población de bacterias que, en condiciones fisiológicas, predominan principalmente el género *Lactobacillus*, generando un pH ácido en el tracto inferior. Bajo el epitelio, encontramos una capa densa de células estromales o fibroblastos especializados que se intercalan con una alta presencia de células inmunitarias que se distribuye de forma diferente dependiendo del tipo celular [61, 98]. Dentro de las células susceptibles de ser infectadas por el VIH, encontramos que las células T son los leucocitos más abundantes en el tracto genital superior e inferior [36, 99-101], y se localizan en el estroma subepitelial, dentro del epitelio y en la superficie mucosa [36, 102, 103]. Los macrófagos son más abundantes en el endometrio que en el cérvix [36, 104]. Las células dendríticas se distribuyen a lo largo del tracto genital femenino, mostrando predisposición por el endometrio el subconjunto CD103+ [36, 105], o por la vagina las células dendríticas epiteliales que expresan CD1a+Langerin [36, 106]. Además de las células diana para el VIH, en el tracto genital femenino también encontramos otros tipos de células inmunológicas que no son susceptibles de ser infectadas, como los neutrófilos, las células *natural killer* (NK) o las células B. De todas ellas, los neutrófilos son los leucocitos más abundantes y están presentes tanto en el tracto genital inferior como en el superior (Ilustración 5) [36, 61].

Cuando la vía de transmisión del VIH es a través del coito, el VIH llega al tracto genital femenino mediante el semen. El papel que juega el semen en la infección por VIH *in vivo* no está claro: algunos estudios demuestran que presenta propiedades que potencian la infección, otros estudios manifiestan actividad inhibitoria y otros que no muestra efecto en la infección [107-110]. No obstante, el semen puede

también influir indirectamente en la susceptibilidad al VIH mediante la modulación de la función de la barrera epitelial y las células estromales [109, 111-114]. Un estudio reciente indicó que las vesículas extracelulares derivadas del plasma seminal de individuos infectados con VIH inducen perfiles transcripcionales proinflamatorios en las células del tracto genital femenino en comparación con las vesículas extraídas de hombres no infectados [115], lo cual sugiere que el semen de hombres infectados por VIH facilitaría la adquisición del VIH al potenciarse un ambiente proinflamatorio [36].

Como hemos visto anteriormente, la ratio de transmisión por contacto heterosexual en mujeres sin coinfecciones es baja (0.08%), sugiriendo la existencia de mecanismos locales de protección contra el VIH en la mucosa genital [60, 116]. A continuación, exploramos las funciones de las células que residen de forma natural en los distintos compartimentos del tracto genital femenino, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas; así como las diferencias entre la inflamación fisiológica y patológica [61].

### 7.1. Células epiteliales

En el tracto genital, las células epiteliales son las primeras células que se exponen a patógenos. Estas células tienen como función establecer una barrera física de protección en el aparato reproductor femenino, con una disposición característica dependiendo de la localización anatómica. En el tracto inferior, encontramos un epitelio escamoso estratificado; mientras que, en el tracto superior, la barrera epitelial se dispone como epitelio simple columnar [36, 61]. La zona de transición entre estos dos tipos de epitelios (entre el ectocérvix y el endocérvix) es considerada como una zona vulnerable para la infección por VIH, debido a la abundante presencia de células diana para el virus [27, 36, 117].

El grosor de la barrera epitelial varía a lo largo del ciclo menstrual dependiendo de los niveles de estradiol en algunas especies como los ratones [118] y los macacos [119], suponiendo la etapa de la ovulación el momento de mayor grosor en el epitelio vaginal [118] y la fase secretora la de mayor adelgazamiento [119]. En mujeres, un estudio demostró que los ensayos de infección con VIH *ex vivo* eran más eficientes cuando se realizaban sobre explantes cervicales cuando las mujeres se encontraban en la fase secretora del ciclo menstrual [120]. En las mujeres postmenopáusicas, la ausencia de secreción ovárica de estradiol está asociada con una atrofia del epitelio, y una disminución en la producción de moco, lo cual podría contribuir a un mayor riesgo de infección por VIH en este grupo de mujeres [27, 121, 122].

Además de las hormonas endógenas, el uso de hormonas exógenas también influye en la susceptibilidad a la infección por VIH [36]. El tratamiento anticonceptivo mejor estudiado en cuanto a riesgo de adquirir VIH es el basado en progestina, conocido como medroxiprogesterona (MPA) [123-125]. En relación con su efecto sobre las células epiteliales, un estudio demostró que la MPA induce un adelgazamiento del revestimiento superficial, lo que afecta negativamente a la integridad de la barrera

epitelial y, con ello, incrementaría el riesgo de infección por VIH [126]. No obstante, un ensayo publicó recientemente que la administración de MPA no incrementa el riesgo de adquisición de VIH. Sin embargo, estos datos deben interpretarse con cautela, puesto que el grupo al que se le administró el tratamiento con progesterona no se comparó con un grupo sin exposición a tratamientos hormonales [127].

Otro posible escenario relacionado con las hormonas exógenas es el uso de la terapia de reemplazamiento hormonal en mujeres postmenopáusicas, donde un estudio demostró que la administración *in vitro* de estradiol aumenta la fracción de células proliferativas en cultivos de endometrios explantados de mujeres posmenopáusicas [128].

Además de la función de barrera, las células epiteliales secretan moco vaginal, citoquinas y quimioquinas.

- **Producción de moco vaginal:** El moco vaginal se compone principalmente de unas moléculas de alto peso molecular y carga negativa que se conocen como mucinas (MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6), las cuales atrapan a los patógenos, impiden su acceso al epitelio y han demostrado tener actividad anti-VIH *in vitro* [36, 129-131]. Cuando los estrógenos inducen la secreción del moco (fase proliferativa y ovulación), éste es acuoso, fino y de baja densidad, lo cual facilita el movimiento del espermatozoide hasta el tracto genital superior; sin embargo, cuando la progesterona es la inductora de la secreción del moco (tras la ovulación y fase secretora), éste es denso y viscoso, con el objetivo de impedir cualquier transporte desde el tracto genital inferior al superior [132]. Recientemente, se ha descrito que el moco cervicovaginal impide la movilidad del VIH y, por tanto, incrementa la función de barrera en la mucosa genital [133].
- **Producción de citoquinas, quimioquinas y proteínas antimicrobianas:** Las células epiteliales producen citoquinas, quimioquinas y proteínas antimicrobianas y su secreción varía dependiendo de su localización en el tracto genital femenino y la exposición a hormonas sexuales [134]. Por ejemplo, los estrógenos suprimen la secreción de proteínas antimicrobianas como beta-defensina 2 o elafina por parte de las células epiteliales vaginales [135, 136]; sin embargo, incrementan la secreción de antileucoproteína 3 y beta-defensina 2 por parte de las células epiteliales uterinas [137]. Además, se demostró que la administración de estradiol sobre células epiteliales vaginales de una línea celular inhibió la expresión de ARN mensajero que codificaba para proteínas proinflamatorias tales como interleucina (IL)-1 $\alpha$  y el factor de necrosis tumoral (TNF, *tumoral necrosis factor*), sugiriendo que la inflamación y, por tanto, el flujo de células inmunológicas resultante de dicho ambiente proinflamatorio estaría reprimido justo antes de la ovulación, que es el momento más idóneo para la fertilización [138]. En otros estudios, las células epiteliales de la parte apical del útero de mujeres premenopáusicas, pero no de las postmenopáusicas, mostraron

actividad antimicrobiana dependiente de antileucoproteinasa frente bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [139], sugiriendo una menor protección frente a patógenos bacterianos en mujeres postmenopáusicas como resultado de la falta de estrógenos [98].

## 7.2. Microbioma genital

Un microbioma vaginal óptimo es aquél dominado por la especie *Lactobacillus*, que se caracterizan por ser bacterias productoras de ácido láctico, lo cual acidifica el pH vaginal y presenta propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas [79-81]. Sin embargo, como ya hemos comentado previamente, no todas las bacterias pertenecientes a *Lactobacillus* son igual de protectoras. *Lactobacillus crispatus* protege frente a la inflamación y la adquisición de VIH, pero *Lactobacillus iners* no [72, 78]. Además, alteraciones en el microbioma vaginal aumentando la diversidad de las especies bacterianas genera un ambiente inflamatorio y un mayor riesgo de adquisición de VIH [82].

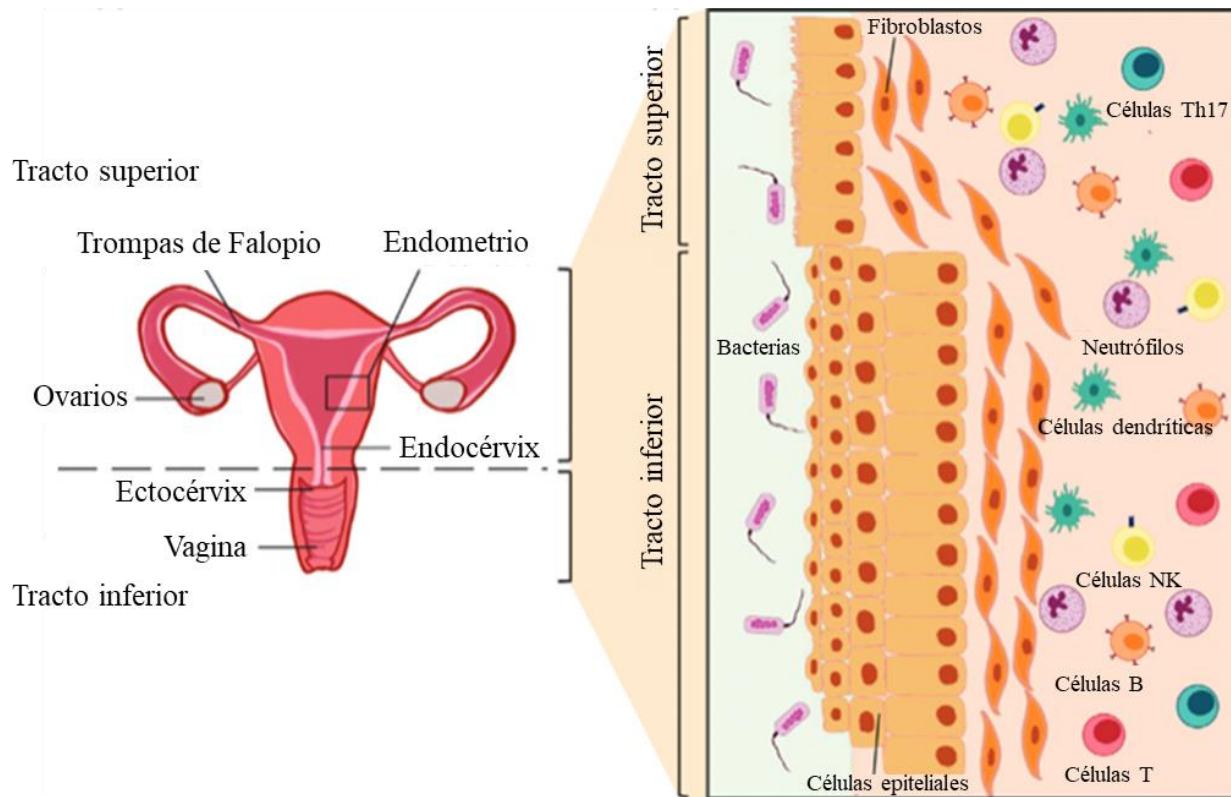
## 7.3. Células inmunológicas

Tras sobrevivir de manera exitosa a las secreciones, moco vaginal y la barrera epitelial, el VIH se encuentra en la mucosa con las células del sistema inmunológico. Este escenario presenta una dualidad en términos de infección por VIH: por un lado, se genera un ambiente ideal para que tenga lugar la infección, puesto que el VIH puede establecer contacto con las células diana (células T CD4, macrófagos, células dendríticas o células de Langerhans). Sin embargo, a su vez, también supone un entorno hostil para el VIH, ya que se encontrará con una respuesta inmunológica orquestada por múltiples tipos celulares, entre ellos, células inmunológicas innatas que no son susceptibles de ser infectadas, como los neutrófilos [61, 136].

El sistema inmunológico en el tracto genital femenino juega un papel único estableciendo un equilibrio entre la reproducción y la protección frente a infecciones. Para ello, y a diferencia de otras mucosas, tanto las poblaciones de células inmunológicas como las funciones llevadas a cabo en el tracto genital están especialmente reguladas por las hormonas sexuales y el ambiente tisular [98]. Además, el sistema inmunológico en el tracto genital está diferencialmente regulado dependiendo de la región anatómica a la que nos refiramos, contribuyendo al desarrollo de distintas funciones en cada sitio anatómico en cuanto a reproducción y defensa. Por tanto, la distribución de las células inmunológicas y las respuestas inflamatorias están controladas de diferentes maneras en cada uno de estos compartimentos para establecer las condiciones más óptimas para la reproducción [98].

La inflamación y el reclutamiento de células son factores esenciales para las funciones determinadas en el tracto genital, dónde incluimos: la menstruación, embarazo y la defensa frente a patógenos [98, 140-142]. Las moléculas y células que son necesarias para la función reproductiva, son las

mismas que están involucradas en la defensa frente a patógenos, incluyendo los procesos de protección y susceptibilidad a la infección por VIH [61]. Para prevenir la adquisición del VIH en mujeres, es imprescindible comprender las características de las células que residen de forma natural en los distintos compartimentos del tracto genital femenino, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas; así como las diferencias entre la inflamación fisiológica y patológica [61].



**Ilustración 5. Anatomía del aparato genital femenino y distribución de las células que lo componen.**

Representación del tracto genital femenino (imagen adaptada) [61]. En condiciones fisiológicas, los tejidos genitales sanos contienen células inmunológicas como los neutrófilos, las células dendríticas y las células T (subconjuntos Th CD8+ y CD4+). El epitelio sirve como barrera física e inmunológica, está recubierto de moco y sustenta un microbioma dominado por *Lactobacillus* con propiedades antiinflamatorias y anti-VIH.

## 8. Neutrófilos

En este trabajo, nos hemos centrado en el papel que juegan los neutrófilos en respuesta al VIH. Los neutrófilos son las primeras células en generar una respuesta frente a patógenos y su papel defensivo es crucial en la respuesta inmunológica innata [61]. Los neutrófilos representan el 10-30% de las células inmunitarias (CD45+) en la mucosa del aparato genital femenino bajo condiciones fisiológicas [98, 99], y están involucrados en funciones de remodelamiento tisular y protección, mostrando características

diferentes en comparación con los neutrófilos sanguíneos. El papel de los neutrófilos en la mucosa genital contrasta con su papel en otras mucosas, en las cuales los neutrófilos sólo están presentes cuando se generan ambientes inflamatorios [98, 99, 143-145].

Los neutrófilos son los leucocitos circulantes más abundantes en humanos (50-70%) y se identifican visualmente por presentar un núcleo segmentado de ~7-10  $\mu\text{m}$  de diámetro y un citoplasma rico en gránulos y vesículas secretoras. Estas se definen como células innatas, y se caracterizan por acudir rápidamente a los focos de infección, jugando un papel muy importante en la inflamación y en la protección del individuo. El reclutamiento de neutrófilos en sitios de infección es tan esencial que, un descenso en el número de neutrófilos en sangre resulta en una inmunodeficiencia crítica en humanos [146, 147].

Los neutrófilos tienen una vida media muy corta en humanos, siendo de 5 días aproximadamente cuando se encuentran en el torrente sanguíneo, por lo que son células con una alta tasa de recambio. Se producen diariamente en la médula ósea a partir del sistema mieloide hematopoyético y comparten múltiples características con otras células mieloides como los monocitos/macrófagos y los mastocitos. Una vez diferenciados, los neutrófilos se liberan a la circulación sanguínea y, desde ahí, pueden ser reclutados a zonas donde se haya producido un daño inducido por patógenos o por factores físicos [148, 149]. Durante periodos de infección, la tasa de producción de estas células puede incrementarse hasta 10 veces más, creando hasta  $10^{12}$  células al día [148].

A pesar de que los neutrófilos han sido históricamente considerados como una población celular homogénea con un fenotipo y función bien conservados, recientemente se ha demostrado que existe heterogeneidad entre los neutrófilos a través de la identificación de diferentes fenotipos, caracterizados por la expresión de un amplio rango de receptores de superficie que determinan su función, por ejemplo, la expresión de ICAM-1 (CD54) representa a la población de neutrófilos de tejido que han migrado en dirección retrógrada a través de las células endoteliales y han vuelto al torrente sanguíneo por trans migración inversa [150]. Publicaciones recientes revelaron la existencia de fenotipos y funciones diferentes entre neutrófilos de sangre y tejido [36]. Existen estudios en ratones que indican que la infiltración de neutrófilos en los tejidos induce cambios fenotípicos y funcionales que concluyen en la generación de subconjuntos de neutrófilos. Estos hallazgos sugieren que los neutrófilos residentes en tejidos podrían estar actuando como centinelas inmunitarios. La adquisición de fenotipos específicos de tejido apunta que los neutrófilos podrían estar diferenciándose a partir de las señales que reciben en el ambiente tisular. Es importante mencionar que estos perfiles de diversidad se han demostrado en ratones y que aún se conoce poco acerca de este fenómeno en neutrófilos humanos [151, 152].

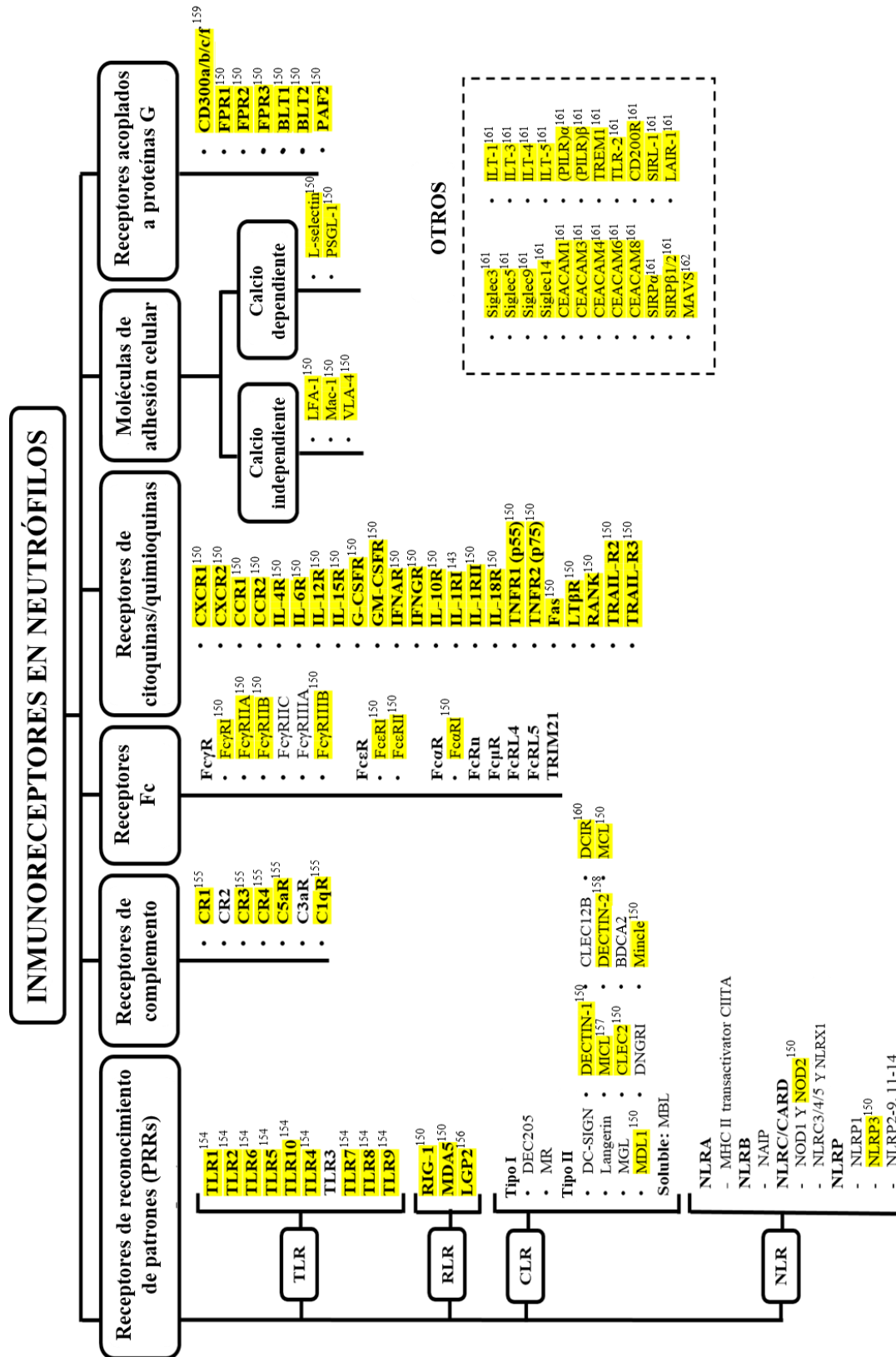


### 8.1. Mecanismos de reconocimiento de patógenos en neutrófilos

Como células del sistema inmunológico innato, los neutrófilos expresan receptores de reconocimiento de señales de alarma, tales como receptores de microorganismos (por ejemplo, TLRs), receptores que reconocen ambientes inflamatorios (por ejemplo, los receptores de citoquinas) y también receptores que permiten la comunicación con el sistema inmunológico adaptativo (por ejemplo, receptores Fc o receptores de complemento (CR, *complement receptor*) [147, 150]. La actividad antimicrobiana de los neutrófilos requiere de un eficiente reconocimiento de los patógenos a través de sus receptores. Estos receptores activan señales de transducción directas y, además, procesos de transducción de señales indirectos, los cuales no están directamente involucrados en el reconocimiento y eliminación de los microorganismos, sino que informan a las células adyacentes o promueven procesos adicionales como la quimiotaxis [147, 153].

Existen numerosos tipos de receptores presentes en las células del sistema inmunológico. Sin embargo, no todos se encuentran necesariamente presentes en todos los tipos celulares. A continuación, mostramos una lista de los receptores más comunes bajo nuestro conocimiento y, cuáles de ellos se han identificado en neutrófilos (Tabla 2):

Tabla 2. Inmunorreceptores expresados en neutrófilos humanos.



Recopilación de inmunorreceptores presentes en neutrófilos humanos (destacados en amarillo) [150, 154-162].

Debido a que el interés de esta tesis se enfoca en comprender las respuestas inmunológicas frente al VIH por parte de los neutrófilos, profundizamos el estudio de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, *pattern recognition receptors*). Estos receptores son los responsables de reconocer la presencia de microorganismos a través de la identificación de estructuras altamente conservadas en numerosas especies de patógenos. A estas estructuras se les conoce como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). No obstante, se ha descrito recientemente la capacidad de los PRRs a reconocer moléculas endógenas liberadas a causa de daño celular o tisular. Estas moléculas se conocen como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs *damage-associated molecular patterns*) [153, 163].

Los PRRs pueden encontrarse tanto en células inmunológicas como en células que no pertenecen al sistema inmunitario. Actualmente, existen cuatro clases de familias en el grupo de los PRRs: los receptores tipo Toll o TLRs, receptores de lectina tipo C (CLRs, *C-type lectin receptor*), receptores de tipo NOD (NLRs, *NOD-like receptor*) y receptores tipo RIG-I (RLRs, *retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors*). Estas familias incluyen tanto receptores de membrana como citosólicos [163].

De todos ellos, destacamos los TLRs. La familia de los TLRs está compuesta por 10 miembros en humanos (TLR1-TLR10) y, dependiendo del receptor al que nos refiramos, los encontraremos en la superficie celular o en compartimentos intracelulares como el retículo endoplasmático, el endosoma, el lisosoma o el endolisosoma [164]. En la siguiente tabla (Tabla 3), resumimos su localización, expresión en neutrófilos y el ligando y su origen para cada TLR [163, 165]:

**Tabla 3. Expresión de TLRs en neutrófilos y sus ligandos.**

TLR	Localización	Expresión en neutrófilos	Ligando	Origen del ligando
TLR1	Membrana plasmática	Baja	Triacil lipopéptidos	Bacteria
TLR2	Membrana plasmática	Intermedia	Lipoproteína	Bacteria, virus, parásito, propio
TLR3	Endolisosoma	Nula	dsRNA	Virus
TLR4	Membrana plasmática/Endolisosoma	Baja	LPS	Bacteria, virus, propio
TLR5	Membrana plasmática	Alta	Flagelina	Bacteria
TLR6	Membrana plasmática	Intermedia	Diacil lipopéptidos	Bacteria, virus
TLR7	Endolisosoma	Baja	ssRNA	Virus, bacteria, propio
TLR8	Endolisosoma	Baja	ssRNA	Virus, bacteria, propio
TLR9	Endolisosoma	Alta	Motivos CpG-ADN	Virus, bacteria, protozoos, propio
TLR10	Membrana plasmática	?	Colabora con TLR2 para reconocer <i>Listeria</i> . TLR10 puede reconocer Influenza A	

*CpG: Dinucleótidos que contienen citosina y guanina; ssRNA: ARN de cadena sencilla*

No obstante, es importante señalar que las respuestas inmunológicas no dependen únicamente de los receptores estimulados, sino también de la naturaleza del estímulo inicial que induce la activación del receptor y su localización en el organismo [153].

Independientemente de los múltiples subconjuntos de tipos de neutrófilos que podemos encontrar, el papel principal de estos leucocitos es la defensa del hospedador frente a microorganismos invasores. En términos generales, los neutrófilos locales responden rápidamente a la infección o daño tisular y, los neutrófilos circulantes o sanguíneos migran hacia las áreas inflamadas o dañadas [146, 147, 150].

## 9. Mecanismos de defensa de los neutrófilos

Los neutrófilos realizan su función de defensa a través de diversos mecanismos: generación de especies reactivas del oxígeno, degranulación, fagocitosis o la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos o NETs [166].

### 9.1. Producción de ROS

Los neutrófilos son los mayores productores de ROS. Estos oxidantes se generan a través de la activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa (NOX2 en fagocitos) o por acción de la mieloperoxidasa (MPO) con el principal objetivo de destruir microorganismos [167].

- El complejo NOX2 se encuentra en las membranas y cataliza la transferencia de electrones de NADPH a moléculas de oxígeno. Esta reacción genera la liberación de aniones superóxido a través del complejo NOX2, con un flujo direccional en el que las moléculas de NADPH están siempre en el citosol. Por tanto, cuando NOX2 se encuentra en la membrana plasmática, los radicales superóxido se liberan al medio extracelular, pero cuando el complejo enzimático se encuentra en las membranas de los fagosomas, los radicales se liberan dentro de vesículas. Los aniones superóxido actúan como precursores del peróxido de hidrógeno y otras especies reactivas del oxígeno generadas a partir del grupo hemo de la MPO [167].
- La MPO utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un amplio espectro de sustratos para convertirlos en productos reactivos. Estos productos se conocen como oxidantes no-radicales, entre los que destacan, por ejemplo, el ácido hipocloroso, un microbicida muy potente [167].

La producción desmesurada de especies reactivas del oxígeno resulta en la generación de un ambiente inflamatorio. Muchos de estos efectos inflamatorios proceden de las interacciones de las moléculas de peróxido de hidrógeno con las células vecinas. Dosis subletales de peróxido de hidrógeno han demostrado regular numerosas rutas de señalización celular que incluyen respuestas a estrés, cambios en la

actividad metabólica, y la fosforilación de cascadas que dirigen a la producción de mediadores inflamatorios, proliferación o muerte celular [167].

## 9.2. Degranulación

Los neutrófilos contienen vesículas secretoras, unos orgánulos susceptibles de ser liberados al medio extracelular a través de la membrana plasmática. Las vesículas secretoras están dotadas con 3 tipos principales de gránulos citoplasmáticos que modulan las funciones celulares. Estos gránulos se conocen como gránulos primarios o azurofílicos, gránulos secundarios o específicos, y gránulos terciarios ricos en gelatinasa. Los gránulos azurofílicos son los almacenes de MPO y la mayoría de proteínas proteolíticas y bactericidas, y son considerados como el compartimento microbicida que se moviliza durante la fagocitosis. Por el contrario, los gránulos secundarios y terciarios contienen proteínas que interactúan y degradan la matriz extracelular, especialmente los gránulos terciarios que son ricos en metaloproteasa-9 (MMP-9). Los gránulos terciarios juegan un papel crucial en la modulación de la biología del neutrófilo porque se movilizan fácilmente tras la estimulación y albergan componentes cruciales para respuestas tempranas durante la inflamación como la producción de aniones superóxido (flavocitocromo b558), adhesión celular (CD11b/CD18, CD11c/CD18) o la extravasación (MMP-9, heparanasa, Rap1) [168].

## 9.3. Fagocitosis

La fagocitosis es una forma especializada de endocitosis mediada por receptores para ingerir partículas o microbios que son de un tamaño mayor a  $0.5 \mu\text{m}$  [169]. Los neutrófilos fagocitan numerosos microorganismos [170], células apoptóticas [171], células tumorales o debris [170]. Tras la internalización, los gránulos de los neutrófilos se movilizan rápidamente a través de mecanismos dependientes de GTPasas y de otras proteínas. Los gránulos azurofílicos se fusionan con los fagosomas y la NOX2 del fagosoma produce ROS en el lumen. La combinación de los gránulos azurofílicos y de ROS garantiza la destrucción de los microorganismos o células internalizadas y la degradación de las partículas internalizadas [172].

## 9.4. Formación de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Las NETs fueron descritas por primera vez en 2004 como estructuras en forma de red compuestas por fibras de ADN y proteínas nucleares, granulares y citosólicas. Muchas de estas proteínas presentan actividad antimicrobiana, como la catepsina G, MPO o la elastasa de neutrófilos (NE, *neutrophil elastase*) [173]. Este mecanismo de la respuesta innata se caracteriza por ser generado por los neutrófilos con el fin de atrapar, inmovilizar e inactivar patógenos, de manera que se evita la propagación de la infección y se asegura una alta concentración de agentes antimicrobianos que degradan y eliminan microorganismos [173].

La formación de NETs ocurre como consecuencia del reconocimiento de microorganismos a través de receptores o mediante la exposición a inflamación estéril [166]. Estos estímulos producen cambios a nivel celular, induciendo alteraciones en los niveles intracelulares de calcio, activación de cascadas de señalización de quinasas o la producción de especies reactivas del oxígeno [166]. Estos eventos se traducen en cambios morfológicos en la célula, que acaba dando lugar a la liberación de los NETs [166].

Actualmente, no se ha definido una ruta única que dé lugar a la liberación de NETs. Este proceso depende del estímulo, de los receptores que reconocen dicho estímulo, y de qué cascadas de señalización se activan a través de esos receptores. A lo largo de estos años, se han ido describiendo diferentes vías de ejecución de la liberación de NETs en torno a estos tres parámetros.

- **Estímulos** [166]: Patógenos como virus [143, 174, 175], bacterias [173, 176, 177], y hongos [178]; pero también moléculas como ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs, *G protein-coupled receptors*) [179], TNF [179], forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) [173], ionóforo de calcio [143], etc.
- **Receptores** [180]: Receptores Fc [179], PRRs como TLR2 [181], TLR4 [181], TLR7 [182], TLR8 [174], CLEC2 y CLEC5A [183], receptores de complemento como CR1 o CR3 [184, 185], canales de calcio como el SK3 [186], etc.
- **Cascadas de señalización** [180]: Dependiendo de qué receptores se estimulen, se desencadenan y activan distintas vías. Una de las vías mejor descritas involucra un incremento de ROS vía NOX2. En este proceso, cuando los receptores reconocen determinados estímulos, se activan vías como la Raf-MEK-ERK-MAP quinasas, la proteína quinasa C (PKC), la fosfoinositol 3 quinasa (PI3K), AKT o la quinasa asociada al receptor de la IL-1 (IRAK) [187-189]. La activación de estas vías activa a su vez a la NOX2, que induce una producción de ROS que activa a las proteínas involucradas en el descondensamiento y liberación del ADN en forma de NETs [188, 190]. Otra de las vías implicadas en la liberación de NETs involucra al calcio. El calcio es un mediador químico importante, debido a su papel en la activación de proteínas que participan en la descondensación y liberación del ADN. La activación de receptores como los TLRs, receptores Fc para IgG o GPCRs induce la liberación de calcio desde el retículo endoplasmático, incrementando así la concentración de calcio intracelular [166, 191].

El proceso de formación de NETs fue originalmente conocido como una forma de muerte celular en neutrófilos bajo el nombre de NETosis [192]. Sin embargo, más adelante se descubrió que las NETs podrían ser también liberadas sin comprometer la viabilidad de las células [193]. Por tanto, a partir de ahora diferenciaremos entre la liberación de NETs lítica y no lítica.

- La **formación de NETs lítica** se caracteriza por ser un proceso tardío de liberación de NETs que supone la producción de ROS dependiente de la NOX2 y la desintegración de las membranas granulares y nucleares de los neutrófilos [192, 194]. Cuando ocurre, la cromatina se descondensa y dispersa en el citoplasma, mezclándose con las proteínas citoplasmáticas. Este mecanismo implica muerte celular y se considera distinto a la apoptosis y necrosis [192]. Los estímulos que pueden inducir este tipo de liberación de NETs promueven un ambiente proinflamatorio y están implicados en condiciones patológicas de inflamación estéril e infecciones [193]: PMA [192], bacterias [195], complejos antígeno-anticuerpo [196], autoanticuerpos [197] e interferón [198].
- La **formación de NETs no lítica** se caracteriza por liberar NETs de forma rápida y mediante un mecanismo que no implica muerte celular ni la presencia de especies reactivas del oxígeno a través de la activación de la NOX2 [194, 199]. A diferencia de la liberación de NETs lítica, los neutrófilos se mantienen viables y funcionales para llevar a cabo otros mecanismos defensivos [193, 200]. La liberación de NETs no lítica se ha detectado principalmente en respuesta a patógenos bacterianos como *S. aureus* [201] y fúngicos como *C. albicans* [178]. El reconocimiento de microorganismos activa a las plaquetas o a las proteínas del complemento a través de receptores de superficie [199, 202], siendo el calcio el agente activador de las proteínas que permiten la descondensación del ADN y su liberación a través de vesículas [203, 204].

La liberación lítica y no lítica de NETs coinciden en que el ADN necesita ser descondensado y extraído del núcleo celular. Para ello, se requiere la actuación de proteínas como la MPO, la NE o la enzima peptidil arginina desaminasa 4 (PAD4). La activación de la MPO resulta en la ejecución de varios procesos determinantes en la liberación de NETs y su función. La MPO despolimeriza la cromatina, rompe la membrana nuclear, es uno de los principales componentes proteicos de las NETs y activa a la NE. Cuando la NE se encuentra activa, se transporta desde el citoplasma hasta el núcleo. Una vez en el núcleo, rompe la cromatina, liberándola al citoplasma [190]. En este punto, se activa también la PAD4. La combinación de PAD4, MPO y NE resulta en la citrulinización de la histona 3 (H3), favoreciendo así la descondensación de la cromatina y su liberación al medio extracelular [180].

Además, se ha descrito también la presencia de NETs mitocondriales. Estos NETs se caracterizan principalmente porque las fibras de ADN que los componen proceden de la mitocondria en lugar del núcleo. La primera vez que se descubrieron fue en 2009, tras pre-tratar neutrófilos con GM-CSF y luego estimularlos con lipopolisacárido (LPS) o con el factor de complemento 5a (C5a). Este proceso se caracteriza por ocurrir a tiempos cortos, por ser dependiente de ROS y no resultar en muerte celular [205].

La liberación de NETs se ha definido como una respuesta innata con carácter defensivo. Sin embargo, existen estudios que han descrito el proceso de liberación de NETs como un mecanismo con

efectos negativos y contraproducentes en algunos escenarios, particularmente en situaciones de inflamación patológica exacerbada. Por ejemplo, un estudio demostró que, en sepsis, las NETs inducían inflamación y promovían el daño orgánico [206]; otro estudio a nivel cardiovascular, publicó que las NETs jugaban un papel importante promoviendo la aterosclerosis y la trombosis [207]; o que, cuando la liberación de NETs no estaba correctamente regulada, las NETs contribuían a la patogenicidad de enfermedades autoinmunes [207].

De modo interesante, los neutrófilos no pueden realizar la fagocitosis y la liberación de NETs a la vez. Las condiciones ambientales, el estado metabólico y de activación del neutrófilo, así como el tamaño, la virulencia y las señales asociadas con la carga fagocítica, influyen en la elección de los neutrófilos. La elección es dicotómica y aparentemente irreversible [172, 208].

## 10. Neutrófilos y envejecimiento

Para abordar el impacto del envejecimiento en las funciones desempeñadas por los neutrófilos, es necesario distinguir entre el envejecimiento del organismo y envejecimiento propio de los neutrófilos [209].

El envejecimiento de un organismo influye a nivel de órganos y tejidos, afectando a la biología de cualquier tipo de célula [209, 210]. En el caso del sistema inmunológico, el envejecimiento genera un deterioro gradual que se caracteriza por la presencia de una inflamación basal excesiva, suponiendo la inhibición de respuestas inmunológicas [209, 210]. Este proceso se conoce como inmunosenescencia, y afecta a todas las células del sistema inmunitario, incluidos los neutrófilos. A pesar de su corta vida media, los neutrófilos son particularmente sensibles a cambios en el ambiente tisular, estados fisiológicos, ritmos circadianos, sexo y edad. En personas de edad más avanzada, el envejecimiento no altera el desarrollo y el número de neutrófilos [209, 211-213]. Sin embargo, el envejecimiento sí afecta negativamente la capacidad de los neutrófilos para erradicar patógenos. Esto se debe a que presentan una vida media más corta [209, 214] y una reducción en funciones como la quimiotaxis [215-217], la actividad fagocítica [218], la liberación de NETs o la generación de ROS tras estimulación [219] (aunque los neutrófilos de personas más mayores producen y secretan constitutivamente niveles más altos de ROS [220]). Respecto a cómo la edad afecta a la liberación de NETs, se ha demostrado que el envejecimiento reduce significativamente la cantidad de NETs liberados por neutrófilos humanos previamente activados con TNF- $\alpha$  y en respuesta a IL-8 y LPS. Sin embargo, cuando estos neutrófilos fueron estimulados con PMA, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos más jóvenes y los más mayores, sugiriendo que el envejecimiento afecta a vías de señalización muy concretas y, por tanto, la alteración de este mecanismo defensivo depende del estímulo [219].



En cuanto a cómo el envejecimiento celular propio de los neutrófilos afecta a sus funciones a lo largo de su ciclo desde que son liberados de la médula ósea hasta que son eliminados, un estudio en ratones demostró que existen diferencias dependiendo de si los neutrófilos se encuentran ante condiciones fisiológicas o patológicas [221]. En condiciones fisiológicas, los neutrófilos ‘*envejecidos*’ se retiran de la circulación hacia la médula ósea, hígado o bazo para ser eliminados y mantener así la homeostasis celular. Sin embargo, en condiciones patológicas e inflamatorias, en lugar de ir hacia los órganos en los que se eliminan, los neutrófilos más maduros son reclutados en las áreas infectadas/inflamadas [221]. Una vez allí, estos neutrófilos exhiben una actividad fagocítica mayor en comparación con los neutrófilos que se han generado recientemente y también han sido reclutados [221]. Esta característica de los neutrófilos más maduros en el organismo se debe a cambios específicos en su repertorio molecular (por ejemplo, aumento en la expresión de CXCR4, TLR4 o integrinas como Mac-a/CD11b) que permiten que actúen como ‘células experimentadas’, permitiéndoles así generar respuestas frente a patógenos más rápidamente que los neutrófilos más inmaduros [221]. En humanos, también se ha demostrado un aumento en la expresión de CXCR4 en neutrófilos más maduros [222]. Sin embargo, los autores de este estudio reportaron que la actividad de estos neutrófilos rebajaba la intensidad de las respuestas inmunológicas: en respuesta a LPS, los neutrófilos maduros presentaron una mayor dificultad para producir ROS, o en infección crónica de VIH, el aumento en el número de neutrófilos maduros indujo inmunosupresión en células T [222].

## 11. Neutrófilos y VIH

Los neutrófilos liberan NETs en respuesta al VIH [143, 174, 223]. Este hallazgo se demostró inicialmente exponiendo *in vitro* neutrófilos sanguíneos al VIH durante 24 h [174]. Más adelante, nuestro grupo de investigación demostró que los neutrófilos de la mucosa del tracto genital de mujeres premenopáusicas liberaban NETs inmediatamente después de ser expuestos al VIH, y que esas NETs tenían la capacidad de inactivar irreversiblemente al virus. Teniendo en cuenta que los neutrófilos de la mucosa genital se encuentran en el portal de entrada del VIH, la liberación de NETs inactivaría al virus antes de que éste pudiese alcanzar a las células diana y establecer una infección, suponiendo un mecanismo de prevención innato no reconocido previamente [143].

El VIH es un retrovirus con un material genético de ARN de cadena sencilla (ssRNA) rico en oligonucleótidos de guanosina (G)- y uridina (U) [224, 225]. Los TLRs endosomales reconocen específicamente ácidos nucleicos, respondiendo TLR3 a cadenas dobles de ARN, TLR7 y TLR8 a cadenas sencillas de ARN y TLR9 a ADN [224]. Las regiones del material genético del VIH ricas en motivos de

guanosina y U(U) señalizan preferencialmente a través de TLR7, y las ricas en motivos de uridina y U(G) a través de TLR8 [226, 227].

Un estudio demostró en neutrófilos de sangre que la liberación de NETs inducida por VIH era parcialmente dependiente de TLR7/8 [174]. Además, cuando los neutrófilos sanguíneos fueron estimulados con R484 (agonista para TLR7/8) [174] y los neutrófilos genitales con ssRNA40 (agonista para TLR8) [143], se detectaron NETs. Asimismo, se demostró que el uso de antagonistas para TLR7/8 inhibían parcialmente la formación de NETs cuando se estimularon neutrófilos sanguíneos durante 24h con VIH [174].

La actividad de los neutrófilos en respuesta al VIH presenta cierta controversia en la comunidad científica. En infección crónica por VIH/VIS, algunos estudios reportaron efectos perjudiciales de las NETs, como la destrucción de células inmunológicas o inflamación, lo cual contribuiría a generar daño tisular y la patología observada en la infección crónica [228, 229]. Además, en el contexto de enfermedades de transmisión sexual e inflamación genital, el contenido molecular liberado por los neutrófilos en las secreciones cervicovaginales se asoció con un mayor riesgo de contraer el VIH [75, 230, 231]. Por el contrario, otros estudios respaldan un papel protector por parte de los neutrófilos frente a la adquisición del VIH. Un estudio reciente mostró que los neutrófilos genitales contribuyen poco a la remodelación de los tejidos en condiciones fisiológicas, lo que cuestiona la noción de que los neutrófilos tisulares participan en el daño tisular en ausencia de estímulos inflamatorios patológicos [232]. Además, la evidencia clínica respalda un papel protector de los neutrófilos en respuesta al VIH: algunos estudios realizados en África encontraron asociaciones entre recuentos bajos de neutrófilos en la sangre (neutropenia) y un mayor riesgo de contraer el VIH en trabajadores sexuales [233], o un mayor riesgo de transmisión intrauterina del VIH [234]. Estos hallazgos aparentemente contradictorios muestran una brecha en el conocimiento sobre las respuestas de los neutrófilos al VIH y la necesidad de determinar el papel de las NETs en la adquisición del VIH en la mucosa genital.

Actualmente, se desconocen los mecanismos responsables y eventos más tempranos que tienen lugar durante el desencadenamiento de la liberación de NETs en respuesta al VIH, así como si los neutrófilos sanguíneos responden de manera diferente al VIH en comparación con los neutrófilos del aparato genital femenino. Además, a pesar de que existen estudios que indican que las mujeres presentan mayor riesgo de infección por VIH en la postmenopausia [116, 235], no hay estudios sobre si este mecanismo de defensa frente al VIH se modifica a medida que las mujeres envejecen.

## Hipótesis y objetivos

<b>1. Hipótesis</b> .....	32
<b>2. Objetivos</b> .....	33

## 1. Hipótesis

La infección por VIH continúa siendo un problema de salud pública a nivel global, para el que aún no existe cura o tratamientos preventivos ante futuras infecciones a largo plazo. Actualmente, las mujeres constituyen el 53% de la población infectada por este virus en el mundo. A pesar de que el número de nuevos diagnósticos está descendiendo entre las mujeres en edad reproductiva, las tasas de contagio están incrementando en mujeres mayores de 50 años.

La vía de transmisión del VIH más común en mujeres es a través del contacto sexual, lo que supone que el tracto genital femenino sea uno de los principales portales de entrada para este virus. Sin embargo, la ratio de transmisión del VIH por contacto sexual en mujeres es muy baja (0.08%), sugiriendo la presencia de mecanismos defensivos frente a patógenos en la mucosa genital femenina, entre los que destacamos las repuestas por parte de las células inmunológicas residentes en el aparato reproductor femenino. Los neutrófilos son las células inmunitarias innatas más abundantes en la mucosa genital y se caracterizan por ser células que presentan un amplio espectro de mecanismos defensivos en respuesta a patógenos: degranulación, ROS, fagocitosis o liberación de NETs. Recientemente, nuestro grupo de investigación descubrió que los neutrófilos genitales liberaban NETs en respuesta al VIH, y que las NETs tenían la capacidad de inactivar de manera irreversible al virus. Sin embargo, los mecanismos subyacentes responsables de desencadenar la liberación de NETs tras la estimulación con VIH aún no están definidos.

La liberación de trampas extracelulares de neutrófilos se ha definido como un mecanismo de defensa innato que ha generado cierta controversia en la comunidad científica. Por un lado, algunos autores describen la liberación de NETs como un proceso con consecuencias perjudiciales como daño tisular o inflamación exacerbada; y otros la definen como una estrategia defensiva involucrada en la protección frente a patógenos. En el contexto de la infección por VIH, esta controversia sigue vigente.

No obstante, considerando nuestros resultados previos en los que las NETs inactivan el VIH, así como los datos publicados por otros autores en los que se cuestiona que los neutrófilos tisulares generen daño en condiciones fisiológicas, o las evidencias clínicas que revelan una asociación entre neutropenia y aumento de adquisición de VIH en mujeres, proponemos como hipótesis principal que **las trampas extracelulares de neutrófilos de la mucosa del tracto genital protegen a las mujeres frente a la adquisición del VIH vía transmisión sexual.**

Con respecto a los mecanismos implicados en este proceso, hipotetizamos que el mecanismo principal de reconocimiento del virus es a través de TLRs y que el papel protector de las NETs disminuye con la edad debido a defectos en los mecanismos de reconocimiento viral o de la señalización desencadenada por éste.

## 2. Objetivos

**1. Identificar los mecanismos por los que los neutrófilos genitales reconocen el VIH y se desencadena la liberación de NETs.**

Nuestro objetivo es determinar qué componentes virales son reconocidos por los neutrófilos y qué mecanismos moleculares son activados e inducen la liberación de NETs en los neutrófilos en respuesta al VIH.

**2. Comparación y evaluación de la actividad anti-VIH de los neutrófilos con el envejecimiento.**

Como parte de este objetivo, determinaremos en qué medida se ve afectada la capacidad de liberación de las NETs al VIH con la edad, así como el reconocimiento del virus y la consecuente señalización en los neutrófilos del aparato genital femenino de las mujeres postmenopáusicas.

## Materiales y métodos

<b>1. Sujetos de estudio.....</b>	<b>35</b>
<b>2. Procesamiento de tejidos y purificación de neutrófilos.....</b>	<b>35</b>
<b>3. Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica humana.....</b>	<b>37</b>
<b>4. Inhibidores.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Inducción y cuantificación de NETs con un sistema de análisis de células vivas y toma de imágenes en tiempo real.....</b>	<b>38</b>
<b>6. Visualización y cuantificación de calcio con un sistema de análisis de células vivas y toma de imágenes en tiempo real.....</b>	<b>39</b>
<b>7. Visualización y cuantificación de ROS con un sistema de análisis de células vivas y toma de imágenes en tiempo real.....</b>	<b>39</b>
<b>8. Generación de PV-VIH marcadas con proteína verde fluorescente (GFP).....</b>	<b>40</b>
<b>9. Microscopia confocal.....</b>	<b>40</b>
<b>10. Citometría de flujo.....</b>	<b>41</b>
<b>11. ELISA.....</b>	<b>41</b>
<b>12. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).....</b>	<b>42</b>
<b>13. Análisis estadístico.....</b>	<b>43</b>
<b>14. Aprobación ética y consentimiento para participar.....</b>	<b>43</b>
<b>15. Disponibilidad de datos y materiales.....</b>	<b>43</b>

# Materiales y métodos

## 1. Sujetos de estudio.

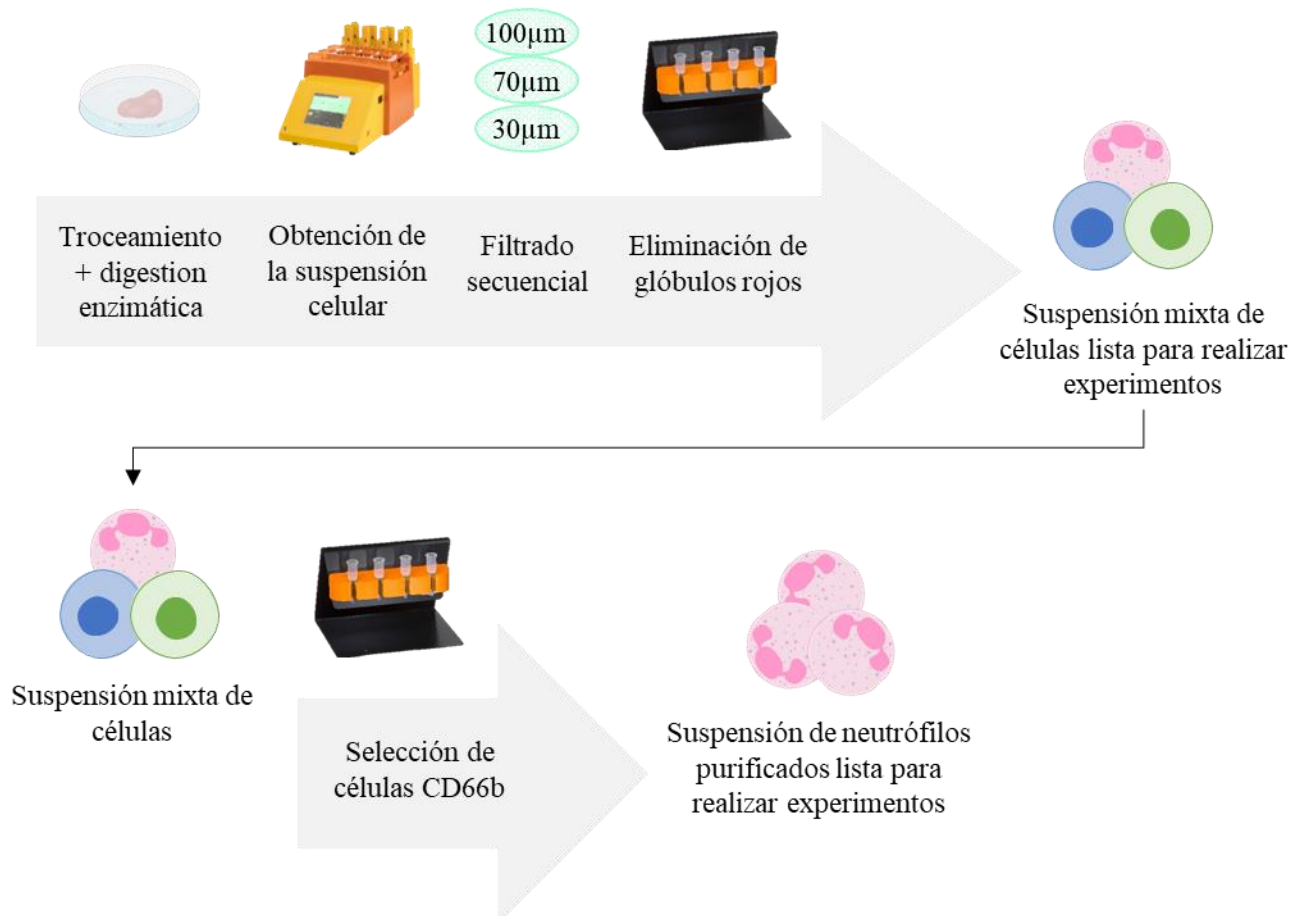
Este estudio fue aprobado por el Comité de Protección de Sujetos Humanos y por la Junta de Revisión Institucional de Ciencias de la Salud de la Universidad de Tufts, Boston, MA, Estados Unidos. Las muestras de tejidos procedentes del tracto genital femenino fueron obtenidas tras histerectomías realizadas en mujeres no infectadas por VIH en Tufts Medical Center (Boston, MA, Estados Unidos). Las histerectomías fueron llevadas a cabo para tratar condiciones benignas como fibromas, prolapso y menorragias. Las distintas partes del tracto genital femenino fueron seleccionadas por anatomopatólogos, diferenciando entre endometrio (EM), endocérvix (END) y ectocérvix (ECX), todas ellas libres de lesiones y distantes de las zonas patológicas que motivaron el procedimiento quirúrgico. Las mujeres comunicaron la etapa menopáusica en la que se encontraban y se clasificaron en este estudio como premenopáusicas (n=33; 24-55 años; edad (media)=42) y postmenopáusicas (n=9; 49-77 años; edad (media)=62).

Las muestras de sangre fueron obtenidas a través de donaciones de mujeres sanas al banco de sangre Research Blood Components, LLC (Watertown, MA, Estados Unidos). Las mujeres firmaron un formulario de consentimiento aprobado por la Junta de Revisión Institucional donde dan permiso a Research Blood Components, LLC para recolectar y vender su sangre con fines de investigación. La única información proporcionada sobre las donantes fue su edad y etapa menopáusica. Las mujeres fueron clasificadas en este estudio como mujeres premenopáusicas (n=42; 18-51 años; edad (media)=34) y mujeres posmenopáusicas (n=29; 48-72 años; edad (media)=60).

## 2. Procesamiento de tejidos y purificación de neutrófilos.

Los tejidos se procesaron para obtener una suspensión de células estromales como se describió anteriormente [100, 105, 143, 236, 237]. El tejido se troceó con un bisturí y se digirió enzimáticamente utilizando un kit de disociación de tumores humano (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, Estados Unidos) y ADNasa al 0,01 % (Worthington Biochemical, Lakewood, Nueva Jersey, Estados Unidos) en el disociador gentleMACS™ (Miltenyi Biotec). Después, la suspensión celular obtenida se filtró secuencialmente a través de filtros con un tamaño de poro de 100 µm, 70 µm y 30 µm (MACS® SmartStrainers; Miltenyi Biotec) para separar las células epiteliales de las células estromales. A continuación, se eliminaron los glóbulos rojos de la suspensión celular mediante el uso de bolas magnéticas que se unieron específicamente a la molécula CD235a humana junto con el uso de un sistema de columnas e imán, tal y como se recoge en las instrucciones del fabricante (CD235a (Glycophorin A) MicroBeads, humano, Miltenyi Biotec).

En este punto, o bien se utilizó la suspensión mixta de células para los experimentos de liberación de NETs, o bien se procedió al aislamiento de los neutrófilos. Para purificar los neutrófilos genitales, se incubó, siguiendo las instrucciones del fabricante, la suspensión mixta de células con un anticuerpo específico para la molécula humana CD66b unida a una molécula de ficoeritrina (PE, *phycoerythrin*) (anti-CD66b humano, PE, REAfinity™, Miltenyi Biotec). Después, se lavaron las células en tampón fosfato salino (PBS, *phosphate-buffered saline*) y se incubó la suspensión celular con bolas magnéticas que se unieron específicamente a las moléculas de ficoeritrina (anti-PE MicroBeads UltraPure, Miltenyi Biotec) para seleccionarlas magnéticamente mediante el uso de columnas e imán, siguiendo las instrucciones del fabricante [143, 238] (Ilustración 6).



**Ilustración 6. Procesamiento de muestras de tejido del tracto genital femenino y purificación de neutrófilos.**

Esquema gráfico del procesamiento de las muestras de tejido del tracto genital femenino para la obtención de suspensiones mixtas de células (arriba) o suspensiones de neutrófilos purificados (abajo).



### 3. Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica humana.

Se recolectó sangre venosa de mujeres sanas en tubos con EDTA de 10 ml. El aislamiento de neutrófilos se realizó como se describe [143, 223], mediante selección positiva utilizando bolas magnéticas que seleccionan específicamente las moléculas CD15 humanas (CD15 MicroBeads, Miltenyi Biotec), junto con el uso de un kit de columnas de separación magnética especiales para sangre y un imán (Whole Blood Columns, Miltenyi Biotec) tal y como se describe en las instrucciones del fabricante (Ilustración 7).



**Ilustración 7. Proceso de purificación de neutrófilos procedentes de sangre.**

### 4. Inhibidores.

Se resuspendieron los neutrófilos sanguíneos humanos purificados y las suspensiones mixtas de células de tejidos genitales humanos en medio de cultivo de solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, *Hank's balanced salt solution*) (Gibco, Waltham, MA, Estados Unidos) para cultivarse en una placa de 96 pocillos (Corning Inc.; Corning, NY, Estados Unidos) y pre-incubarse a temperatura ambiente con los siguientes inhibidores: inhibidor de TLR8 a 5  $\mu\text{M}$  durante 1 h (CU-CPT9a; InvivoGen, San Diego, CA, Estados Unidos), inhibidor de *TANK-binding kinase 1* (TBK1) y *I-kappa-B kinase epsilon* (IKK $\epsilon$ ) (TBK1/IKK $\epsilon$ ) a 100 nM durante 1 h (BX795, InvivoGen), inhibidor de TLR9 a 150 nM durante 30 min (ODN TTAGGG (A151), InvivoGen), inhibidor de TLR7 a 150 nM durante 30 min (ODN 2088 Control (ODN 20958), Miltenyi Biotec), inhibidor de TLR7/9 a 150 nM durante 30 min (Dual iODN; EnzoLifeSciences, Farmingdale, NY, Estados Unidos), inhibidor de dinamina (Dynasore; Abcam, Waltham, MA, Estados Unidos) a 200  $\mu\text{M}$  durante 20 min, inhibidor de la NADPH oxidasa (cloruro de difenilenoyodonio (DPI); Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) a 10  $\mu\text{M}$  durante 30 min, quelante de calcio (BAPTA; Thermo Fisher, Waltham, MA, Estados Unidos) a 10  $\mu\text{M}$  durante 30 min. Cada inhibidor tenía su propia condición de control que coincidía con los medios utilizados para

resuspender los inhibidores: dimetilsulfóxido (DMSO), soluciones tampón suministradas con los inhibidores o HBSS (Tabla 4).

**Tabla 4. Reactivos utilizados para el bloqueo de receptores, complejos o moléculas.**

Inhibidor	Reactivo	Disolvente	Producto	Aplicación
Inh. TLR7	ODN20958	TE Buffer	Miltenyi (130-105-821)	150 nM/30 minutos
Inh. TLR7/9	Dual iODN	PBS	Enzolifesciences (ALX-746-255)	150 nM/30 minutos
Inh. TLR8	CU-CPT9a	DMSO + disolvente	Invivogen (2165340-32-7)	5 $\mu$ M/1 hora
Inh. TLR9	ODN TTAGGG	Agua libre endotoxinas	Invivogen (tlrl-ttag151)	150 nM/30 minutos
Inh. TBK1/IKK $\epsilon$	BX795	DMSO	Invivogen (tlrl-bx7)	100 nM/1 hora
Inh. Dinamina	Dynasore	DMSO	Abcam (ab120463)	200 $\mu$ M/20 minutos
Inh. NOX	DPI	DMSO	ThermoFisher (B1205)	10 $\mu$ M/30 minutos
Quelante calcio	BAPTA	DMSO	Sigma-Aldrich (D2926)	10 $\mu$ M/30 minutos

## 5. Inducción y cuantificación de NETs con un sistema de análisis de células vivas y toma de imágenes en tiempo real.

Después de pre-incubar los neutrófilos purificados o las suspensiones mixtas de células inmunológicas con tratamientos específicos, se estimularon con partículas virales de VIH marcadas con GFP (PV-VIH) o estimuladas con ionóforo de calcio (A23187; Sigma-Aldrich). Las células fueron visualizadas y analizadas a través del sistema de análisis de células vivas IncuCyte, un sistema de microscopía fluorescente que permite la cuantificación y toma de imágenes en tiempo real.

A través del software que incluye la plataforma IncuCyte, se cuantificó el ADN extracelular para determinar el área de las NETs que capturaron el VIH (VIH-NETs), tal y como se describió previamente [143, 223]. Este protocolo consistió en la aplicación de una máscara diseñada que seleccionaba específicamente las VIH-NETs estableciendo parámetros como el tamaño o la excentricidad, con un aumento de 10x, por lo que las PV-VIH individuales libres en el medio eran indetectables; solo se visualizaron cuando se acumularon múltiples partículas en las NETs. Para marcar el ADN, se usó un reactivo fluorescente (Ex/Em Max: 612/631 nm, rojo) conocido como Cytotox a 250 nM (Essen Bioscience; Ann Arbor, MI, Estados Unidos) y para detectar las moléculas de anexina V, se utilizó un reactivo fluorescente (Ex/Em Max: 593/614 nm, rojo) específico para anexina V en una dilución 1:200 (IncuCyte®

Annexin V Dye for Apoptosis; Sartorius, Bohemia, NY, Estados Unidos), tal y como se describieron en las instrucciones del fabricante. Las imágenes se recogieron cada 3-5 minutos a 37 °C utilizando el sistema IncuCyte S3 (Sartorius) [143, 223].

Además, la estabilidad de la membrana celular se evaluó con el reactivo Cytotox, de manera que las células positivas se cuantificaron utilizando una máscara que selecciona específicamente objetos (células) redondos y pequeños.

## **6. Visualización y cuantificación de calcio con un sistema de análisis de células vivas y toma de imágenes en tiempo real.**

Se utilizó el reactivo fluorescente Rhod-3 AM (Rhod-3 Calcium Imaging Kit; Thermo Fisher) para teñir el calcio citosólico en rojo (Ex/Em Max: 550/580 nm), siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control interno de la señal positiva, utilizamos un quelante de calcio (BAPTA, AM; Thermo Fisher) a 10  $\mu$ M que se pre-incubó en neutrófilos durante 30 min a temperatura ambiente. Para cuantificar el área de calcio intracelular, aplicamos una máscara que diseñamos para seleccionar la señal fluorescente roja intracelular a través del software IncuCyte.

## **7. Visualización y cuantificación de ROS con un sistema de análisis de células vivas y toma de imágenes en tiempo real.**

Se utilizó el reactivo fluorescente CellROX (CellROX™ Deep Red Reagent, Thermo Fisher) para teñir de rojo (Ex/Em Max: 644/665 nm, rojo lejano) el estrés oxidativo celular en presencia de ROS. El reactivo CellROX no es fluorescente cuando se encuentra reducido, pero muestra fluorescencia una vez que las ROS lo oxidan. Como control interno de la señal positiva, utilizamos un inhibidor de la NOX2 (DPI; Sigma-Aldrich) a 10  $\mu$ M que se pre-incubó en neutrófilos durante 30 min a temperatura ambiente. Para cuantificar el área de ROS intracelular, aplicamos una máscara que diseñamos para seleccionar la tinción roja intracelular a través del software IncuCyte.

## 8. Generación de PV-VIH marcadas con proteína verde fluorescente (GFP).

Los neutrófilos fueron estimulados con partículas de VIH unidas a moléculas de GFP con afinidad por el receptor CCR5. Estas partículas se generaron a partir de un plásmido basado en el provirus pNL43 modificado para la expresión GFP, tal y como se describió anteriormente [239]. La secuencia codificante mejorada de GFP (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*) se expresó en el marco del extremo 3' del *gag*, reemplazando la proteasa y la mayor parte de la región codificante de la transcriptasa inversa. La señal  $\Psi$  en el ARN y el marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) para *gag* permanecieron intactos. Para obtener cepas con tropismo para CCR5 (cepas R5), un plásmido con un ORF de *env* inactivo, es decir, que no expresaba proteínas funcionales de la envoltura (denominada pNL4GagGSGFPDelta-env/K806), se derivó de K795 para pseudotiparlo y complementarlo con el plásmido de expresión para la envoltura de pBaL.26 (programa NIH AIDS Reagent, número de catálogo 11.446, aportado por el Dr. John Mascola) [240], generando así PV-VIH con proteínas en la envoltura con afinidad por CCR5. Para algunos experimentos, utilizamos PV-VIH sin proteínas de la envoltura (VIH- $\Delta$ env). Las PV-VIH no infecciosas marcadas con EGFP se produjeron mediante transfección, se concentraron mediante ultracentrifugación y se enumeraron esencialmente como se describe [239].

## 9. Microscopia confocal.

Las células se resuspendieron en HBSS y se colocaron en cubreobjetos previamente recubiertos con poli-D-lisina (Gibco) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se utilizaron PV-VIH marcadas con GFP (5 000-10 000 PV-VIH/célula) para estimular la liberación de NETs durante 5 min, 15 min, 30 min, 1 h o 2 h a temperatura ambiente, y luego se fijaron con paraformaldehído al 4 %. Se utilizaron como controles neutrófilos no estimulados incubados en HBSS. Las células y los NETs se tiñeron durante 2 h a temperatura ambiente con AlexaFluor 647-H3 (1B1-B2) (BioLegend) AlexaFluor 647-Rab5 (D-11) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos), AlexaFluor 647-Lactoferrin (LF5-1D2) (Novusbio, Englewood, CO, Estados Unidos) y/o PE-Annexin V (BioLegend, San Diego, CA, Estados Unidos). Las células y los NETs se lavaron cuidadosamente con PBS y las muestras se montaron con una solución de montaje anti-desvanecimiento con DAPI (Pro-Long Diamond anti-fade mounting with DAPI; Thermo Fisher) como se describe [143]. Se tomaron imágenes aleatorias de las muestras (aumento, 63x) utilizando el microscopio confocal Leica SP8 en combinación con el software Leica LAS X.

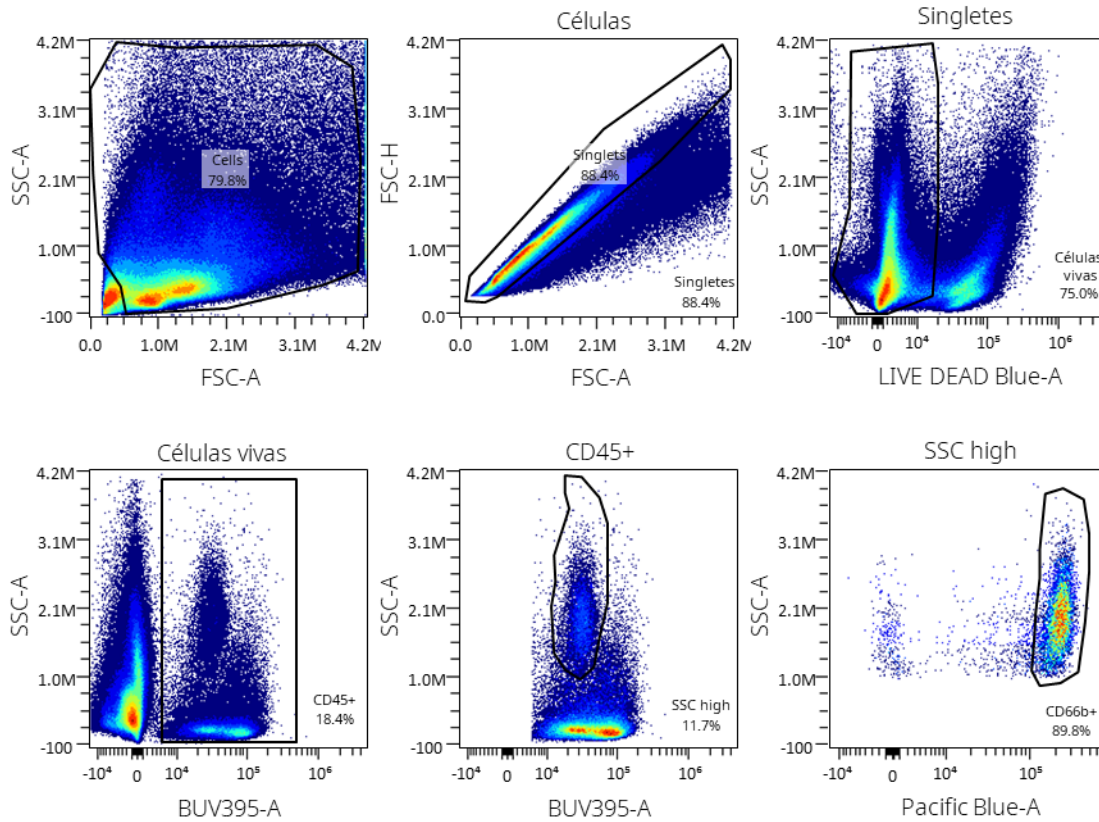
## 10. Citometría de flujo.

Para determinar la abundancia de neutrófilos en el tracto genital femenino, se tiñeron suspensiones mixtas de células procedentes de tejidos genitales para detectar marcadores de superficie utilizando una combinación de los siguientes anticuerpos: CD45-vioblu450, CD11b-PE (Tonbo, San Diego, CA, Estados Unidos), CD3-VioGreen, CD15-FITC, CD66b-APC (Miltenyi biotec), CD11c-PerCp-Cy5.5, CD3-APC (Biolegend), CD14-e780, (eBiosciences, San Diego, CA, Estados Unidos). La viabilidad celular se evaluó mediante el uso de 7AAD (Southern Biotech, Birmingham, AL, Estados Unidos) o del reactivo zombie dye yellow staining (Biolegend). Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo de 8 colores MACSQuant 10 (Miltenyi biotec) o Gallios (Beckman Coulter, Indianápolis, IN, Estados Unidos) y los datos se analizaron con el software FlowJo (Tree Star, Inc. Ashland, OR, Estados Unidos). La expresión de marcadores de superficie se muestra como porcentaje de células positivas. Se utilizó la estrategia de fluorescencia menos uno (FMO, *fluorescence minus one*) para establecer selecciones apropiadas de las poblaciones celulares y los marcadores, tal y como se muestra en la ilustración 8 [143].

Para determinar la expresión de los receptores que reconocen el VIH en los neutrófilos, se tiñeron neutrófilos de sangre purificada y suspensiones mixtas de células procedentes de tejidos genitales con los siguientes anticuerpos para células humanas: CD45-BUV395 (BD Biosciences), CD66b-Pacific blue (BioLegend), CD15-FITC (BioLegend), CD4-BUV805 (BD Biosciences), CXCR4-BV785 (BioLegend) y CCR5-PE-Cy5 (clon: 2D7/CCR5) (BD Biosciences). La viabilidad celular se evaluó utilizando el reactivo live/dead fixable blue dead cell stain kit (Thermo Fisher) durante 10 minutos en una dilución 1:200. Se bloquearon los receptores Fc mediante el uso del reactivo FcR Blocking Reagent (Miltenyi biotec) durante 10 minutos (5 µl/células 1 M). El análisis se realizó en un citómetro Aurora (Cytek Biosciences; Fremont, CA, Estados Unidos) y se analizaron los datos utilizando el programa OMIQ ([www.omiq.ai](http://www.omiq.ai)).

## 11. ELISA.

Se utilizó el kit Invitrogen™ Estradiol Human ELISA Kit (Thermo Fisher) para determinar los niveles de estradiol en plasma de donantes de sangre, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron muestras de plasma de sangre (1 ml) después de centrifugar a 500 g durante 15 min a temperatura ambiente.



**Ilustración 8. Estrategia de selección de neutrófilos genitales mediante citometría de flujo.**

Los neutrófilos genitales (células CD66b+) se seleccionaron a partir de una suspensión mixta de células inmunológicas (CD45+) vivas. Dentro de las células inmunológicas, se eligieron aquellas células que presentaban una alta granularidad (*SSC high*). Por último, definimos nuestra población de neutrófilos seleccionando las células que expresaban la molécula CD66b.

## 12. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR).

Los neutrófilos humanos de sangre fueron procesados usando RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen; Hilden, Germany) para extraer y purificar el ARN. Para obtener un ARN de alta calidad, se eliminaron contaminantes usando RNeasy cleanup kit (Qiagen). Los genes *TLR7*, *TLR8*, *TLR9*, and *RPL13a* (como control interno) fueron amplificados usando PowerSYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher) y los siguientes *primers*: *TLR7*, hFw 5'ttccagagcatacagcttag3' y hRv 5'gcctctgatgggacaagtaaa3'; *TLR8*, hFw 5'gctacaggtctctttccacatc3' y hRv 5'gtgtagcgcagctcatta3'; *TLR9*, hFw 5'gctagacctgtcccacaataag3' y hRv 5'aaaggctggctgtgttag3'; *RPL13a*, hFw 5'gccctacgacaagaaaagcg3' y hRv 5'tactccagccaacctctgta3'. Las muestras fueron procesadas y analizadas utilizando QuantStudio 6 Flex System. Todos los kits se usaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **13. Análisis estadístico.**

El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism 9. Los datos se representaron como mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Los p valores unilaterales y bilaterales  $\leq 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos. Se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney o Wilcoxon para comparar dos grupos. Se utilizó la prueba t de una muestra para determinar si una población desconocida era diferente de un valor hipotético, asumiendo un muestreo de una distribución gaussiana. Para el análisis de correlación se utilizó la correlación no paramétrica de Spearman.

### **14. Aprobación ética y consentimiento para participar.**

El estudio fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de Ciencias de la Salud de la Universidad de Tufts. Se obtuvieron consentimientos escritos e informados antes de la cirugía de mujeres VIH negativas sometidas a histerectomías en el Tufts Medical Center (Boston, MA), y de la extracción de sangre de donantes sanas.

### **15. Disponibilidad de datos y materiales.**

Todos los datos para evaluar las conclusiones contenidas en el artículo y en esta tesis están disponibles en el texto principal o en las figuras.

## Resultados

<b>1. Efecto de la edad tras la menopausia en la liberación de NETs en respuesta VIH.....</b>	<b>45</b>
<b>1.1. Neutrófilos sanguíneos.....</b>	<b>45</b>
<b>1.2. Neutrófilos del tracto genital femenino.....</b>	<b>49</b>
<b>2. TLR8 y TLR7 median la liberación de NETs temprana y tardía en respuesta al VIH de manera secuencial.....</b>	<b>52</b>
<b>2.1. Neutrófilos sanguíneos.....</b>	<b>52</b>
<b>2.2. Neutrófilos del tracto genital femenino.....</b>	<b>56</b>
<b>3. El VIH induce un incremento rápido del calcio intracelular en neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1. Neutrófilos sanguíneos.....</b>	<b>58</b>
<b>3.2. Neutrófilos del tracto genital femenino.....</b>	<b>62</b>
<b>4. La estimulación con VIH induce la producción de ROS a través de diferentes mecanismos en neutrófilos sanguíneos y genitales.....</b>	<b>65</b>
<b>4.1. Neutrófilos sanguíneos.....</b>	<b>65</b>
<b>4.2. Neutrófilos del tracto genital femenino.....</b>	<b>68</b>
<b>5. El VIH es internalizado por un subconjunto de neutrófilos.....</b>	<b>69</b>
<b>6. Anexina V y lactoferrina identifican NETs proinflamatorios producidos tras el reconocimiento del VIH a través de TLR7.....</b>	<b>73</b>



## Resultados

### 1. Efecto de la edad tras la menopausia en la liberación de NETs en respuesta al VIH.

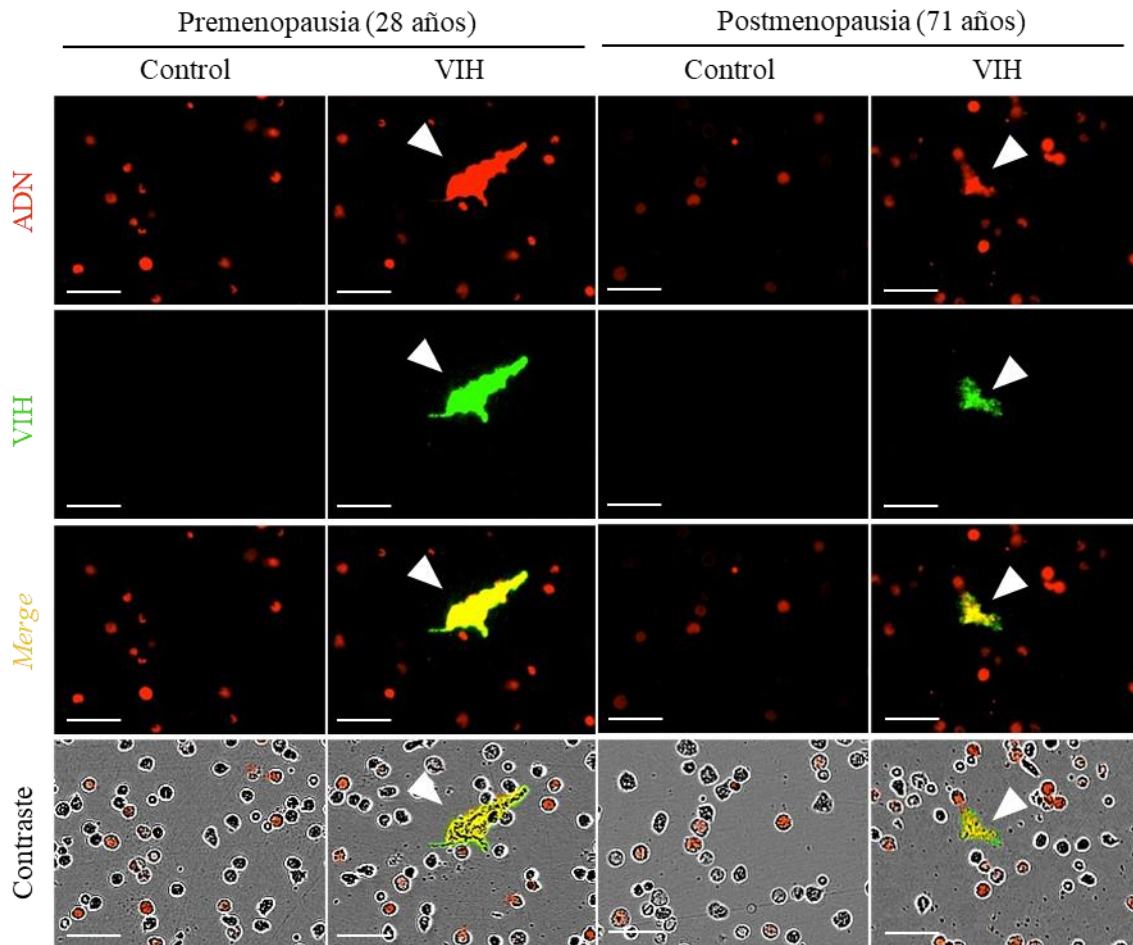
Anteriormente, varios autores demostramos que los neutrófilos procedentes de sangre y del aparato genital femenino liberaban NETs en respuesta al VIH [143, 174, 223]. En este estudio, queremos investigar el impacto del envejecimiento en la liberación de NETs inducida por VIH en sangre y en la mucosa genital. Para ello, estimulamos neutrófilos sanguíneos y del tracto genital de mujeres (18-77 años) con PV-VIH para inducir la liberación de NETs. Estas partículas de VIH se caracterizan por haber sido modificadas para expresar GFP. La liberación de NETs en respuesta al VIH fue visualizada usando un sistema de análisis de células vivas y toma de imágenes en tiempo real, tal y como describimos en materiales y métodos y en publicaciones previas [143, 223].

#### 1.1. Neutrófilos sanguíneos

De manera consistente con nuestros hallazgos previos [143, 223], detectamos liberación de NETs tras estimular neutrófilos de sangre con PV-VIH, pero no detectamos NETs en el control (Fig. 1).

Para confirmar que los NETs estaban atrapando al VIH, visualizamos estos complejos VIH-NETs mediante microscopía confocal como método alternativo. Los neutrófilos fueron cultivados en secciones de cristal y estimulados con PV-VIH para inducir la liberación de NETs. Seguidamente, se realizó una tinción para detectar ADN e histona 3 (H3), una de las conocidas proteínas asociadas a NETs [173]. Como se muestra en la figura 2, observamos colocación entre la señal emitida por VIH, ADN extracelular e H3, indicando que el VIH está atrapado en los NETs.

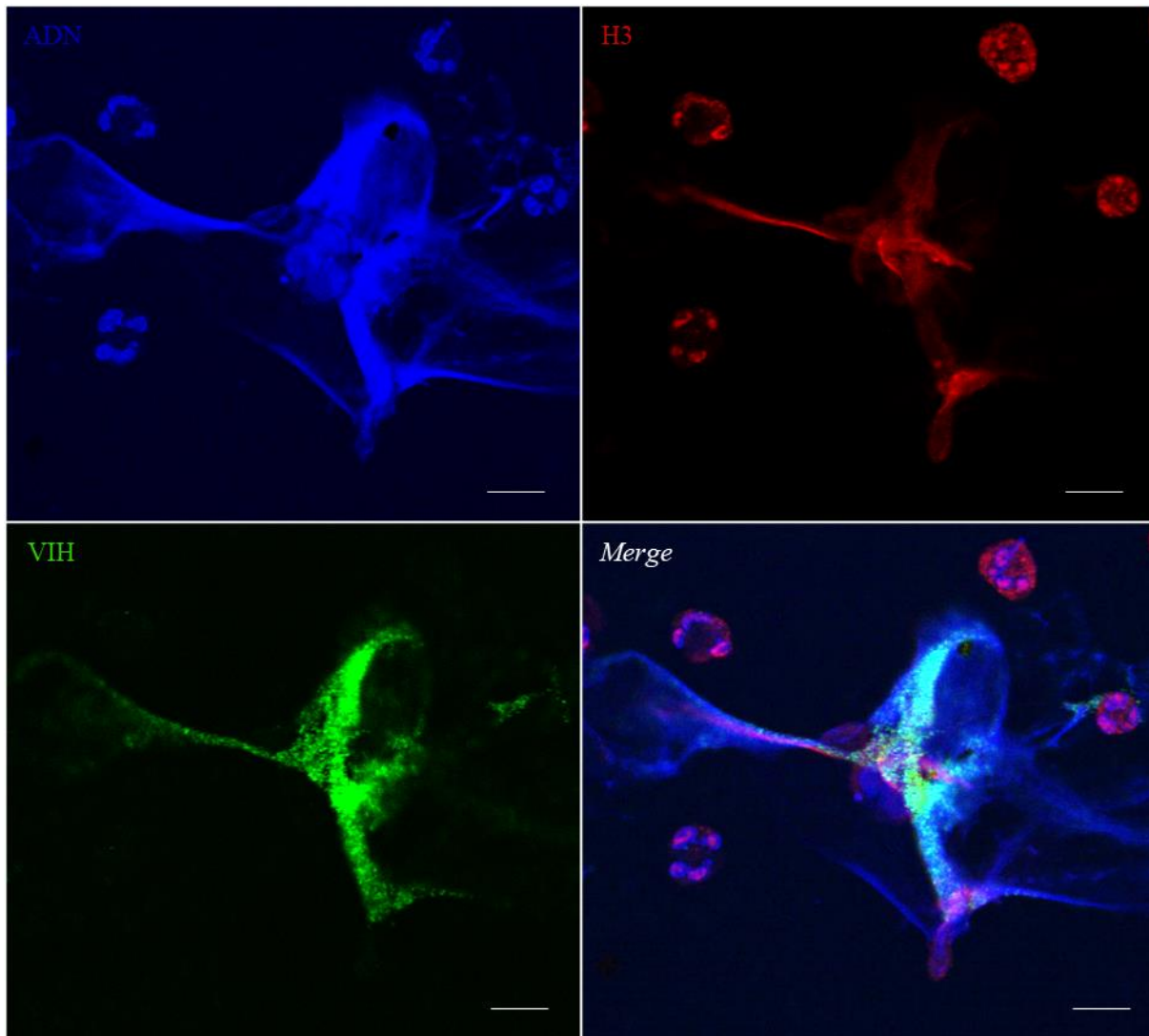
Curiosamente, en las primeras observaciones visualizamos una reducción en la formación de NETs en mujeres postmenopáusicas en comparación con mujeres premenopáusicas (Fig. 1). Por tanto, mediante el software IncuCyte, procedimos a cuantificar el área de la señal fluorescente emitida por los NETs. Para ello, establecimos una máscara con restricciones de tamaño y esfericidad en la que excluimos la señal proporcionada por las células (redondas y de menor tamaño) y seleccionamos aquellas formas irregulares y de mayor tamaño características de los NETs. Cuando cuantificamos dicha liberación de NETs a lo largo del tiempo, identificamos un pico de liberación de NETs a tiempos tempranos en mujeres premenopáusicas (liberación temprana de NETs; 0-15 min), seguido de una liberación tardía que se mantiene a lo largo del tiempo (liberación tardía de NETs; 15min-2h) (Fig. 3A; círculos negros).



**Figura 1. Liberación de NETs por neutrófilos sanguíneos de mujeres pre y postmenopáusicas.**

Detección de la formación de NETs tras 2h de estimulación con VIH. El ADN de los NETs se marcó en rojo con Cytotox y las PV-VIH en verde. La colocalización de los 2 colores (*merge*) se presenta en amarillo. Las flechas indican los NETs. Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente IncuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Sin embargo, los neutrófilos sanguíneos de mujeres postmenopáusicas no mostraron este pico temprano de liberación de NETs tras la estimulación con VIH, aunque sí liberaron NETs a tiempos más tardíos (Fig. 3A; círculos blancos). No se encontraron diferencias en la liberación total de NETs (2h) entre mujeres pre y postmenopáusicas ( $n=37$ ) tras estimular los neutrófilos con VIH (Fig. 3B; 0-2 h); sin embargo, detectamos que las mujeres postmenopáusicas liberaban significativamente menos NETs que las mujeres premenopáusicas a tiempos tempranos (Fig. 3B; 0-15 min,  $p=0.02$ ), sin mostrar diferencias significativas a tiempos tardíos tras la estimulación con VIH (Fig. 3B; 15min-2h).

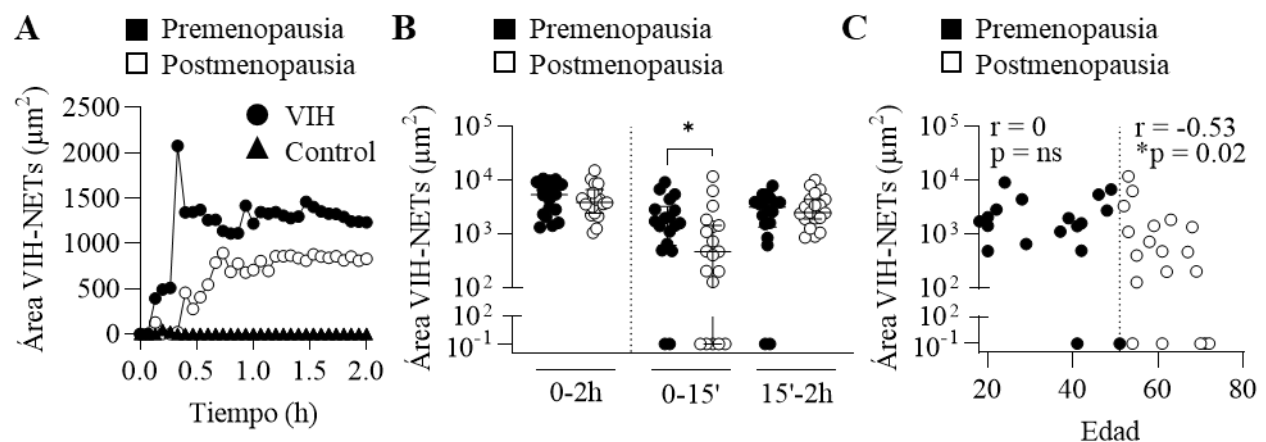


**Figura 2. Liberación de NETs por neutrófilos sanguíneos y captura del VIH.**

Imágenes representativas de los complejos VIH-NETs tras 1h de estimulación con VIH visualizados a través de microscopía confocal (aumento, 63x). Barra de escala: 10  $\mu$ m. La colocación de los 3 colores se muestra como *merge*.

Estos resultados sugieren que hay un retraso en la respuesta al VIH en los neutrófilos sanguíneos de las mujeres postmenopáusicas en comparación con las mujeres premenopáusicas. Considerando que la menopausia es un acontecimiento importante que marca el final de los ciclos de las hormonas sexuales en el proceso de envejecimiento de las mujeres [241], quisimos investigar si los efectos observados en la liberación temprana de NETs estaban influenciados por el envejecimiento tras la menopausia. Como se puede observar en la figura 3C, durante los años previos a la menopausia, la liberación temprana de los NETs se mantiene independientemente de la edad de las mujeres (Fig. 3C; círculos negros), sin embargo,

disminuye significativamente con la edad a partir de la menopausia (Fig. 3C; círculos blancos,  $r=-0.53$ ,  $p=0.02$ ).

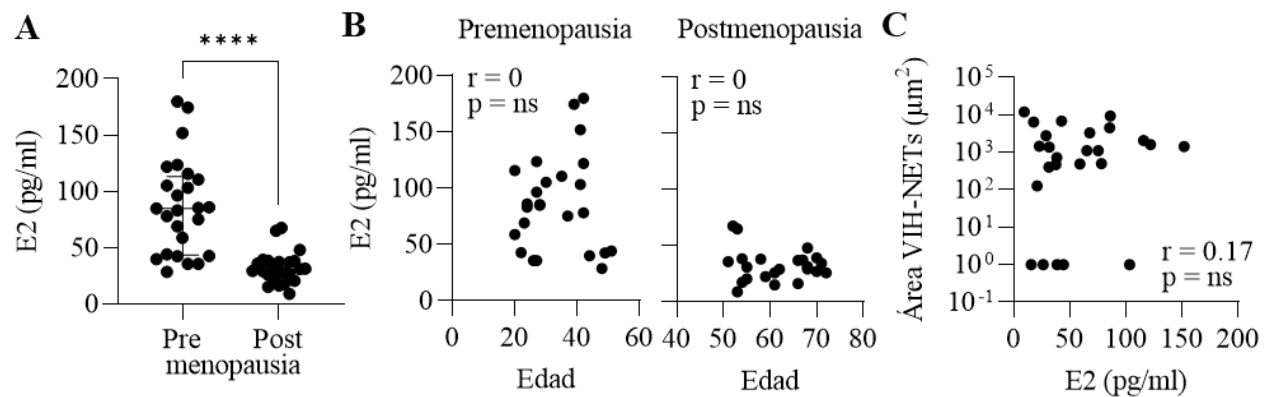


**Figura 3. El envejecimiento retrasa la liberación temprana de NETs en respuesta al VIH en sangre.**

(A) Cuantificación representativa de la liberación de NETs a lo largo del tiempo por mujeres premenopáusicas (círculos negros) y mujeres postmenopáusicas (círculos blancos) tras la estimulación con VIH (círculos). Los neutrófilos sin estimular (triángulos) se encuentran solapados en la parte inferior del gráfico. (B) Comparación de la liberación de NETs por neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas ( $n=18$ ) y postmenopáusicas ( $n=19$ ) a tiempos totales (0-2 h), tempranos (0-15 min) y tardíos (15min-2h). Representación de la mediana con rango intercuartílico. Se aplicó el test estadístico de Mann-Whitney. La línea vertical de puntos separa la cuantificación de NETs total de la liberación temprana y tardía. (C) Correlación de la liberación de NETs a tiempos tempranos (0-15 min) con la edad de las mujeres (premenopáusicas=18; postmenopáusicas=19) en sangre. Se aplicó la correlación de Spearman  $r$ . La línea vertical de puntos indica la menopausia.  $*p<0.05$

Para determinar si esta reducción en la liberación de NETs estaba directamente influenciada por las hormonas sexuales, medimos los niveles de estrógenos (E2) en muestras de plasma procedentes de 24 mujeres premenopáusicas y 25 mujeres postmenopáusicas, incluyendo 28 muestras que también fueron usadas para los experimentos de liberación de NETs (Fig. 4). Como se esperaba, las mujeres premenopáusicas mostraron niveles de E2 en plasma significativamente más altos que los detectados en mujeres postmenopáusicas (Fig. 4A). A continuación, analizamos los grupos de mujeres pre y postmenopáusicas de manera independiente para identificar si había correlación entre la edad y los niveles de E2. En las mujeres premenopáusicas, observamos que no había una correlación significativa entre la edad y los niveles de E2 (Fig. 4B). Este resultado es consistente con la alta variabilidad conocida tanto entre mujeres, como entre ciclos menstruales en la misma mujer [98, 135, 242-244]. Además, detectamos una amplia variabilidad en los niveles de E2 en mujeres en un rango de edad entre 40-50 años, con menores

niveles tras los 45 años. En el grupo de las mujeres postmenopáusicas, tampoco hubo una correlación significativa entre la edad y los niveles plasmáticos de E2, que se mantuvieron bajos y constantes (Fig. 4B). De manera importante, cuando correlacionamos los niveles de E2 en plasma de cada donante con la cuantificación de NETs tras estimular con VIH los neutrófilos sanguíneos, no hubo correlación significativa (Fig. 4C), indicando que la reducción de los niveles de estradiol en mujeres postmenopáusicas no influencia de manera directa la liberación de NETs inducida por estimulación con VIH.



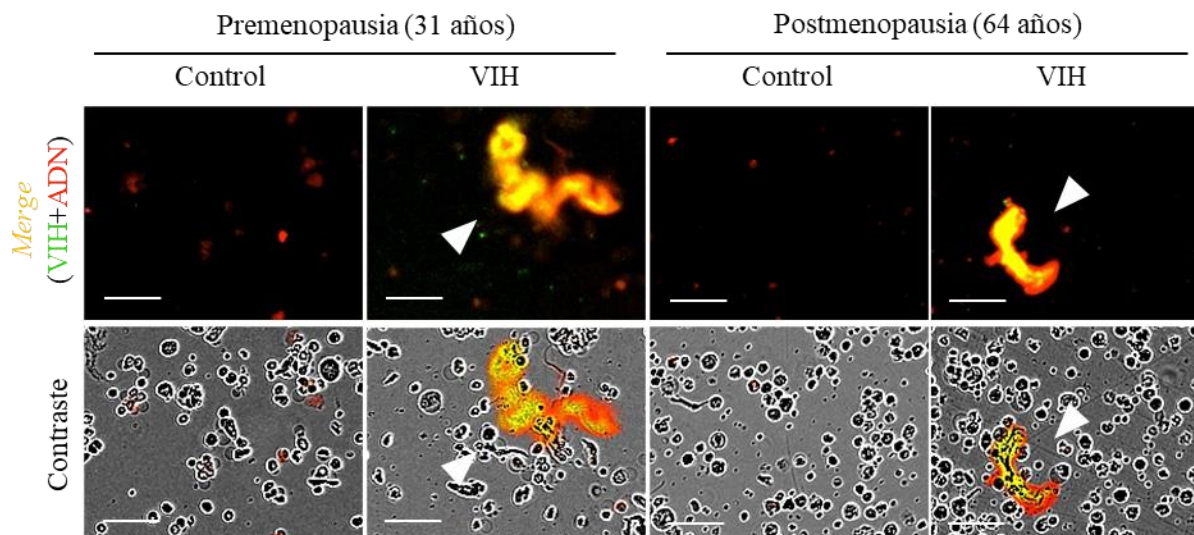
**Figura 4. Niveles de estradiol en plasma sanguíneo procedente de mujeres pre y postmenopáusicas.**

(A) Comparación de los niveles de estradiol en plasma entre mujeres premenopáusicas (n=25) y postmenopáusicas (n=24). Se aplicó el test estadístico de Mann-Whitney. (B) Correlación entre los niveles de estradiol y la edad en mujeres premenopáusicas (gráfico de la izquierda) y mujeres postmenopáusicas (gráfico de la derecha). Se aplicó la correlación de Spearman r bilateral. (C) Correlación entre los niveles de estradiol en plasma y la liberación temprana de NETs (15 minutos) tras la estimulación con VIH de neutrófilos sanguíneos purificados procedentes de mujeres pre y postmenopáusicas. Los valores de 0 fueron reemplazados por valores de 1. Se aplicó la correlación de Spearman r bilateral. \*\*\*\*p<0.0001.

## 1.2. Neutrófilos del tracto genital femenino

El siguiente paso fue investigar la liberación de NETs en neutrófilos del tracto genital (endometrio y cérvix) femenino (Fig. 5). De forma similar a lo que vimos en los neutrófilos sanguíneos, detectamos una disminución general en la liberación de NETs entre mujeres pre y postmenopáusicas.

Sin embargo, de forma contraria a lo que vimos en sangre, cuando cuantificamos la liberación de NETs temprana, tardía y total en múltiples donantes, no detectamos diferencias significativas entre mujeres pre y postmenopáusicas (Fig. 6A). No obstante, cuando se representó la liberación de NETs temprana frente a la edad de las mujeres, se observó que los neutrófilos del tracto genital femenino de mujeres postmenopáusicas disminuyeron significativa y progresivamente la liberación de NETs a medida que la edad de las mujeres aumentaba (Fig. 6B, círculos blancos;  $r=-0.66$ ,  $p=0.002$ ).



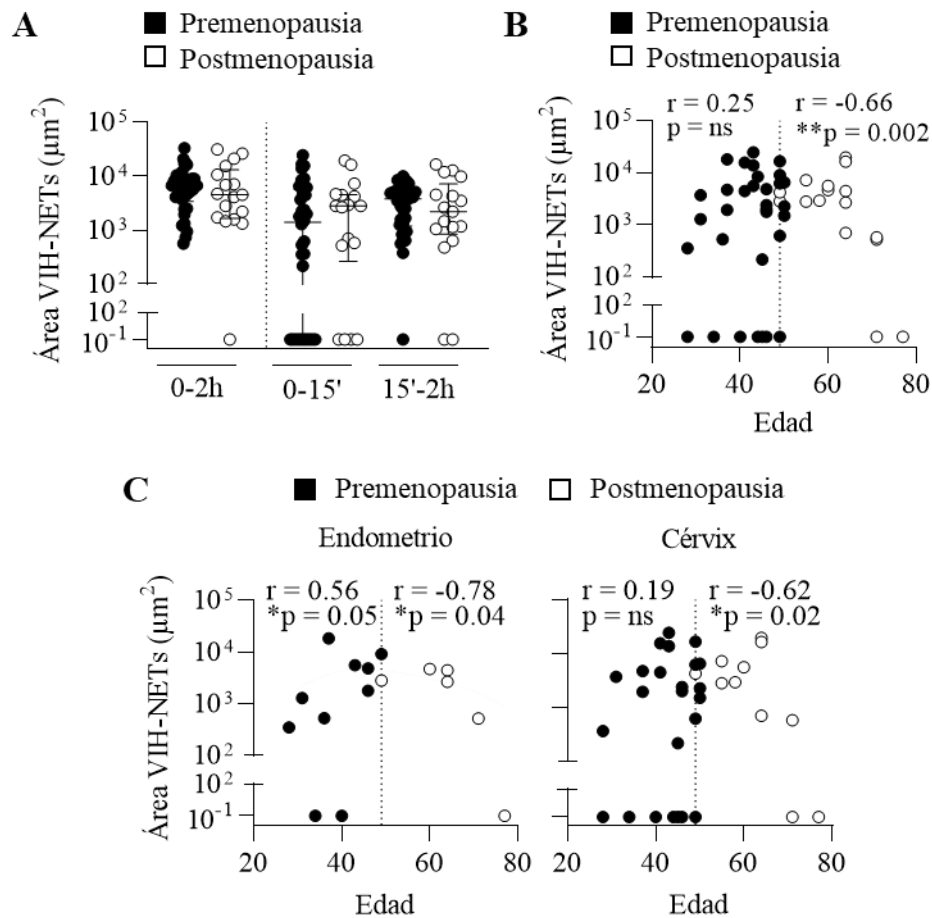
**Figura 5. Liberación de NETs por neutrófilos genitales de mujeres pre y postmenopáusicas.**

Detección de la formación de NETs tras 2h de estimulación con VIH. El ADN de los NETs se marcó en rojo con Cytotox y las PV-VIH en verde. La colocalización (*merge*) del verde y rojo se presenta en amarillo. Las flechas indican los NETs. Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente IncuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Para determinar si el envejecimiento afectaba de manera diferencial a los neutrófilos procedentes de distintas partes anatómicas del tracto genital femenino, estratificamos los resultados de la figura 6B según su región anatómica (endometrio y cérvix) en mujeres pre y postmenopáusicas. Como observamos en la figura 6C, los neutrófilos procedentes de endometrio y cérvix mostraron una correlación similar entre la liberación temprana de NETs y la edad en mujeres tras la menopausia (Fig. 6C).

De manera inesperada, la liberación de NETs por parte de neutrófilos del endometrio de mujeres premenopáusicas incrementó significativamente a medida que envejecían hasta que llegaban a la perimenopausia (Fig. 6C; gráfico a la izquierda), y la misma tendencia fue observada en el cérvix, probablemente este incremento en la liberación de NETs contribuyó a la falta de diferencias significativas entre mujeres pre y postmenopáusicas cuando las comparamos como grupo en la figura 6A.

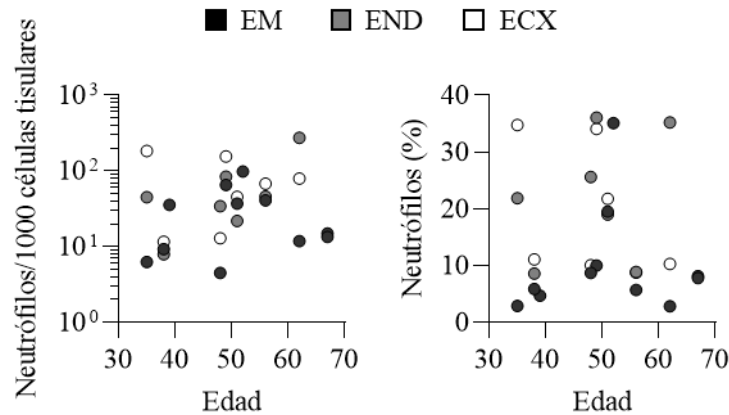
Para determinar si la correlación observada entre la reducción de NETs y el envejecimiento tras la menopausia estaba asociada con una disminución en el número de neutrófilos presentes en el tracto genital femenino, cuantificamos el número y el porcentaje de neutrófilos en los tejidos genitales por citometría de flujo, tal y como describimos en materiales y métodos.



**Figura 6. El envejecimiento tras la menopausia retrasa la liberación temprana de NETs en respuesta al VIH en el tracto reproductor femenino.**

(A) Comparación de la liberación de NETs por neutrófilos genitales de mujeres premenopáusicas ( $n=34$ ) y postmenopáusicas ( $n=17$ ) a tiempos totales (0-2 h), tempranos (0-15 min) y tardíos (15min-2h). Representación de la mediana con rango intercuartílico. Se aplicó el test estadístico de Mann-Whitney. (B) Correlación de la liberación temprana de NETs (0-15 min) con la edad de las mujeres (premenopáusicas=34; postmenopáusicas=17) en tejidos genitales y (C) separados según la región anatómica. \* $p<0.05$  \*\* $p<0.01$ .

Como observamos en la figura 7, tanto el número como el porcentaje de neutrófilos se mantuvo constante con el incremento de la edad en las diferentes secciones anatómicas del tracto genital femenino.



**Figura 7. Recuento de neutrófilos en las distintas regiones del tracto genital femenino.**

Correlación entre la edad de las mujeres y el número de neutrófilos (grafico de la izquierda) o el porcentaje de neutrófilos dentro de la población de células inmunológicas (CD45+) (grafico de la derecha) en el endometrio (n=11), endocérnix (n=7) y ectocérnix (n=7). \*p<0.05; \*\*p<0.01.

En resumen, estos resultados demuestran que el envejecimiento tras la menopausia afecta a la capacidad de los neutrófilos sanguíneos y genitales de responder frente al VIH liberando NETs.

## 2. TLR8 y TLR7 median la liberación de NETs temprana y tardía en respuesta al VIH de manera secuencial.

Debido a que los neutrófilos de mujeres postmenopáusicas demostraron un defecto en la liberación temprana de NETs tras la estimulación con VIH, investigamos mecanismos de reconocimiento del VIH por los neutrófilos para determinar si algunos de estos mecanismos estaban impedidos con el envejecimiento.

El genoma del VIH (ssRNA) es reconocido por TLR7/8 [224] y la estimulación de estos receptores resulta en la activación de los neutrófilos y en la liberación de NETs [143, 174, 245]. Por tanto, primero investigamos el papel de TLR7/8 en el reconocimiento del VIH por parte de los neutrófilos sanguíneos y genitales y su implicación en la liberación temprana de NETs.

### 2.1. Neutrófilos sanguíneos

Para llevar a cabo este estudio, incubamos los neutrófilos sanguíneos con inhibidores específicos de TLRs endosomales antes de la estimulación con VIH y cuantificamos la formación de NETs a lo largo del tiempo.

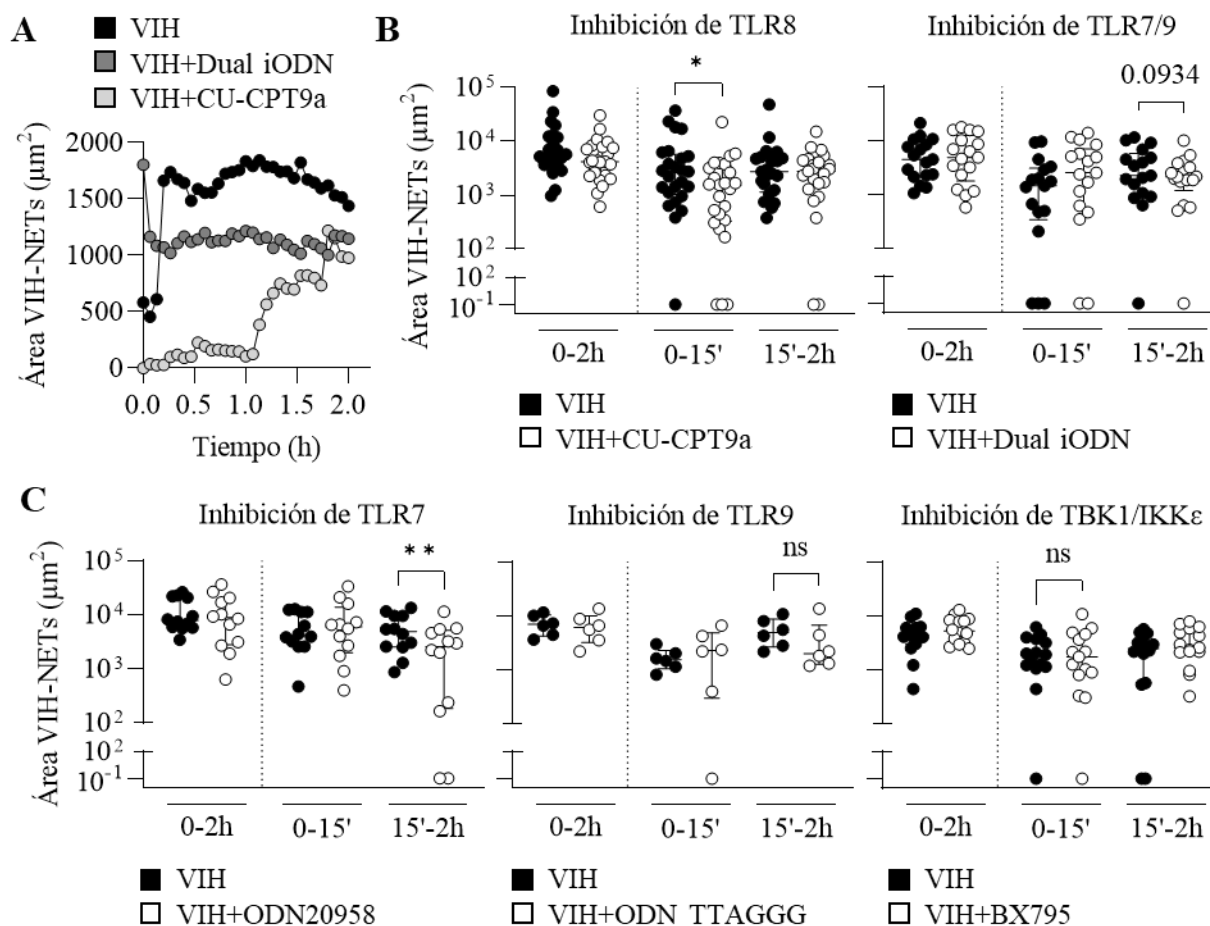


Para inhibir TLR8 utilizamos CU-CPT9a, un compuesto que se une específicamente a TLR8 y estabiliza su estado de reposo, previniendo un cambio conformacional de TLR8 a su estado activado [246]. Para inhibir TLR7, utilizamos el compuesto Dual iODN, el cual inhibe potentemente la señalización a través de TLR7 y TLR9, y ha sido anteriormente utilizado para bloquear dicha señalización en neutrófilos por otros autores [174]. En los neutrófilos sanguíneos, tal y como mostramos en la curva representativa (Fig. 8A), el inhibidor de TLR8 (CU-CPT9a) retrasó la liberación de NETs en comparación al control de estimulación con VIH sin inhibidor, mientras que la inhibición de TLR7/9 (Dual iODN) afectó la liberación de NETs a tiempos tardíos (Fig. 8A). Cuando cuantificamos en varias mujeres (CU-CPT9a: n=25; Dual iODN: n=17) la liberación de NETs inducida por VIH tras bloquear TLR8 con CU-CPT9a en neutrófilos sanguíneos, observamos una reducción significativa (mediana de reducción del 45%; p=0.03) a tiempos tempranos (0-15 min), sin mostrar cambios significativos a tiempos tardíos (15min-2h) (Fig. 8B, panel de la izquierda). En cambio, la inhibición de TLR7/9 con Dual iODN mostró una tendencia a la reducción de la liberación de los NETs a tiempos tardíos (Fig. 8B, panel de la derecha).

Debido a que Dual iODN inhibe TLR7 y TLR9, para determinar si el efecto observado proviene del bloqueo de TLR7 o de TLR9, utilizamos inhibidores específicos para TLR7 (ODN 20958) o TLR9 (ODN TTAGGG) y observamos una reducción significativa en la liberación tardía de NETs cuando TLR7 estaba bloqueado (Fig. 8C; mediana de reducción del 59%; p=0.007), pero el bloqueo de TLR9 no mostró ningún efecto (Fig. 8C).

Además, también se evaluó la contribución de otros PRRs capaces de detectar ARN viral citoplasmático. Para ello, bloqueamos TBK1/IKK $\epsilon$  antes de estimular los neutrófilos con VIH, dos quinasas homologas I $\kappa$ B que son indispensables para la cascada de señalización de los RLRs [247]. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la liberación de NETs (Fig. 8C, panel de la derecha).

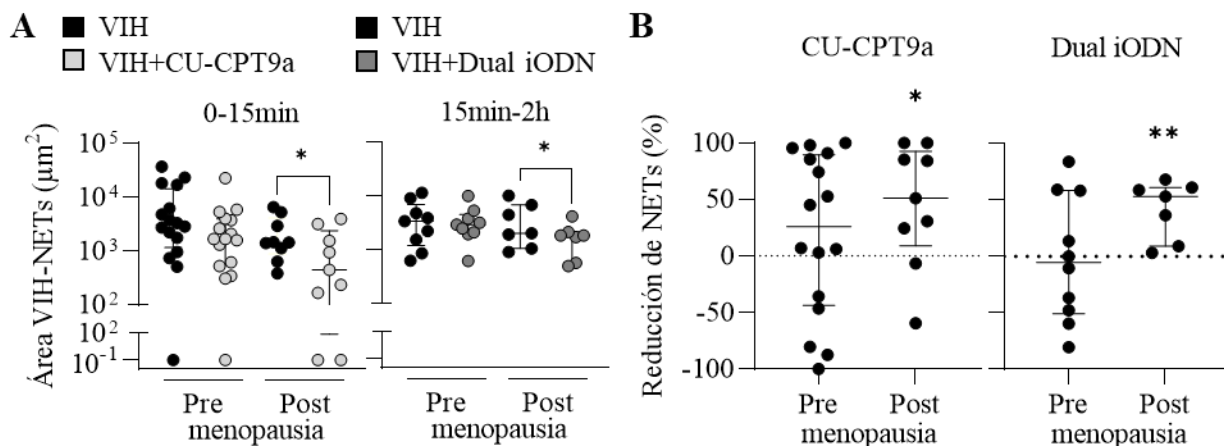
Para evaluar el efecto de la menopausia y el envejecimiento en el reconocimiento del VIH y la consecuente liberación de NETs en neutrófilos sanguíneos, estratificamos los datos obtenidos en la figura 8B en mujeres pre y postmenopáusicas. Hipotetizamos que las mujeres postmenopáusicas ya tendrían impedido el reconocimiento del VIH a través de TLRs y que, por ello, observaríamos un retraso en la liberación de NETs tras la exposición al VIH (Fig. 3). Sin embargo, la inhibición de TLR8 y de TLR7/9 redujo significativamente la liberación de NETs en el grupo de mujeres postmenopáusicas, y no mostró ningún efecto significativo en mujeres premenopáusicas (Fig. 9A).



**Figura 8. TLR8 y TLR7 median la liberación de NETs inducida por VIH en neutrófilos sanguíneos de manera secuencial.**

(A) Cuantificación representativa de la liberación de NETs inducida por VIH a lo largo del tiempo en presencia del inhibidor de TLR8 [CU-CPT9a (gris claro)], del inhibidor de TLR7/9 [Dual iODN (gris oscuro)] y en ausencia de inhibidores (negro). (B, C) Cuantificación de la liberación de NETs en múltiples donantes a tiempos totales (0-2h), tempranos (0-15 min) y tardíos (15min-2h) tras estimular los neutrófilos sanguíneos con VIH en presencia (blanco) o ausencia (negro) de inhibidores de TLRs o RLRs. Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. Se descartó 1 valor fuera de rango en la condición del inhibidor ODN 20958 al aplicar el test de Grubb's ( $\text{Alpha}=0.05$ ). \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

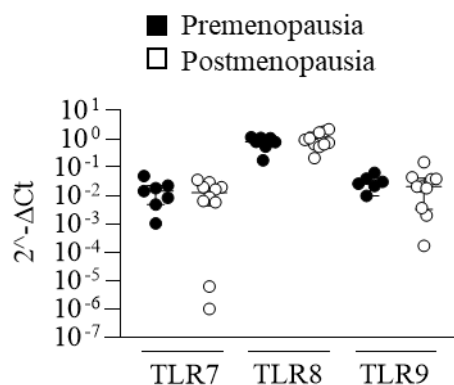
Además, la normalización de los NETs liberados tras la estimulación con VIH en presencia de los inhibidores frente a los NETs liberados en ausencia de los inhibidores (condición control), reveló que el porcentaje de la reducción de NETs era mayor en mujeres postmenopáusicas en comparación con mujeres premenopáusicas (Fig. 9B).



**Figura 9. Inhibición de TLR8 y TLR7/9 en neutrófilos sanguíneos de mujeres pre y postmenopáusicas.**

(A) Liberación de NETs por neutrófilos sanguíneos de mujeres pre y postmenopáusicas tras la inhibición de TLR8 (gráfico de la izquierda) y TLR7/9 (gráfico de la derecha). Se aplicó el test de Wilcoxon. (B) Porcentaje de la reducción de NETs inducidos por VIH tras la inhibición de TLR8 (gráfico de la izquierda) o TLR7/9 (gráfico de la derecha) con respecto a la estimulación de VIH en ausencia de inhibidores en neutrófilos de sangre de mujeres pre y postmenopáusicas. Se aplicó la prueba t de una muestra. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

A continuación, evaluamos la expresión de TLR7, TLR8 y TLR9 para determinar si las diferencias observadas en la señalización a través de TLRs entre mujeres pre y postmenopáusicas se debían a cambios dependientes de la edad en la expresión de estos receptores. Sin embargo, no detectamos diferencias significativas entre mujeres pre y postmenopáusicas, y TLR8 se expresaba a niveles más altos en comparación con los otros TLRs (Fig. 10), siendo estos resultados consistentes con lo anteriormente publicado por otros autores [154].



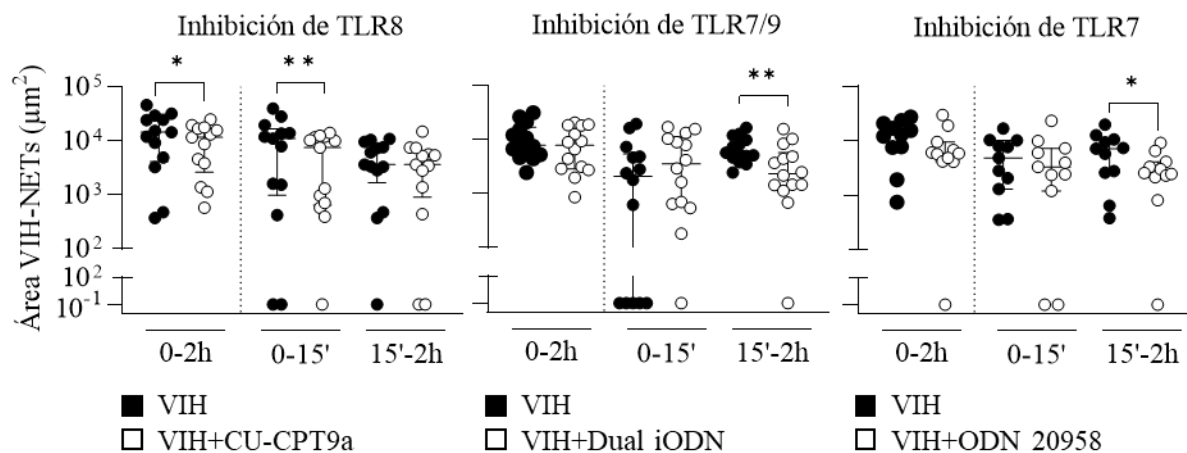
**Figura 10. Expresión de los TLR endosomales en neutrófilos de sangre de mujeres pre y postmenopáusicas.**

Expresión de los genes TLR7, TLR8 y TLR9 determinada por qPCR en neutrófilos de mujeres premenopáusicas ( $n=7$ ; negro) y postmenopáusicas ( $n=10$ ; blanco).

En resumen, nuestros hallazgos indican que el reconocimiento de VIH a través de TLR8 media la liberación temprana de NETs en neutrófilos sanguíneos, mientras que TLR7 media la liberación tardía de NETs, preferencialmente en mujeres postmenopáusicas. Además, nuestros resultados sugieren que las mujeres premenopáusicas poseen mecanismos alternativos independientes de TLRs endosomales que inducen la liberación de NETs en respuesta al VIH.

## 2.2. Neutrófilos del tracto genital femenino

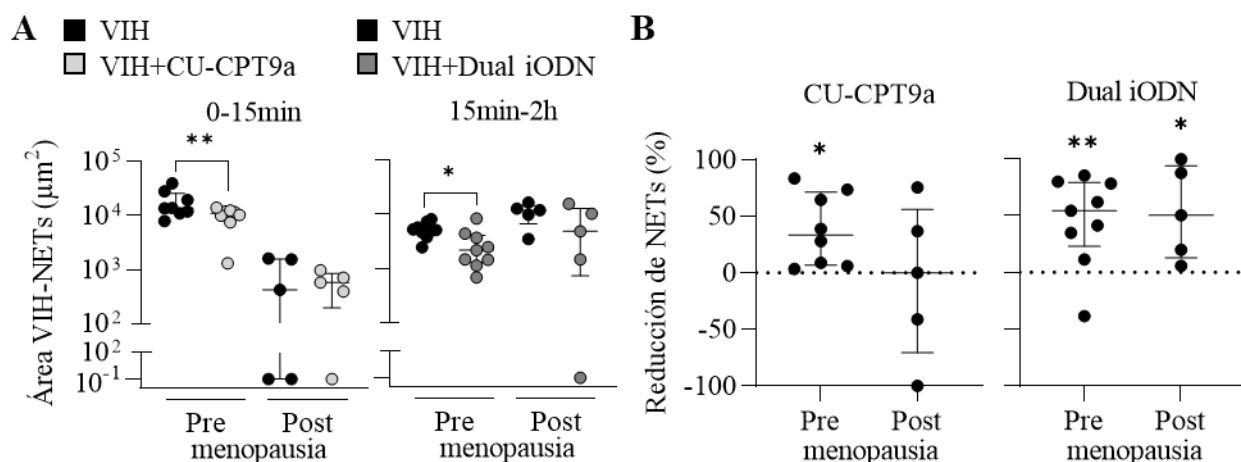
Nuestro siguiente paso fue evaluar el reconocimiento del VIH en el aparato genital femenino siguiendo el mismo diseño experimental que con neutrófilos sanguíneos. En los neutrófilos del tracto genital femenino, la inhibición de TLR8 redujo significativamente la liberación temprana de NETs (mediana de reducción del 28.2%;  $p=0.005$ ) (Fig. 11, panel de la izquierda), pero en una menor medida si lo comparamos con la reducción obtenida en neutrófilos sanguíneos (Fig. 8B, panel de la izquierda). La inhibición de TLR7/9 y TLR7 redujo significativamente la liberación tardía de NETs (mediana de reducción del 48%;  $p=0.002$ ) (Fig. 11).



**Figura 11. TLR8 y TLR7 median la liberación de NETs inducida por VIH en neutrófilos genitales de manera secuencial.**

Cuantificación de la liberación de NETs en múltiples donantes a tiempos totales (0-2h), tempranos (0-15 min) y tardíos (15min-2h) tras estimular los neutrófilos genitales con VIH en presencia (blanco) o ausencia (negro) de inhibidores de TLR8 (CU-CPT9a), TLR7/9 (Dual iODN), y TLR7 (ODN 20958). Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. Se descartó 1 valor fuera de rango en la condición del inhibidor de TLR7 (ODN 20958) al aplicar el test de Grubb's (Alpha=0.05). \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ .

A diferencia de lo observado en neutrófilos sanguíneos, cuando las mujeres pre y postmenopáusicas fueron analizadas por separado, los neutrófilos genitales de mujeres premenopáusicas redujeron significativamente la liberación de NETs temprana en respuesta a VIH cuando bloqueamos TLR8, y no detectamos ningún efecto en mujeres postmenopáusicas (Fig. 12A, panel de la izquierda), debido potencialmente a la baja respuesta temprana a VIH ya presentada por este grupo de mujeres. De manera similar, únicamente las mujeres premenopáusicas mostraron una reducción significativa en la liberación de NETs cuando bloqueamos TLR7/9 (Fig. 12A, panel de la derecha). La normalización de los NETs liberados tras la estimulación con VIH en presencia de los inhibidores frente a los NETs liberados en ausencia de los inhibidores demostró una reducción en el efecto de la inhibición de TLR8 en mujeres postmenopáusicas, mientras que la inhibición de TLR7 se mantuvo igualmente efectiva en neutrófilos genitales de mujeres pre y postmenopáusicas tratados con Dual iODN (Fig. 12B). Estos resultados sugieren que la liberación de NETs inducida por VIH en neutrófilos genitales se desencadena preferencialmente a través de TLR8 y TLR7 de manera secuencial, y que los mecanismos de señalización a través de TLR8 están impedidos en mujeres postmenopáusicas.



**Figura 12. Inhibición de TLR8 y TLR7/9 en neutrófilos genitales de mujeres pre y postmenopáusicas.**

(A) Liberación de NETs por neutrófilos genitales de mujeres pre y postmenopáusicas tras la inhibición de TLR8 (gráfico de la izquierda) y TLR7/9 (gráfico de la derecha). Se aplicó el test de Wilcoxon. (B) Porcentaje de la reducción de NETs inducidos por VIH tras la inhibición de TLR8 (gráfico de la izquierda) o TLR7/9 (gráfico de la derecha) con respecto a la estimulación de VIH en ausencia de inhibidores en neutrófilos genitales de mujeres pre y postmenopáusicas. Se aplicó la prueba t de una muestra. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

En resumen, estos datos demuestran que el VIH desencadena la liberación de NETs en neutrófilos sanguíneos y genitales a través de mecanismos diferentes, y que la menopausia impide específicamente las respuestas señalizadas a través de TLR8 en neutrófilos del tracto genital femenino.

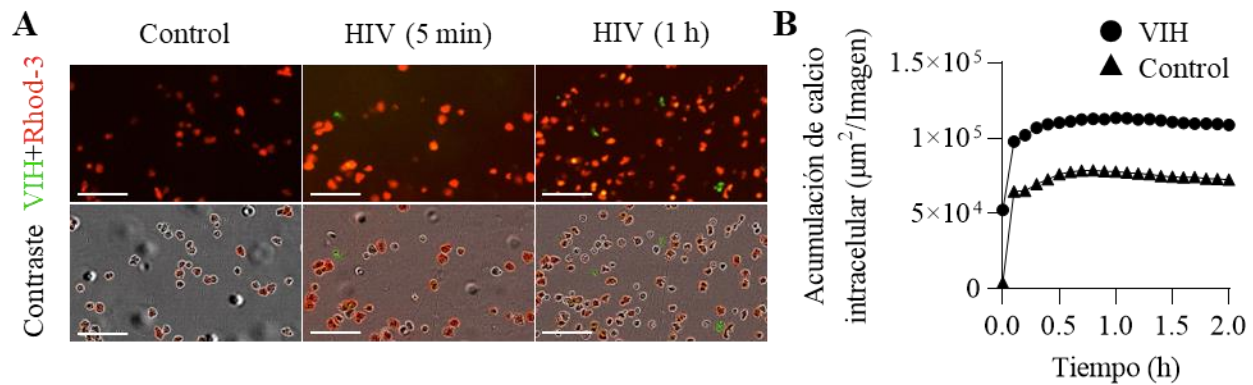
### **3. El VIH induce un incremento rápido del calcio intracelular en neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas.**

La ausencia de reducción de NETs inducidos por VIH tras la inhibición de TLR8 y TLR7 en neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas, sugirió la presencia de mecanismos alternativos al reconocimiento por TLRs involucrados en la liberación de NETs. Además, aunque el bloqueo de TLR8 y TLR7 resultó en una reducción significativa de la liberación temprana y tardía de NETs en neutrófilos sanguíneos de mujeres postmenopáusicas, la formación de NETs no fue completamente abolida, sugiriendo la existencia de mecanismos de activación adicionales. Por tanto, en este capítulo exploramos el papel potencial del calcio, el cual ha sido descrito como un mediador rápido de la liberación de NETs en respuesta a bacterias [186, 202, 248].

#### **3.1. Neutrófilos sanguíneos**

Los neutrófilos sanguíneos se pre-incubaron con un reactivo fluorescente conocido como Rhod-3 AM que marca el calcio (rojo). Cuando el reactivo entra dentro de la célula, las esterasas celulares escinden el grupo AM, atrapando el colorante en el interior de la célula y convirtiéndolo en fluorescente. La intensidad de fluorescencia del colorante aumenta a medida que el calcio se une.

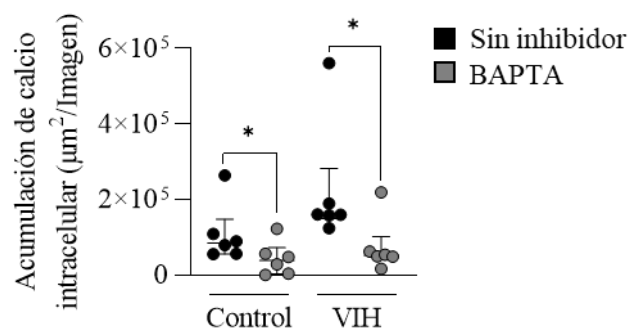
Medimos los niveles de calcio intracelular en neutrófilos estimulados con VIH y sin estimular. Como vemos en la figura 13A, la señal fluorescente emitida por los niveles intracelulares de calcio estaba incrementada después de estimular los neutrófilos con VIH en comparación con los neutrófilos sin estimular. La cuantificación de esta señal mostró un rápido incremento de los niveles de calcio en los 5 primeros minutos tras la exposición al VIH, generando un pico de máxima señal a los 20 min, aproximadamente, que se mantuvo en el tiempo (Fig. 13B).



**Figura 13. Inducción del calcio intracelular en neutrófilos sanguíneos tras la estimulación con VIH.**

(A) Imágenes representativas del incremento del calcio intracelular (Rhod-3 AM) en neutrófilos sanguíneos tras la estimulación con VIH (verde). Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente IncuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 100µm. (B) Cuantificación representativa del calcio intracelular en neutrófilos sanguíneos estimulados con VIH (círculos) o sin estimular (triángulos).

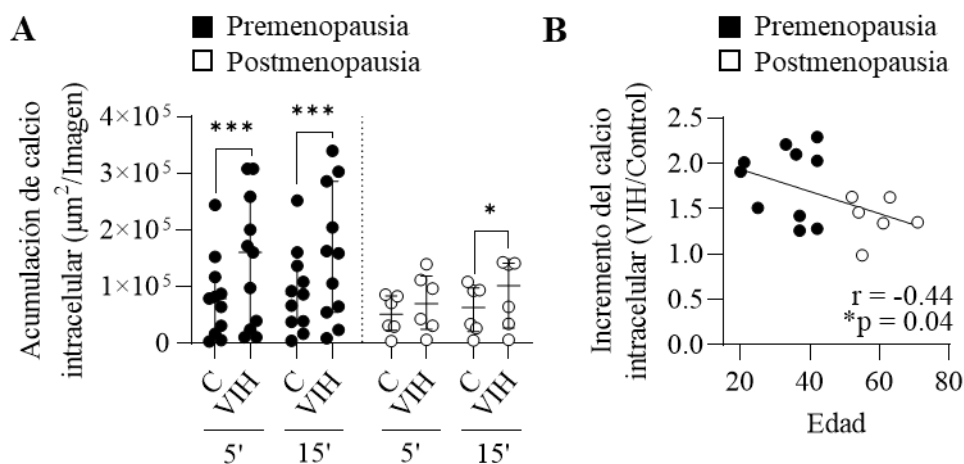
Como control adicional para confirmar que la estimulación con VIH era responsable de este incremento del calcio intracelular detectado, incubamos los neutrófilos con BAPTA, un quelante de calcio, antes de exponer los neutrófilos al VIH. Como se observa en la figura 14, el tratamiento con BAPTA redujo significativamente los niveles de calcio intracelular en ausencia de VIH, y abolió por completo la señal de calcio citosólico en respuesta a VIH.



**Figura 14. BAPTA bloquea la señal de calcio intracelular en neutrófilos estimulados y sin estimular.**

Comparación de los niveles de calcio intracelular en ausencia (negro) o presencia (gris) de BAPTA en neutrófilos sanguíneos sin estimular y estimulados con VIH (5 min de estimulación). Se aplicó el test de Wilcoxon. \*p<0.05.

El siguiente paso fue comparar los neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas frente a los de mujeres postmenopáusicas. Los neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas incrementaron significativamente los niveles citosólicos de calcio 5 min después de la estimulación con VIH en comparación con la condición control, y esta diferencia se mantuvo significativa a los 15 min (Fig. 15A, círculos negros). De manera contraria, los neutrófilos sanguíneos de mujeres postmenopáusicas no incrementaron significativamente los niveles de calcio intracelular hasta 15 min después de la estimulación con VIH, mostrando además un incremento menor sobre la condición control que los neutrófilos de mujeres premenopáusicas (Fig. 15A, círculos blancos). A continuación, investigamos si este incremento del calcio intracelular tras la estimulación con VIH se veía afectado con la edad tras la menopausia. Detectamos una significativa correlación negativa entre el incremento del calcio intracelular en respuesta al VIH respecto a los neutrófilos sin estimular con la edad de las mujeres donantes (Fig. 15B;  $r=-0.44$ ;  $p=0.04$ ).



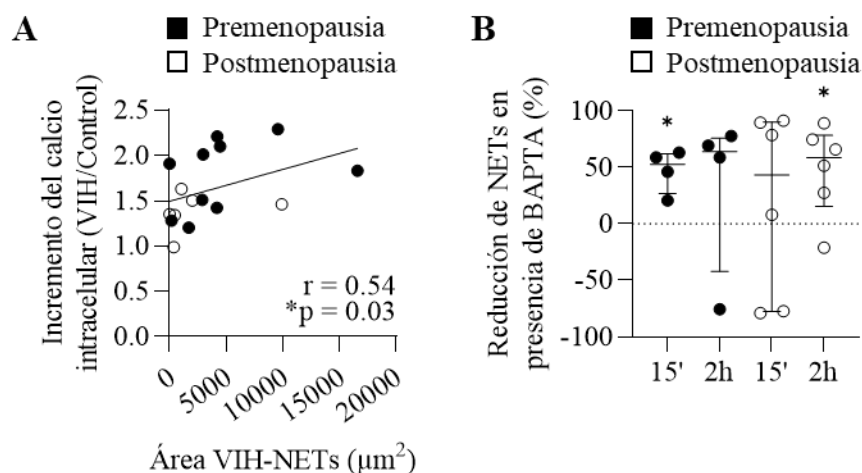
**Figura 15. El envejecimiento compromete la respuesta de calcio a la estimulación con VIH.**

(A) Cuantificación de los niveles intracelulares de calcio en neutrófilos de mujeres pre ( $n=11$ ; negro) y postmenopáusicas ( $n=6$ ; blanco) tras 5 y 15 min de estimulación con VIH. Se aplicó el test de Wilcoxon. (B) Correlación entre la edad y el incremento del calcio citosólico tras 5 min de estimulación con VIH. Se aplicó la correlación de Spearman  $r$  unilateral. \* $p<0.05$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

Para determinar si los niveles de calcio citosólico estaban asociados con la liberación temprana de NETs, cuantificamos los NETs liberados en los primeros 15 min de estimulación con VIH y los correlacionamos con el incremento en los niveles de calcio tras la estimulación sobre los niveles de calcio de los neutrófilos sin estimular. Como vemos en la figura 16A, la representación de estos datos mostró una significativa correlación positiva entre la liberación temprana de NETs y los niveles intracelulares de calcio tras la estimulación con VIH ( $r=0.54$ ;  $p=0.03$ ).



Este resultado sugiere que los niveles de calcio intracelular median la liberación temprana de NETs en las mujeres más jóvenes. Para demostrar esta hipótesis, cuantificamos la liberación de NETs en presencia de BAPTA en neutrófilos sanguíneos de mujeres pre y postmenopáusicas, y detectamos una reducción significativa de los NETs liberados a tiempos tempranos en respuesta al VIH únicamente en mujeres premenopáusicas (Fig. 16B; mediana de reducción del 53% a los 15 min); sin embargo, en mujeres postmenopáusicas detectamos un retraso en la reducción de la liberación de NETs, que fue significativo a tiempos tardíos (Fig. 16B; mediana de reducción del 59% a las 2 h). Estos datos demuestran que la liberación temprana de NETs en los neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas se desencadena tras un incremento en los niveles intracelulares de calcio, pero esta respuesta se retrasa en mujeres postmenopáusicas.

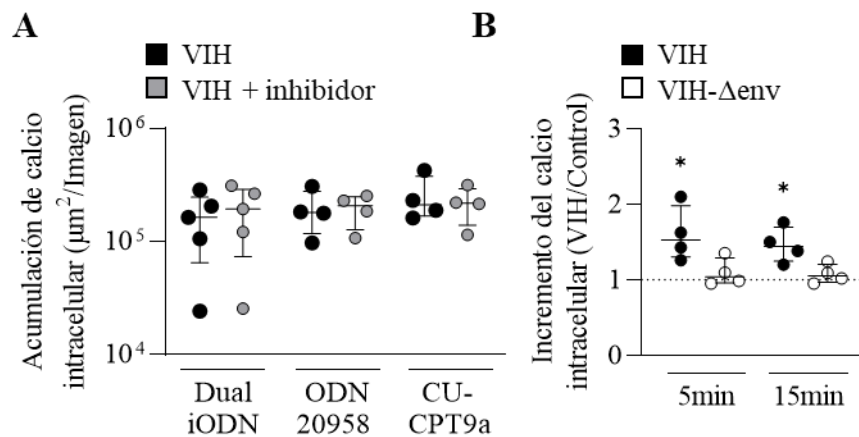


**Figura 16. La liberación temprana de NETs inducida por VIH es dependiente de calcio.**

(A) Correlación entre la liberación temprana de NETs y el incremento en los niveles intracelulares de neutrófilos sanguíneos tras 5 min de estimulación con VIH. Se aplicó la correlación de Spearman  $r$  bilateral. (B) Porcentaje de reducción de los NETs inducidos por VIH en presencia de BAPTA en neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas (negro) y postmenopáusicas (blanco). Se aplicó la prueba  $t$  de una muestra.  $*p < 0.05$ .

Para determinar si el incremento del calcio citosólico en respuesta al VIH era el resultado de un reconocimiento del VIH a través de los TLRs endosomales, medimos los niveles del calcio intracelular en los neutrófilos sanguíneos estimulados con VIH y previamente tratados con inhibidores de TLRs. Curiosamente, no observamos cambios significativos en los niveles del calcio intracelular en ausencia y presencia de los inhibidores de TLR7/9 (Dual iODN), TLR7 (ODN 20958) o TLR8 (CU-CPT9a) cuando estimulamos los neutrófilos sanguíneos con VIH (Fig. 17A), indicando que el incremento de calcio no es desencadenado a través de los receptores endosomales tras el reconocimiento del virus.

Además del reconocimiento del ARN viral a través de TLRs endosomales, la envoltura del VIH puede ser reconocida por las células a través de los receptores clásicos de VIH (CD4, CCR5 y CXCR4) o de inmunoreceptores (receptores Fc o del complemento, que reconocerían el VIH tras ser opsonizado por anticuerpos o moléculas del complemento, respectivamente). Para determinar si el aumento de calcio provenía del reconocimiento de la envoltura viral, utilizamos PV-VIH que fueron modificadas para no expresar la envoltura (VIH- $\Delta env$ ). Esto nos permitió comparar los niveles de calcio de los neutrófilos tras estimularlos con VIH en presencia y ausencia de esta estructura. Como vemos en la figura 17B, los niveles de calcio intracelular se incrementaron significativamente en respuesta a las PV-VIH que presentaban las proteínas de la envoltura en comparación con los neutrófilos sin estimular, y no se detectaron cambios en los niveles de calcio en aquellos neutrófilos que fueron estimulados con las PV-VIH sin las proteínas de la envoltura (VIH- $\Delta env$ ), indicando que la respuesta del calcio está dirigida por las proteínas de la envoltura del VIH, y no por su genoma viral de ARN.



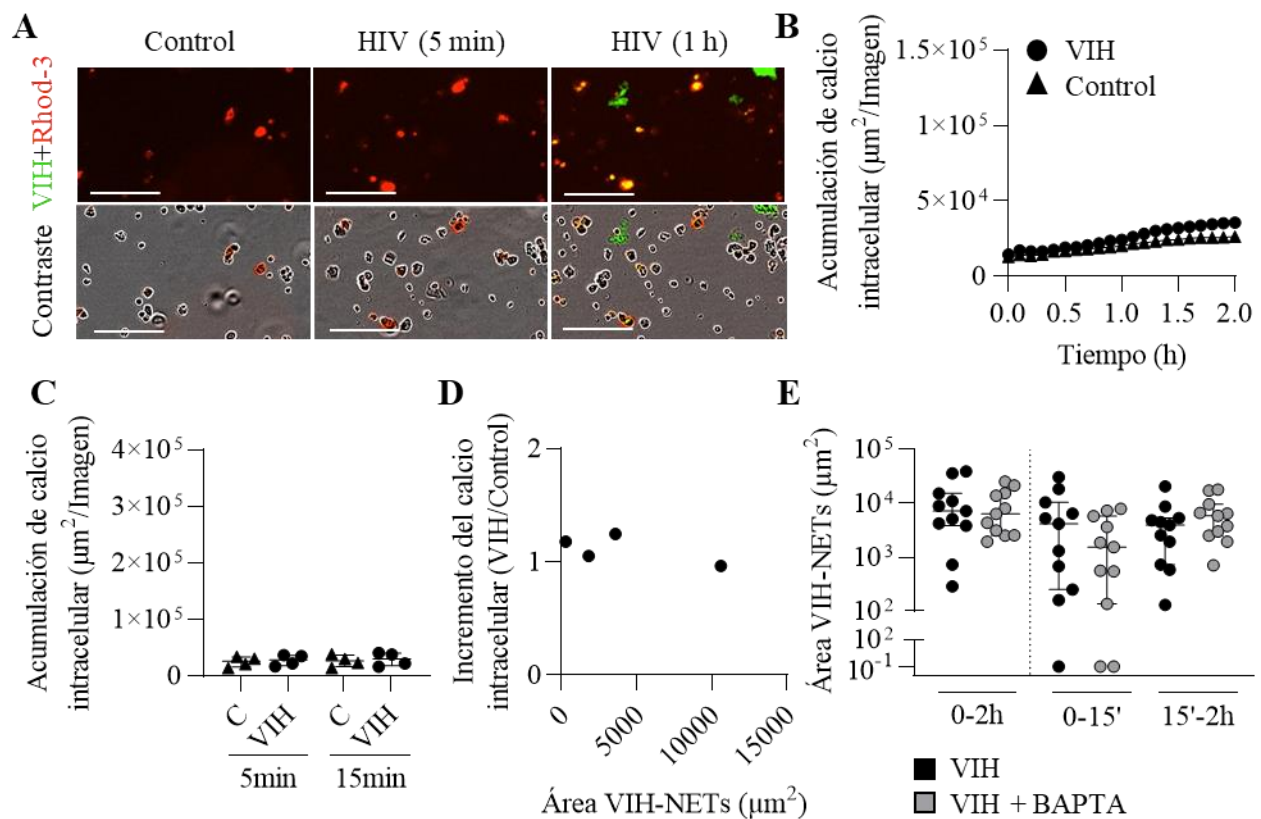
**Figura 17. El incremento de calcio es dependiente del reconocimiento de la envoltura del VIH.**

(A) Ausencia de diferencias en la señal de calcio intracelular en neutrófilos sanguíneos tratados (gris) y sin tratar (negro) con inhibidores de TLR antes de la estimulación con VIH. (B) Incremento del calcio citosólico en neutrófilos sanguíneos estimulados con VIH en presencia de las proteínas de la envoltura (negro) y en ausencia de dichas proteínas (blanco). Se aplicó la prueba t de una muestra. \* $p < 0.05$ .

### 3.2. Neutrófilos del tracto genital femenino

Dados los resultados anteriores, investigamos la respuesta de calcio en los neutrófilos genitales. Para ello, purificamos neutrófilos genitales, tal y como hemos descrito en materiales y métodos, y cuantificamos los niveles de calcio intracelulares en presencia y ausencia de VIH. Como vemos en la figura 18A, se detectaron niveles muy bajos de calcio intracelular en los neutrófilos genitales tras la estimulación con VIH. La cuantificación de la señal de calcio demostró una ausencia de respuesta de calcio intracelular

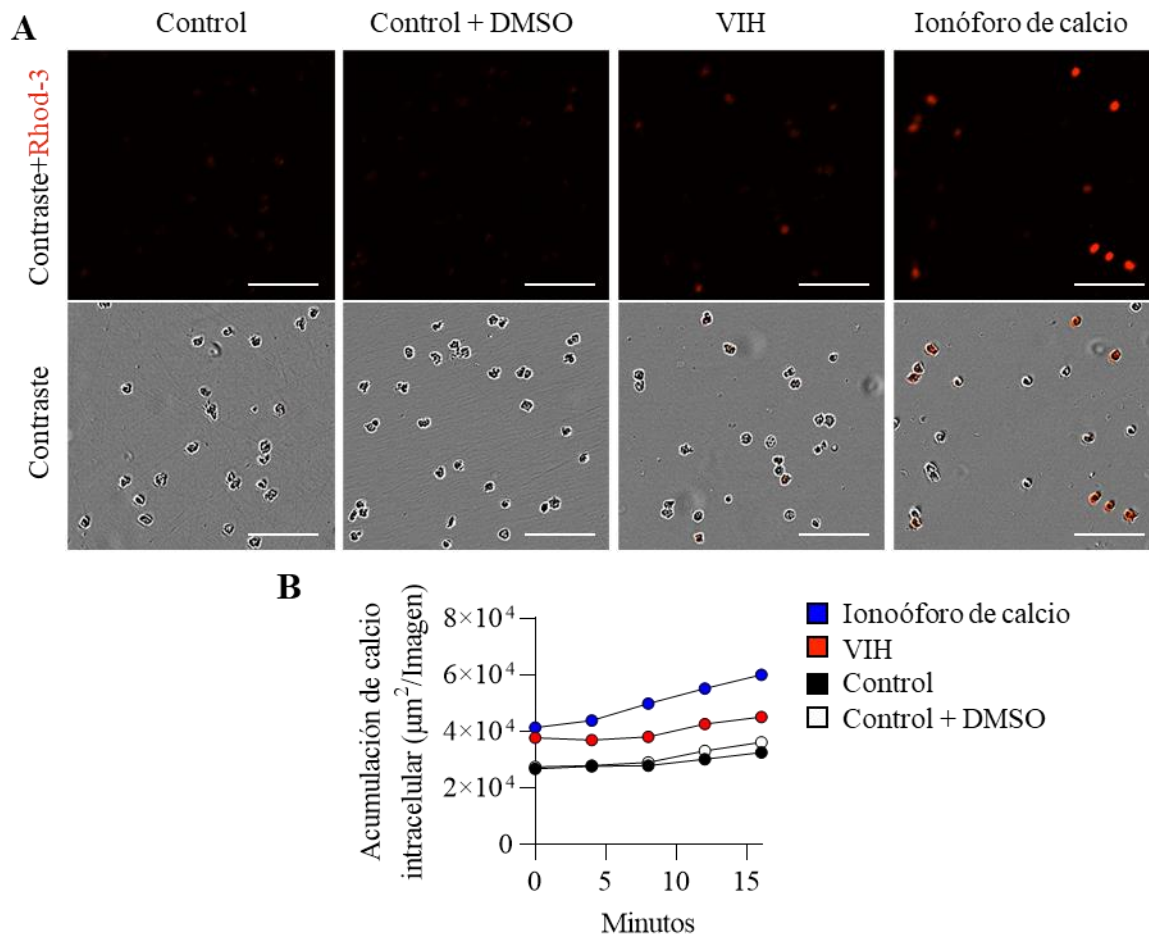
cuando comparamos los neutrófilos estimulados con VIH frente a los no estimulados (Fig. 18B). Cuando analizamos esta señal en varias donantes (n=4), no detectamos incremento en los niveles de calcio tras estimular con VIH (Fig. 18C). No obstante, fue destacable que, aunque la estimulación con VIH no incrementó los niveles citosólicos de calcio en neutrófilos genitales, estos neutrófilos mantuvieron intacta su capacidad para liberar NETs (Fig. 18A; verde), y no encontramos ninguna correlación entre los NETs liberados y los niveles de calcio intracelular detectados (Fig. 18D). Adicionalmente, el bloqueo de calcio con BAPTA no afectó la liberación de NETs (Fig. 18E), indicando que el calcio no es un mediador para la liberación de NETs en respuesta al VIH en neutrófilos genitales.



**Figura 18. Los neutrófilos genitales no incrementan los niveles intracelulares de calcio tras la estimulación con VIH.**

(A) Imágenes representativas de la tinción del calcio (Rhod-3 AM) en neutrófilos genitales estimulados con VIH y sin estimular. Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente InCuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 100 $\mu\text{m}$ . (B) Cuantificación representativa del calcio intracelular en neutrófilos genitales tras la estimulación con VIH. (C) Cuantificación de los niveles de calcio intracelular en neutrófilos genitales tras la estimulación con VIH (círculos) y sin estimular (triángulos). (D) Ausencia de correlación entre la liberación temprana de NETs y el incremento de calcio citosólico tras la estimulación con VIH en neutrófilos genitales. (E) Cuantificación de NETs liberados a tiempos totales (0-2 h), tempranos (0-15 min), y tardíos (15min-2h) al estimular con VIH en presencia (gris) o ausencia (negro) de BAPTA. Representación de la mediana con rango intercuartílico. Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon.

Sin embargo, cuando estimulamos neutrófilos genitales con ionóforo de calcio, observamos que se producía un incremento en los niveles intracelulares de calcio superior al obtenido cuando estimulamos con VIH, indicando que la falta de señal de calcio en respuesta al VIH es específica del estímulo (Fig. 19 A-B). No obstante, estos niveles citoplasmáticos de calcio fueron inferiores que los niveles intracelulares de calcio de los neutrófilos sanguíneos tras la estimulación con VIH.



**Figura 19. Los neutrófilos genitales incrementan el calcio citosólico tras la estimulación con ionóforo de calcio.**

(A) Imágenes representativas de la tinción del calcio (Rhod-3 AM) en neutrófilos genitales estimulados con VIH y su control sin estimulación (15 min), y estimulados con ionóforo de calcio y su control sin estimulación con DMSO (15 min). Barra de escala: 100 µm. Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente InCuCyte (aumento, 10x). (B) Cuantificación representativa del calcio intracelular en neutrófilos genitales tras estimular con VIH, ionóforo de calcio y sus controles.

En resumen, estos hallazgos indican diferencias fundamentales en los mecanismos involucrados en neutrófilos sanguíneos y genitales para la liberación de NETs en respuesta al VIH, con un incremento del calcio intracelular, desencadenado exclusivamente en neutrófilos sanguíneos, tras el reconocimiento de la envoltura del VIH de manera dependiente de la edad.

## 4. La estimulación con VIH induce la producción de ROS a través de diferentes mecanismos en neutrófilos sanguíneos y genitales.

A continuación, investigamos la producción de las especies reactivas del oxígeno como un posible mediador adicional de los efectos observados, las cuales han sido implicadas en la liberación de NETs en respuesta a múltiples estímulos, incluyendo al VIH [143, 174].

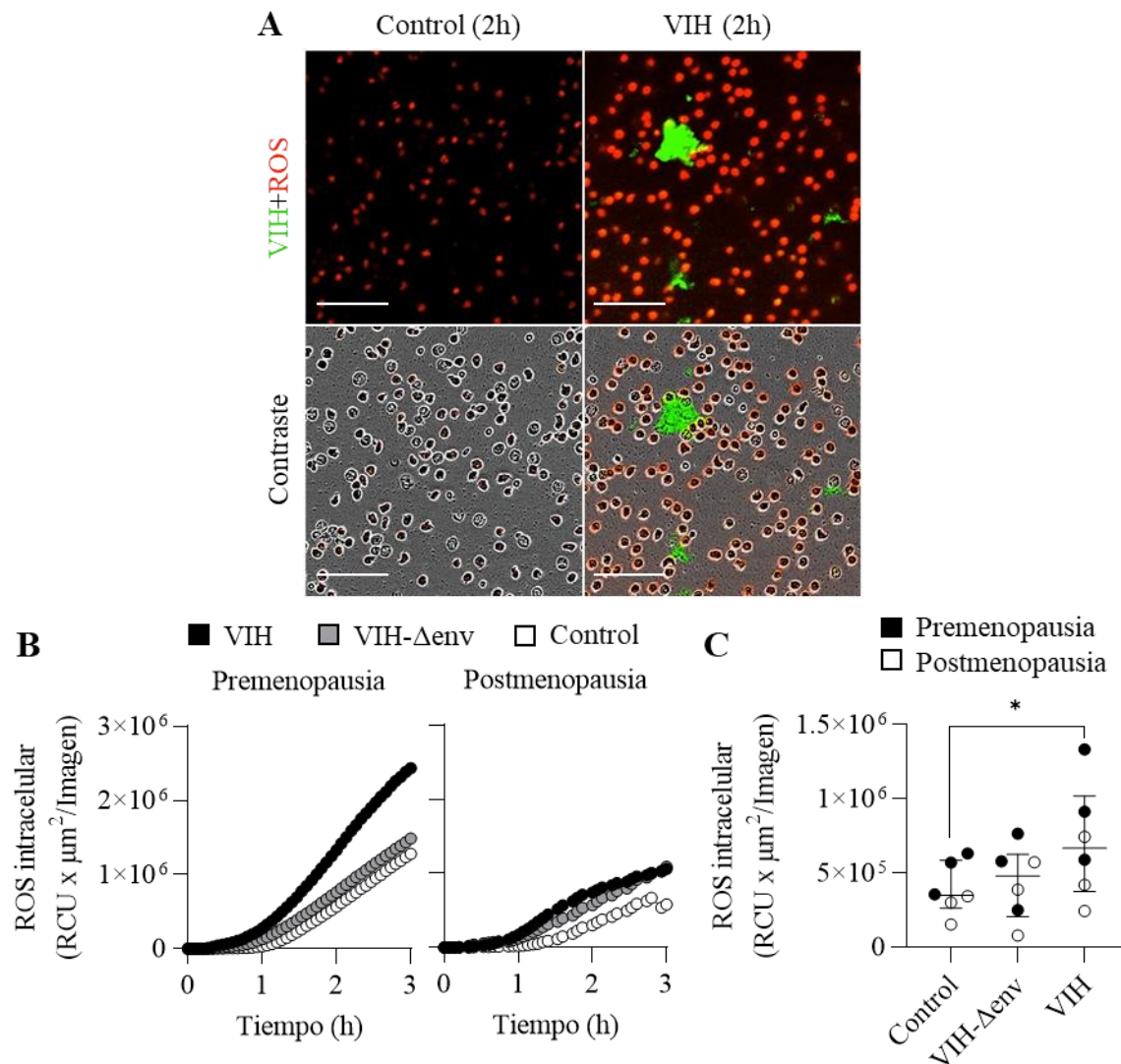
### 4.1. Neutrófilos sanguíneos

Para visualizar y medir la producción de ROS intracelular en presencia y ausencia de VIH, los neutrófilos sanguíneos fueron incubados con CellROX *Deep Red*, un reactivo permeable que se vuelve fluorescente (rojo) cuando es oxidado por ROS a nivel intracelular. Como se observa en la figura 20A, la estimulación con VIH incrementó la producción del ROS en los neutrófilos sanguíneos en comparación con la condición en reposo. De acuerdo con los resultados obtenidos en el apartado anterior, la estimulación con VIH indujo una respuesta de calcio significativamente menor en mujeres postmenopáusicas en comparación con mujeres premenopáusicas. Además, observamos que dicha respuesta de calcio se desencadenaba tras el reconocimiento de la envoltura del VIH. Por lo tanto, en esta sección, analizamos si existen diferencias en la respuesta de ROS tras estimular con VIH entre estos dos grupos de mujeres, así como el papel que juega la envoltura viral. Para ello, cuantificamos la producción de ROS intracelular en mujeres pre y postmenopáusicas tras la estimulación con PV-VIH con y sin las proteínas de la envoltura.

La cuantificación del ROS intracelular reveló un incremento en su producción a partir de una hora tras la estimulación con VIH en comparación con la condición control, tanto en mujeres pre y postmenopáusicas. Sin embargo, las mujeres premenopáusicas mostraron un incremento mayor en los niveles citosólicos de ROS en comparación con las mujeres postmenopáusicas (Fig. 20B). Además, detectamos que la estimulación con VIH sin la envoltura viral no supuso un incremento significativo de los niveles intracelulares de ROS, mostrando unos valores similares al control o a los obtenidos en mujeres postmenopáusicas tras estimular con el VIH en presencia de la envoltura (Fig. 20B-C).

Debido a que la producción del ROS y del calcio intracelular parecen ser dependientes del reconocimiento de la envoltura del VIH, investigamos si el incremento de calcio podría estar desencadenando el incremento del ROS intracelular en respuesta al VIH. Por tanto, medimos el ROS citosólico en los neutrófilos que fueron pre-incubados con BAPTA, y usamos DPI (un inhibidor de la NADPH oxidasa) como control positivo para bloquear la producción de ROS. De manera interesante, encontramos que BAPTA redujo significativamente los niveles de ROS intracelular cuando los neutrófilos

fueron estimulados con VIH, y esta reducción fue de una magnitud similar a la que obtuvimos tras la inhibición de la NADPH oxidasa usando DPI (Fig. 21A).

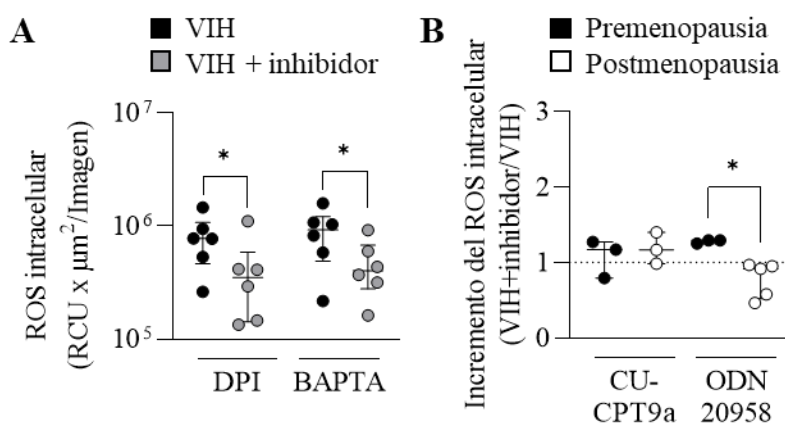


**Figura 20. La estimulación con VIH induce la producción de ROS en neutrófilos sanguíneos a través de las proteínas de la envoltura.**

(A) Imágenes representativas de neutrófilos sanguíneos teñidos con el reactivo CellROX (rojo) previa estimulación con VIH (verde). Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente IncuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . (B) Cuantificación representativa de la producción de ROS intracelular por neutrófilos sanguíneos de mujeres pre (panel de la izquierda) y postmenopáusicas (panel de la derecha) en la condición sin estimular (blanco), o tras la estimulación con VIH (negro) o VIH sin las proteínas de la envoltura (VIH- $\Delta\text{env}$ , gris). (C) Producción del ROS intracelular por neutrófilos sanguíneos de mujeres pre (negro) y postmenopáusicas (blanco) sin estimular y estimulados con VIH o con VIH sin las proteínas de la envoltura. Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. \* $p < 0.05$ . RCU: «red calibrated units» o unidades calibradas para la señal en rojo.

De manera interesante, encontramos que BAPTA redujo significativamente los niveles de ROS intracelular cuando los neutrófilos fueron estimulados con VIH, y esta reducción fue de una magnitud similar a la que obtuvimos tras la inhibición de la NADPH oxidasa usando DPI (Fig. 21A).

Estos resultados sugieren que el incremento intracelular de calcio desencadena la producción de ROS. Finalmente, para determinar si el reconocimiento del VIH a través de TLRs endosomales induce la activación de NOX2 y la producción de ROS, medimos el ROS intracelular en neutrófilos sanguíneos tratados con el inhibidor de TLR7 (ODN 20958) y de TLR8 (CU-CPT9a). Únicamente la inhibición de TLR7 redujo la producción de ROS en respuesta a la estimulación con VIH en neutrófilos sanguíneos de mujeres postmenopáusicas, pero no se detectó ningún efecto en neutrófilos sanguíneos de mujeres premenopáusicas o en mujeres (de cualquier edad) tras el bloqueo de TLR8 (Fig. 21B).



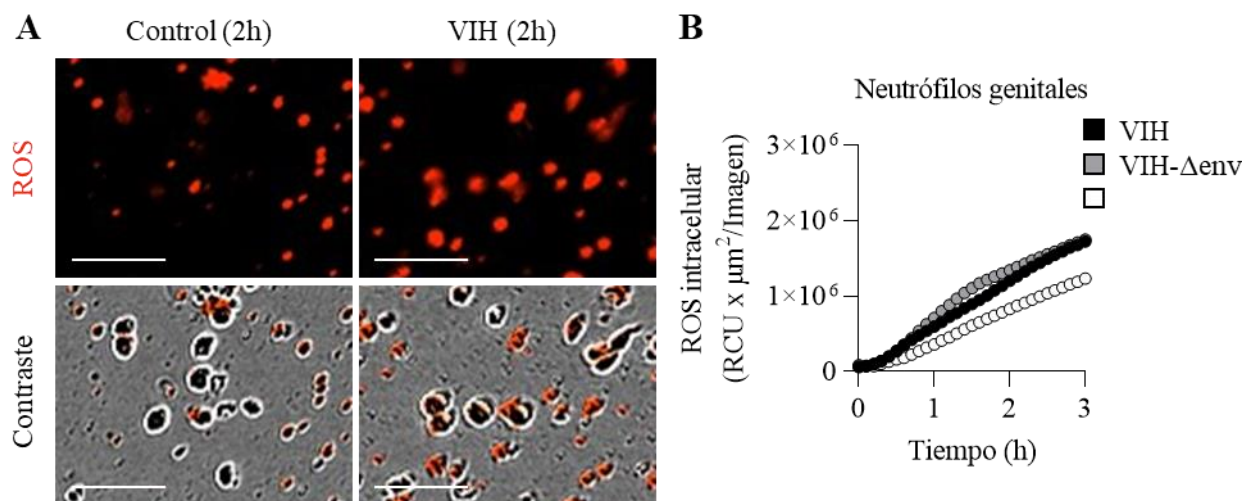
**Figura 21. La producción de ROS es dependiente de calcio y de TLR7 en mujeres postmenopáusicas.**

(A) Producción de ROS intracelular por neutrófilos sanguíneos tras 2h de estimulación con VIH en ausencia (negro) y presencia del inhibidor de la NADPH oxidasa (DPI) o de un quelante de calcio (BAPTA) (gris). Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. (B) Incremento de los niveles de ROS intracelular tras 2h de estimulación con VIH en presencia de los inhibidores de TLR ((VIH + inhibidor de TLRs)/VIH) en neutrófilos sanguíneos de mujeres pre (negro) y postmenopáusicas (blanco). Se aplicó el test estadístico de Mann-Whitney U. \* $p < 0.05$ . RCU: «red calibrated units» o unidades calibradas para la señal en rojo.

Estos resultados indican que, en los neutrófilos de sangre, el incremento de calcio inducido por VIH desencadena la producción de ROS de una manera independiente de TLRs y preferencialmente en mujeres premenopáusicas, mientras que, en mujeres postmenopáusicas, la producción de ROS se induce preferencialmente por una señal inducida por VIH a través de TLR7.

## 4.2. Neutrófilos del tracto genital femenino

Seguidamente, investigamos los neutrófilos de la mucosa genital. Para evaluar la producción de ROS intracelular, purificamos neutrófilos del tracto genital femenino tal y como describimos en materiales y métodos, y cuantificamos la señal de ROS en presencia y ausencia de VIH. Como se visualiza en la figura 22, los neutrófilos genitales aumentaron la producción de ROS intracelular tras la estimulación con VIH en comparación con los neutrófilos sin estimular, y esta señal de ROS se detectó a partir de los 30 min (Fig. 22B), de manera más temprana que la respuesta detectada en los neutrófilos sanguíneos (Fig. 20B). Además, de manera contraria a lo que observamos en neutrófilos sanguíneos, la producción de ROS no era dependiente de la envoltura del VIH, debido a que no encontramos diferencias en los niveles de ROS cuando estimulamos los neutrófilos genitales con PV-VIH con y sin las proteínas de la envoltura (Fig. 22B), sugiriendo que la producción de ROS podría estar inducida tras la activación de los TLR endosomales.



**Figura 22. La estimulación con VIH induce la producción de ROS en neutrófilos de la mucosa genital.**

(A) Imágenes representativas de neutrófilos del tracto reproductor femenino teñidos con el reactivo CellROX (rojo) con y sin estimulación con VIH (2 h). Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente IncuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 50 μm. (B) Cuantificación representativa de la producción del ROS intracelular por neutrófilos de la mucosa genital en estado de reposo (blanco), o tras la estimulación con VIH (negro) o VIH sin las proteínas de la envoltura (VIH-Δenv, gris). RCU: «red calibrated units» o unidades calibradas para la señal en rojo.

En resumen, estos hallazgos apoyan la idea de que existen diferentes rutas de señalización en neutrófilos sanguíneos y genitales tras la estimulación con VIH, con resultados que avalan que los neutrófilos sanguíneos responden a las proteínas de la envoltura del VIH incrementando los niveles de calcio y la producción de ROS de una manera dependiente de la edad, y con resultados que muestran que los neutrófilos genitales responden al VIH incrementando más rápidamente los niveles intracelulares de ROS de una manera independiente de calcio y de las proteínas de la envoltura viral.



## 5. El VIH es internalizado por un subconjunto de neutrófilos.

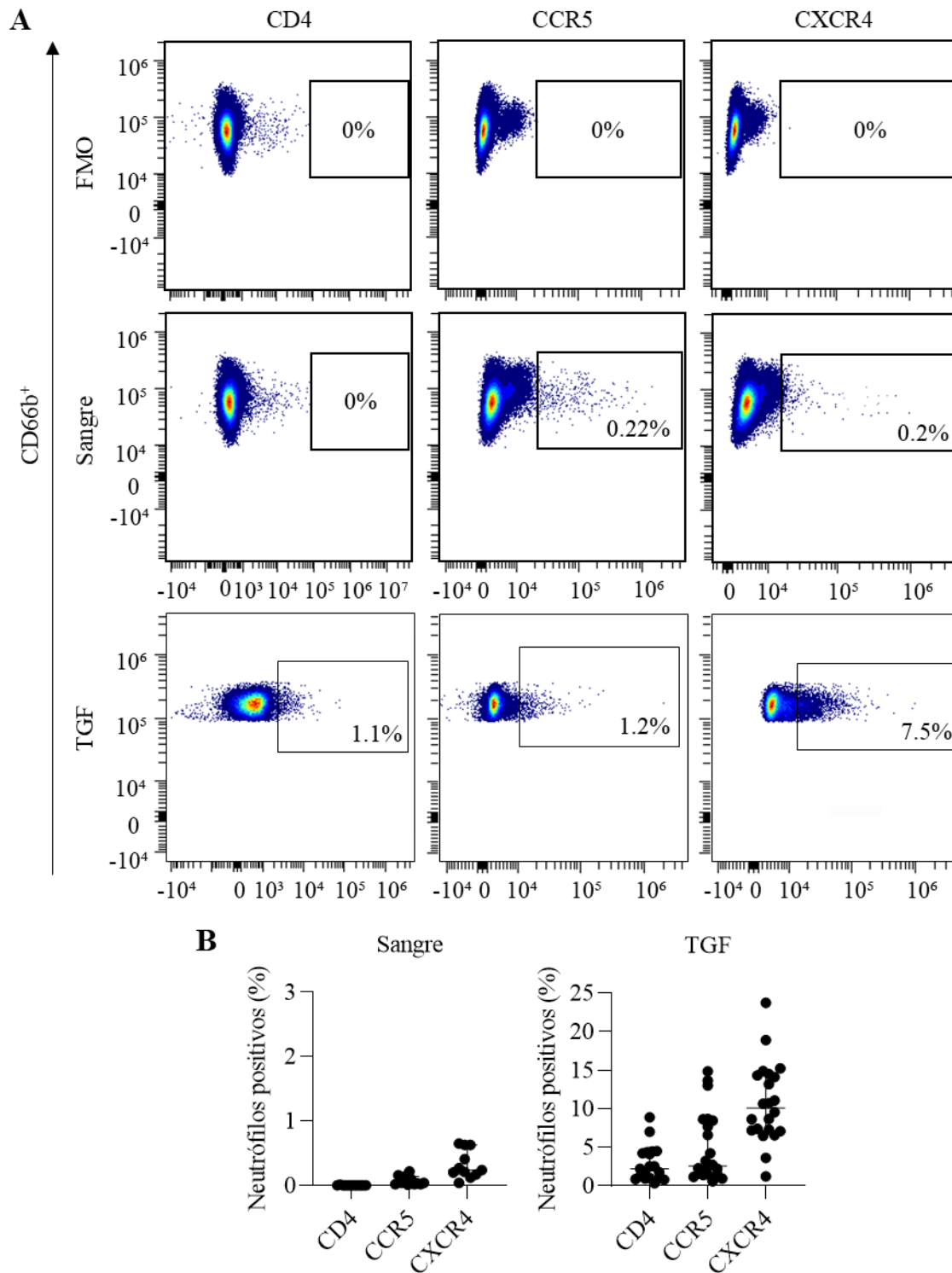
En relación con nuestros resultados que demuestran que el VIH activa TLR endosomales en neutrófilos, entre otros involucrados en las respuestas de calcio y ROS, investigamos mecanismos potenciales implicados en la internalización del virus.

Los neutrófilos no son reconocidos como células dianas para el VIH, puesto que no se consideran células que expresen los receptores de VIH. Sin embargo, se demostró la existencia de un subconjunto de neutrófilos de sangre periférica que expresaban CD4 en algunos individuos [249, 250]. Por tanto, primero determinamos si los neutrófilos de sangre y del tracto genital femenino expresaban el receptor (CD4) y los correceptores (CCR5 y CXCR4) para VIH. Como se muestra en el ejemplo representativo de la figura 23A, y en múltiples donantes (sangre: n=11; muestras del tracto genital: n=22) (Fig. 23B), no detectamos expresión de CD4 en neutrófilos sanguíneos, y la expresión de CXCR4 y CCR5 fue detectada en menos del 1% de las células. Por el contrario, en neutrófilos del tracto genital (Fig. 23A-B), el receptor de VIH (CD4) fue detectable en un pequeño porcentaje de células (2.2%) y los correceptores (CCR5 y CXCR4) se expresaban en un 2.6% y 10.1% de la población de neutrófilos, respectivamente.

Estos resultados demuestran que el perfil de expresión para los receptores de VIH es diferente entre los neutrófilos sanguíneos y del tracto genital femenino, con una mayor expresión en los neutrófilos de la mucosa genital.

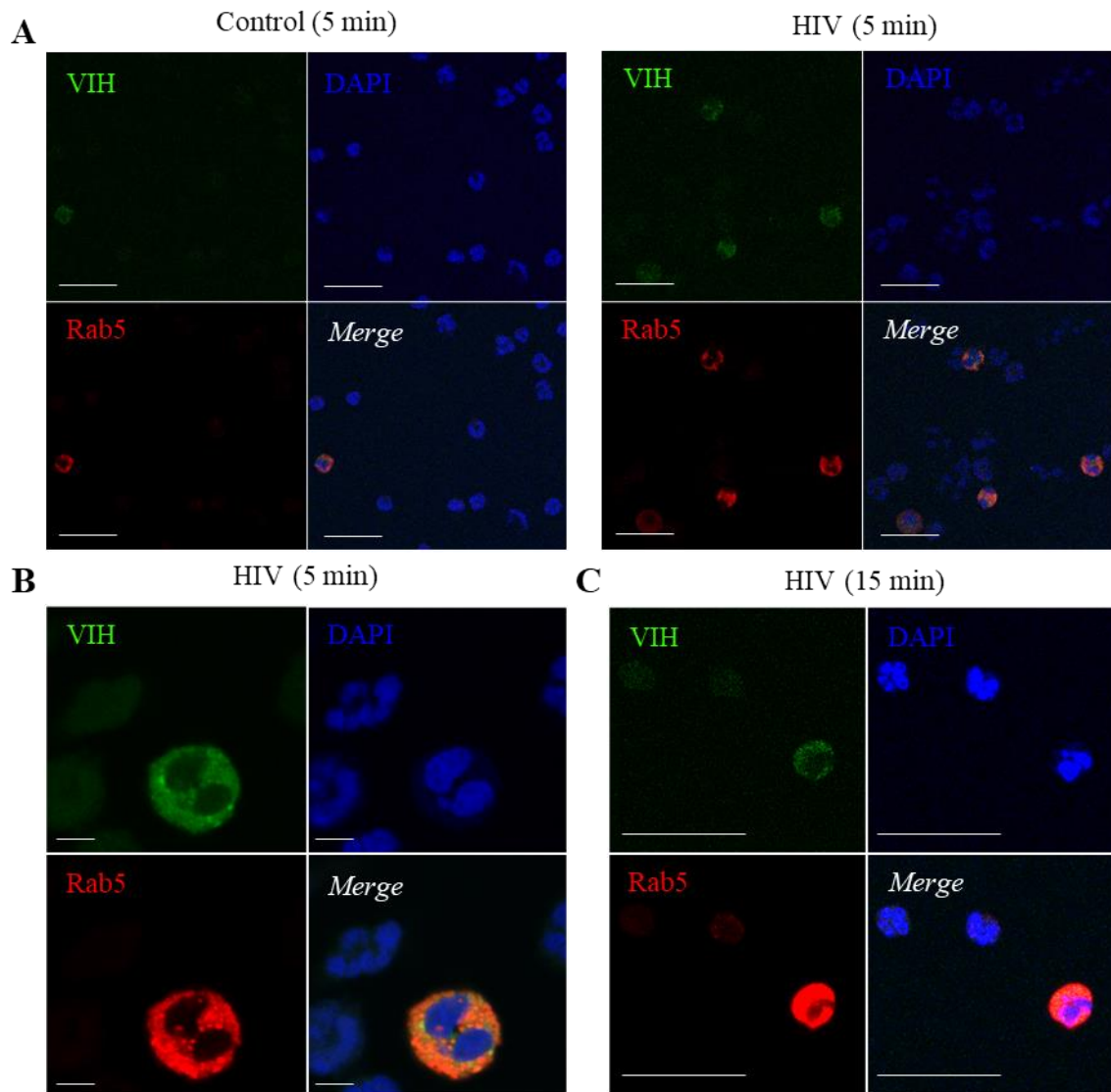
A pesar de que los neutrófilos no son susceptibles de ser infectados por el VIH a través del receptor CD4 y los correceptores CCR5 o CXCR4, existen otros mecanismos que permiten la internalización del VIH en las células: La transmisión célula-célula entre una célula infectada y una célula diana a través del uso de nanotubos, sinapsis o fusión de células [251, 252]; o la internalización a través de endocitosis mediada por dinamina [253]. Considerando que el primer mecanismo alternativo requiere de un estado de infección ya establecido, centramos nuestra investigación en la internalización del VIH a través de la endocitosis. En primer lugar, mediamos la expresión de Rab5 tras la estimulación con VIH. Rab5 está involucrado en la formación del endosoma temprano [254], el cual se ha descrito como molécula implicada en la endocitosis del VIH en células con baja o nula expresión de receptores del VIH [255].

El análisis con microscopía confocal reveló que Rab5 se expresaba en un número bajo de neutrófilos sanguíneos, los cuales mostraban colocalización con la señal verde de PV-VIH (Fig. 24A-B). Después, analizamos la expresión de Rab5 en neutrófilos del tracto genital femenino, e identificamos un bajo número de neutrófilos genitales que expresaban Rab5 (Fig. 24C).



**Figura 23.** Expresión de los receptores y correceptores de VIH en neutrófilos sanguíneos y genitales.

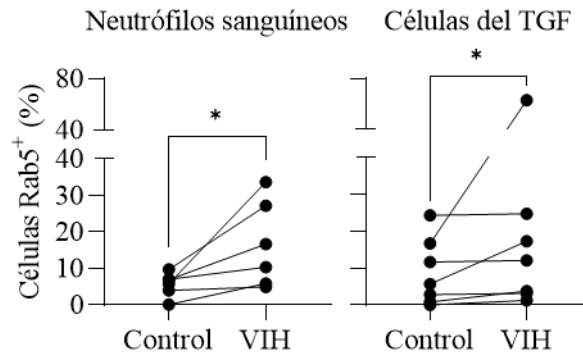
Detección de la expresión de CD4, CXCR4 y CCR5 mediante citometría de flujo. **(A)** Paneles representativos de citometría de flujo para la expresión de CD4, CCR5, y CXCR4 en neutrófilos sanguíneos y del tracto genital femenino. **(B)** Porcentaje de neutrófilos que expresan CD4, CCR5, y CXCR4 en sangre (grafico superior) y en la mucosa genital (grafico inferior) de múltiples donantes.



**Figura 24. Expresión de Rab5 en neutrófilos sanguíneos y genitales.**

(A-B) Imágenes representativas de microscopía confocal (aumento, 63x) de la expresión de Rab5 (rojo) en neutrófilos de sangre sin estimular o tras 5 min de estimulación con VIH (corte en el plano z) (A) Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$  (B) Barra de escala 50  $\mu\text{m}$ . (C) Imágenes representativas de microscopía confocal (aumento, 63x) de neutrófilos genitales expresando Rab5 tras 15 min de estimulación con VIH. Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ . (corte en el plano z).

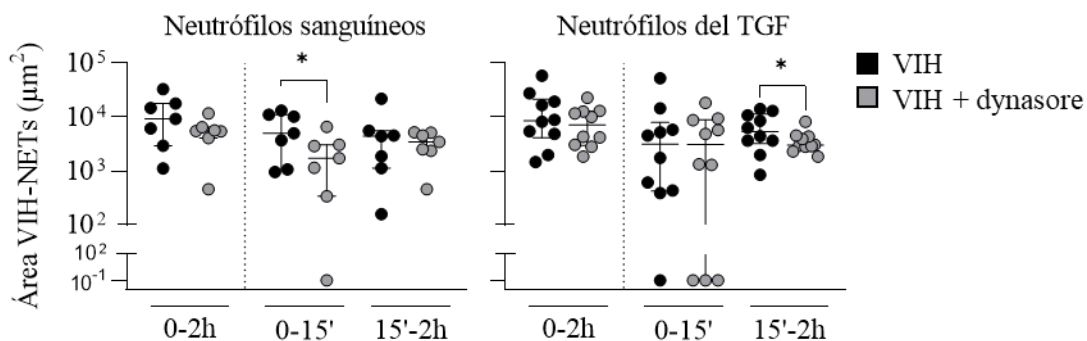
La cuantificación del número de células que expresaban Rab5 se llevó a cabo en múltiples donantes (sangre:  $n=6$ ; tracto genital femenino:  $n=6$ ) y, tras el análisis de varios campos de imágenes, se determinó que la estimulación con VIH incrementaba significativamente el número de células que expresaban Rab5 en neutrófilos sanguíneos (5 min) y en la suspensión celular de los tejidos genitales (15 min) (Fig. 25).



**Figura 25. Cuantificación de Rab5 en neutrófilos sanguíneos y genitales.**

Porcentaje de células que expresan Rab5 sin estimular y estimuladas con VIH. Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. \* $p < 0.05$ .

Un estudio realizado con células humanas de la placenta describió que la dinamina estaba implicada en la endocitosis del VIH [255]. Para determinar si la endocitosis viral estaba involucrada en la liberación de NETs, bloqueamos la internalización dependiente de dinamina. Para ello, los neutrófilos sanguíneos y la suspensión celular de los tejidos genitales fueron incubados con *dynasore*, un inhibidor de la dinamina, previa estimulación con VIH y cuantificación de la liberación de NETs. La inhibición de la dinamina redujo significativamente la liberación de los NETs en neutrófilos sanguíneos (mediana de reducción del 77%;  $p = 0.03$ ) y en neutrófilos del TGF (mediana de reducción del 31%;  $p = 0.05$ ) tras estimular con VIH (Fig. 26)



**Figura 26. La inhibición de la dinamina reduce la liberación de NETs.**

Liberación de NETs en respuesta a VIH en ausencia (negro) y presencia (gris) del inhibidor de dinamina en neutrófilos sanguíneos (grafico de la izquierda) y neutrófilos genitales (grafico de la derecha). Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. \* $p < 0.05$ .

Estos resultados indican que la endocitosis del VIH dependiente de dinamina por parte de los neutrófilos esta parcialmente implicada en la liberación de NETs. Además, demostramos que una pequeña proporción de neutrófilos expresan los receptores del VIH, particularmente en el tracto genital femenino.

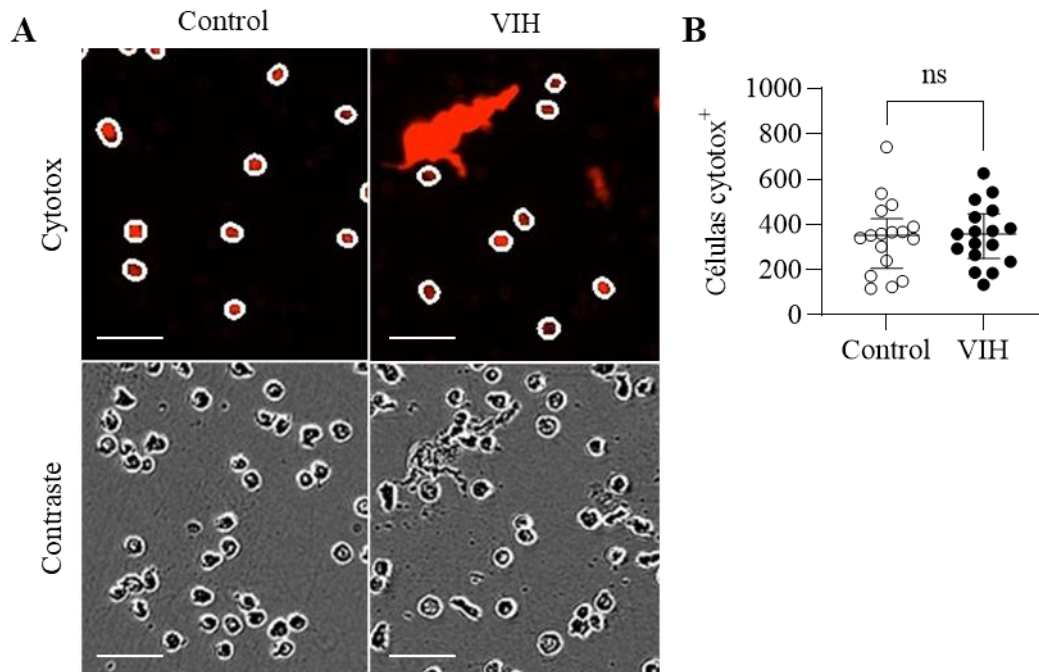
## 6. Anexina V y lactoferrina identifican NETs proinflamatorios producidos tras el reconocimiento del VIH a través de TLR7.

Se han descrito dos mecanismos principales implicados en la formación de NETs:

- La **liberación lítica de NETs**, un proceso tardío (2h) y dependiente de ROS producido por la NADPH oxidasa que implica la ruptura de la membrana plasmática y muerte celular.
- La **liberación no lítica de NETs**, un proceso rápido (a partir de los 10 min) e independiente de ROS mediante el cual los neutrófilos se mantienen viables al liberar NETs [193, 194].

Debido a que nuestros resultados indican que la liberación temprana de NETs está mediada por calcio y por el reconocimiento del VIH a través de TLR8, nuestro siguiente objetivo fue explorar los mecanismos que están implicados en la liberación tardía de los NETs. Con este fin, investigamos si la muerte celular podría estar involucrada en dicho proceso. Para ello, usamos Cytotox, un reactivo que marca en rojo el ADN extracelular de los NETs y que también tiñe el ADN intracelular cuando la membrana citoplasmática está comprometida, siendo generalmente usado para identificar células muertas o células que están muriendo. Para cuantificar las células muertas, generamos una máscara que identificaba la señal roja cuando se presentaba en formas redondas con el área de una célula, de esta manera, excluimos de nuestro análisis los NETs, ya que la señal roja en los NETs se muestra en formas irregulares y de un tamaño mayor en comparación con el área celular (Fig. 27A). No encontramos diferencias entre el número de células teñidas con Cytotox en la condición de neutrófilos en reposo frente a los neutrófilos estimulados con VIH (Fig. 27A-B).

Para determinar si había diferencias en cómo los neutrófilos positivos para Cytotox morían en ausencia o presencia de la estimulación con VIH, extendimos nuestro estudio para investigar la apoptosis utilizando como reactivo anexina V especialmente formulada para dar señal en rojo. Sin embargo, no detectamos ningún neutrófilo positivo para anexina V, a pesar de que lo fuesen para la tinción con Cytotox (Fig. 28A), indicando que los neutrófilos no estaban muriendo vía apoptosis. Curiosamente, observamos una incorporación diferencial de la anexina V en un subconjunto de NETs en respuesta a VIH (Fig. 28B). El análisis cinético de la formación de NETs en respuesta al VIH reveló que los NETs que incorporaban anexina V (NETs ANXV+) eran liberados a tiempos más tardíos en comparación con los NETs que no incorporaban anexina V (NETs ANXV-) (Fig. 28C).

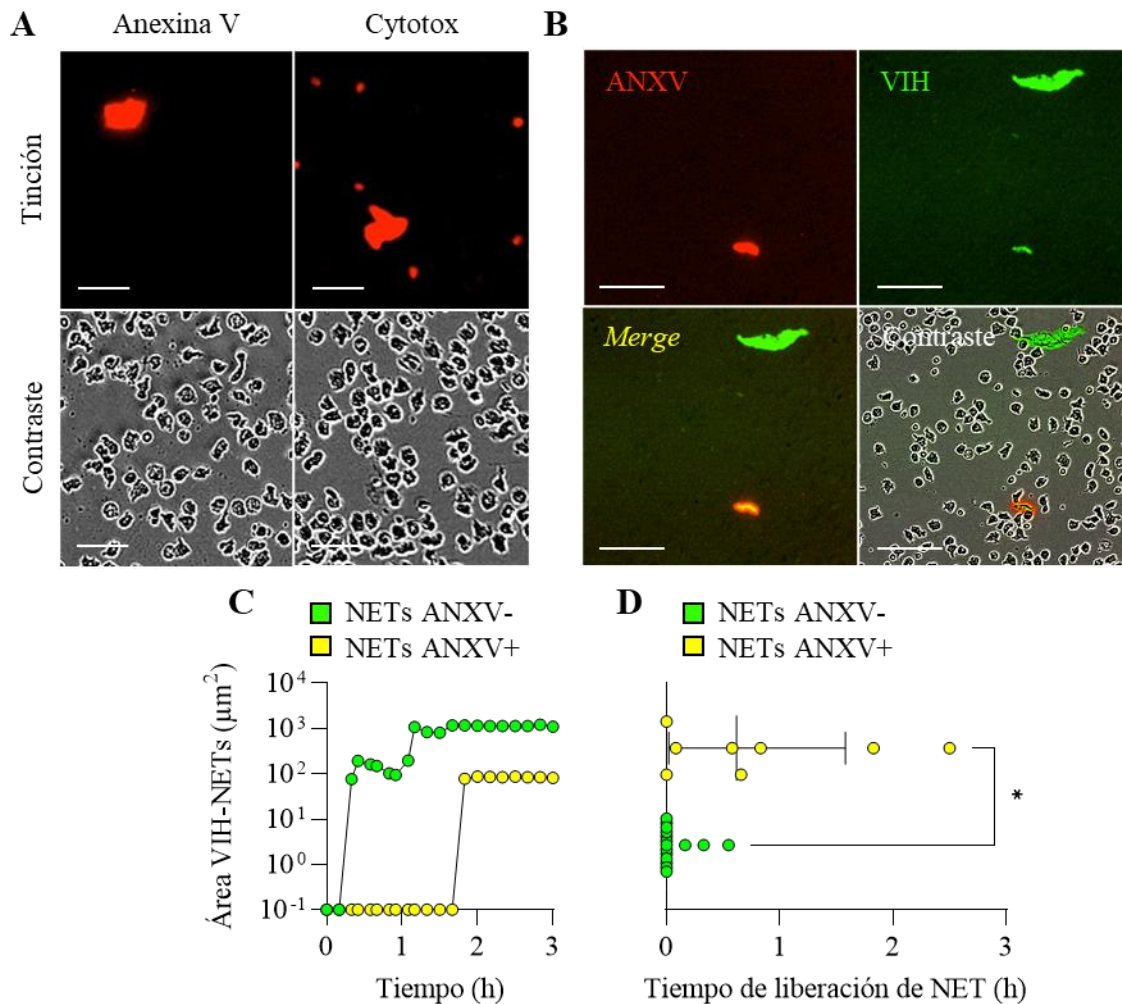


**Figura 27. Análisis de los neutrófilos positivos para Cytotox en ausencia y presencia de VIH.**

(A) Imágenes representativas de neutrófilos sanguíneos teñidos con Cytotox (rojo) en la condición sin estimular y tras estimular durante 30 min con VIH. Los círculos blancos muestran la máscara aplicada para cuantificar las células positivas para la tinción con Cytotox. Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente InCuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 50  $\mu$ m. (B) Cuantificación del número de neutrófilos positivos para la tinción con Cytotox en la condición control (blanco) y tras estimular durante 30 min con VIH (negro). Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon.

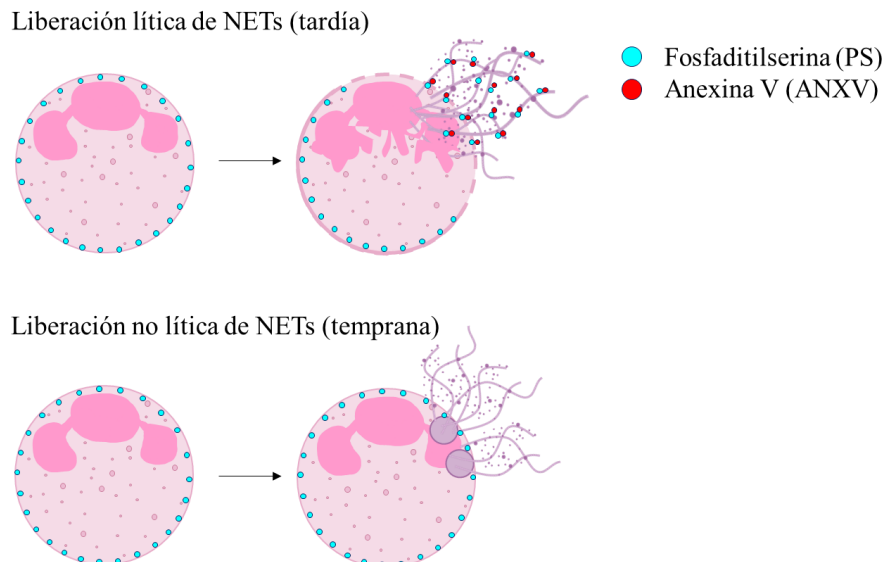
Cuando cuantificamos el tiempo en el que los neutrófilos sanguíneos liberaban los primeros NETs que incorporaban o no anexina V, observamos que los NETs que incorporaban anexina V se liberaban significativamente más tarde que los NETs que no incorporaban anexina V (Fig. 28D).

Debido a que la liberación lítica de NETs implica la disrupción de la membrana celular, y la liberación no lítica conserva la integridad de ésta [194], hipotetizamos que la anexina V se incorporaba en los NETs liberados a través de mecanismos líticos al unirse a moléculas de fosfatidilserina (PS, *phosphatidylserine*). La fosfatidilserina es una molécula que se encuentra en la cara interna de la membrana celular. Cuando se rompe la membrana celular, las moléculas de PS quedan expuestas en la parte extracelular de la membrana, permitiendo así la unión anexina V-PS (Ilustración 9).



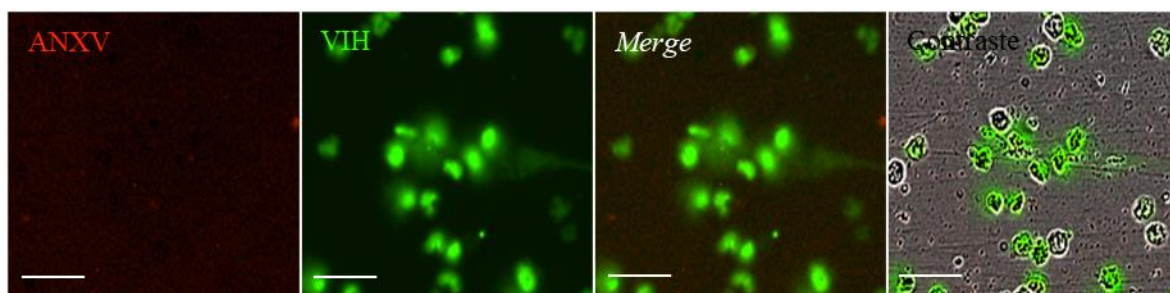
**Figura 28. Identificación de un subconjunto de NETs que incorporan anexina V.**

(A) Imágenes representativas de neutrófilos sanguíneos teñidos con Cytotox o con anexina V (30 min). Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente InCuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . (B) Imágenes representativas de NETs positivos y negativos para anexina V liberados por neutrófilos sanguíneos tras estimular con VIH. Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente InCuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . (C) Curva representativa y (D) cuantificación de los NETs positivos para anexina V (amarillo) y de los NETs negativos para anexina V (verde) liberados por neutrófilos sanguíneos tras la estimulación con VIH. Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. \*p<0.05.



**Ilustración 9. Disposición de moléculas de anexina V y fosfatidilserina durante la liberación de NETs.**

Como control, usamos ionóforo de calcio, conocido por su capacidad para inducir la liberación de NETs por mecanismos no líticos y a través de rutas mediadas por calcio [186]. Como se observa en la figura 29, la estimulación con ionóforo de calcio no indujo la liberación de NETs que incorporaban anexina V, sugiriendo que la anexina V se incorpora en aquellos NETs liberados a partir de mecanismos líticos.



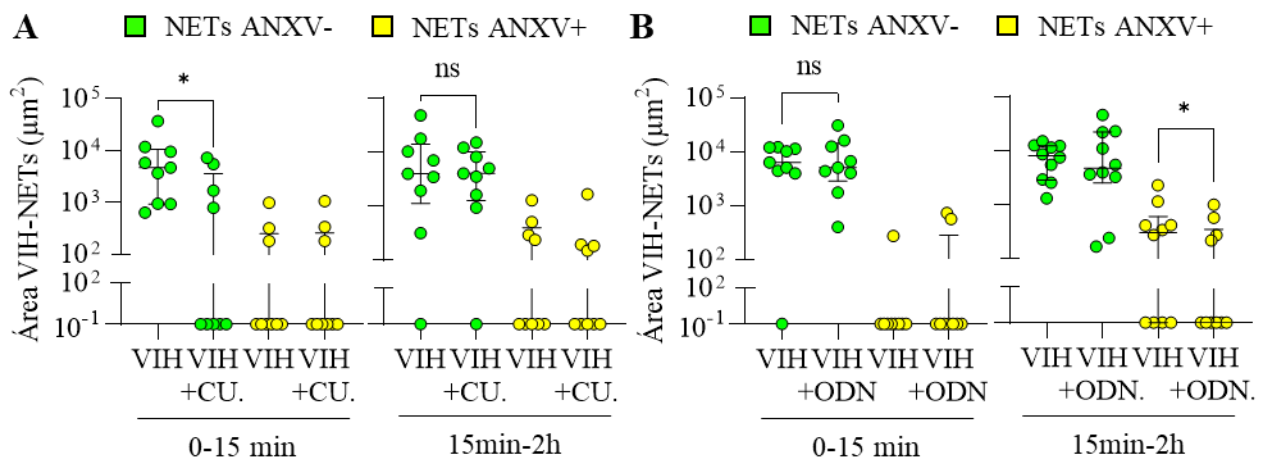
**Figura 29. El ionóforo de calcio no induce la liberación de NETs positivos para anexina V.**

Imágenes representativas de neutrófilos sanguíneos estimulados con ionóforo de calcio en presencia de Cytotox (verde) y de anexina V (rojo). Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente InCuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 50  $\mu$ m.

A continuación, investigamos si los NETs positivos para anexina V eran dependientes de la activación de TLRs tras reconocer el VIH. Debido a que los NETs que incorporaban anexina V se liberaban



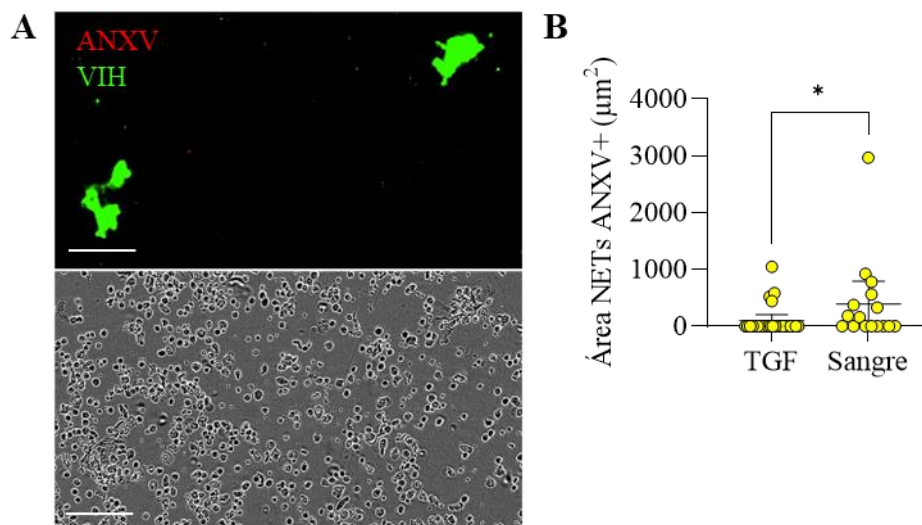
a tiempos tardíos, especulamos que su inducción podría ser dependiente de un reconocimiento del VIH a través de TLR7. Cuando analizamos qué tipos de NETs (positivos o negativos para anexina V) se reducían al bloquear TLR8 o TLR7, observamos que la inhibición de TLR8 (CU-CPT9a) disminuyó significativamente la liberación temprana de NETs que no incorporaban anexina V, y no detectamos ningún efecto de reducción en los NETs que incorporaban anexina V (Fig. 30A). Por el contrario, la inhibición de TLR7 (ODN 20958) redujo significativamente la liberación tardía de NETs positivos para anexina V, sin mostrar ningún efecto en los NETs negativos para anexina V (Fig. 30B). Estos resultados sugieren que TLR8 activa la liberación de NETs a través de mecanismos no líticos, mientras que TLR7 está involucrado en la liberación de NETs a través de mecanismos líticos y dependientes de ROS.



**Figura 30. La inhibición de TLR8 y TLR7 reduce respectivamente la liberación de NETs negativos y positivos para anexina V.**

(A, B) Producción de NETs positivos y negativos para anexina V tras estimular con VIH a neutrófilos sanguíneos pre-incubados con (A) el inhibidor de TLR8 (CU-CPT9a) o con (B) el inhibidor de TLR7 (ODN 20958). Se aplicó el test estadístico de Wilcoxon. \* $p < 0.05$ .

Como parte de estos estudios, investigamos la liberación de NETs que incorporaban anexina V por parte de neutrófilos genitales. Curiosamente, los neutrófilos genitales apenas liberaban NETs positivos para anexina V (en 4 de 26 muestras; 15%) y esta producción fue significativamente más baja en comparación con los neutrófilos sanguíneos (en 8 de 16 muestras; 50%) (Fig. 31A-B), sugiriendo que los neutrófilos genitales liberan NETs preferencialmente a través de rutas no líticas.

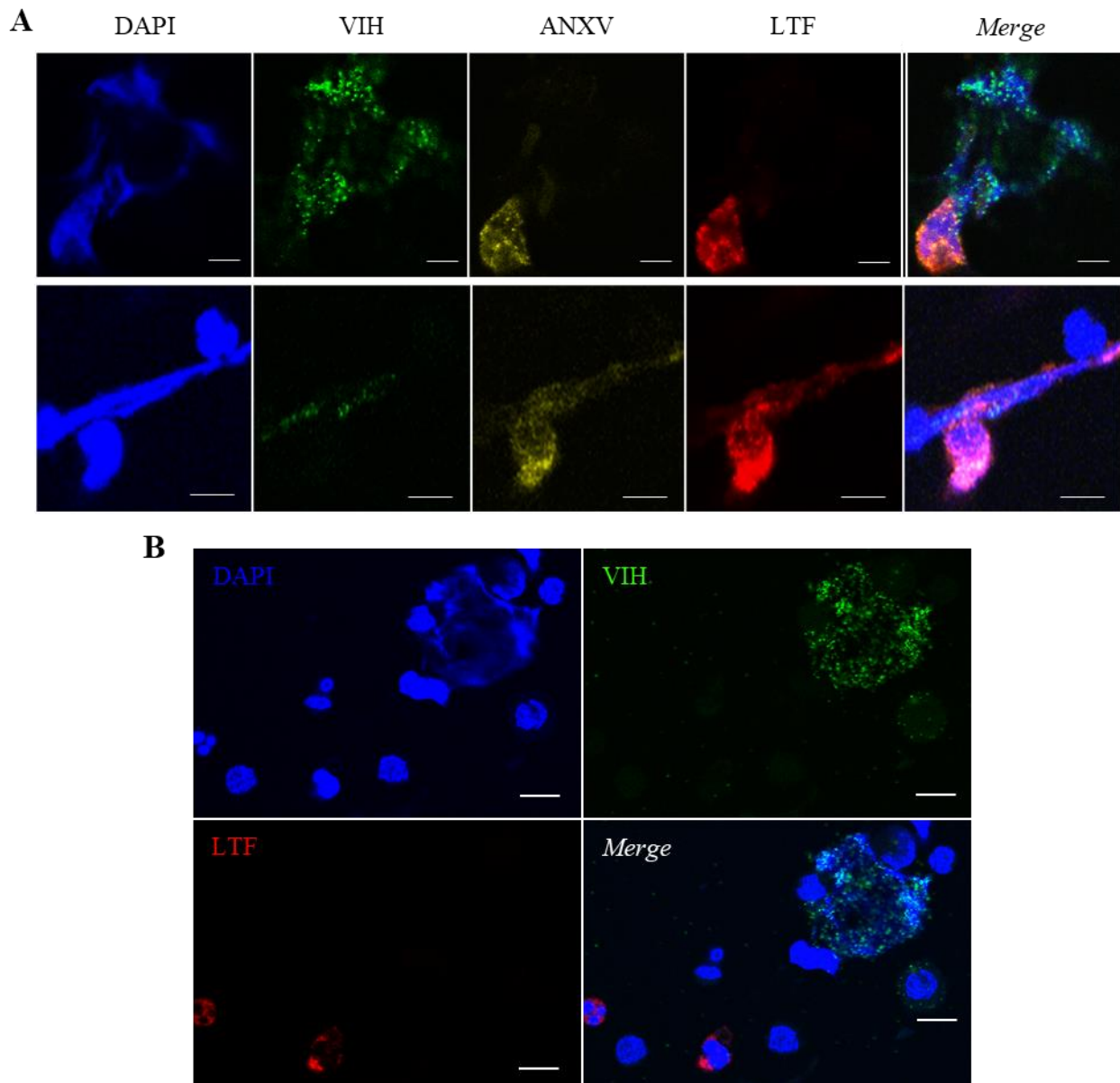


**Figura 31. Los neutrófilos genitales liberan preferencialmente NETs negativos para anexina V.**

(A) Imágenes representativas de la ausencia de NETs positivos para anexina V liberados por neutrófilos genitales. Imágenes tomadas mediante el sistema de microscopía fluorescente IncuCyte (aumento, 10x). Barra de escala: 150  $\mu\text{m}$ . (B) Comparación de la liberación de NETs positivos para anexina V por neutrófilos sanguíneos y genitales. Se aplicó el test estadístico de Mann-Whitney. \* $p < 0.05$ .

Considerando que la liberación de NETs lítica está descrita en la literatura como proinflamatoria [193], exploramos diferencias funcionales entre los NETs positivos y negativos para anexina V analizando la incorporación de lactoferrina, una proteína conocida por sus propiedades proinflamatorias y quimioatrayentes [256]. Estimulamos neutrófilos sanguíneos y genitales con VIH y determinamos la incorporación de anexina V y de lactoferrina en los NETs a través de microscopía confocal. En los NETs liberados por neutrófilos sanguíneos, observamos que anexina V y lactoferrina se co-expresaban en algunos NETs, mientras que los NETs negativos para anexina V no expresaban lactoferrina (Fig. 32A).

En los NETs liberados por neutrófilos genitales, a pesar de detectar la presencia de lactoferrina dentro de los neutrófilos, no detectamos NETs que la incorporasen, así como tampoco visualizamos NETs positivos para anexina V (Fig. 32B). Estos datos sugieren diferencias funcionales para los NETs que incorporan anexina V [256].



**Figura 32. Co-expresión de lactoferrina y anexina V en NETs.**

(A) Imágenes representativas de NETs ANXV- (arriba) y NETs ANXV+ (abajo) liberados por neutrófilos sanguíneos tras 30min-2h de estimulación con VIH (verde). En NETs ANXV+ se observa expresión de lactoferrina y anexina V. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal (aumento, 63x). Barra de escala: 5  $\mu$ m. (B) Imágenes representativas de NETs ANXV- liberados por neutrófilos genitales tras 30min-2h de estimulación con VIH (verde). Imágenes tomadas mediante microscopía confocal (aumento, 63x). Barra de escala: 10  $\mu$ m.

En resumen, estos resultados demuestran que los neutrófilos sanguíneos y del tracto genital femenino liberan NETs con diferente composición proteica en respuesta a VIH, y que la anexina V y la lactoferrina pueden ser usados como marcadores para visualizar los NETs que se forman a través de vías líticas.

## Discusión

Nuestro estudio demuestra que, a medida que las mujeres envejecen, las respuestas frente al VIH por parte de los neutrófilos se ven afectadas negativamente, resultando en un retraso en la liberación de NETs por parte de los neutrófilos sanguíneos y de los neutrófilos residentes en el tracto genital femenino. Además, demostramos que el VIH induce la liberación de NETs de manera diferente en neutrófilos de sangre y del aparato genital. Los neutrófilos sanguíneos liberan NETs a través de mecanismos preferencialmente dependientes de calcio, mientras que en los neutrófilos de la mucosa genital predomina el reconocimiento del VIH mediante TLRs endosomales. Esta señalización diferencial supone la existencia de distintos mecanismos subyacentes que reducen la formación de NETs en la sangre y en los tejidos genitales con el envejecimiento. En los neutrófilos de sangre, el VIH falla al inducir respuestas rápidas de calcio en mujeres a medida que avanzan en edad; mientras que, en los tejidos genitales, la señalización a través de TLRs se reduce en mujeres postmenopáusicas. De manera importante, nuestros resultados señalan que los neutrófilos sanguíneos y de la mucosa genital liberan NETs con una actividad funcional diferente, e identificamos un subconjunto de NETs potencialmente proinflamatorios que incorporan anexina V y lactoferrina y que son producidos principalmente por los neutrófilos sanguíneos. Nuestros resultados indican, por primera vez, que existe una diferencia en la liberación de NETs en respuesta al VIH que se atribuye al origen de los neutrófilos y al envejecimiento, proporcionando información mecanística sobre el deterioro funcional dependiente de la edad en las respuestas anti-VIH, así como la identificación de nuevos marcadores para discriminar entre NETs proinflamatorios y patológicos procedentes de una liberación lítica y NETs protectores que proceden de una liberación no lítica.

Nuestro laboratorio demostró anteriormente que los neutrófilos procedentes del tracto reproductor femenino liberan NETs inmediatamente después de ser estimulados con VIH, y que los NETs inactivan al virus de manera irreversible, previniendo la infección de las células diana [143]. La captura e inactivación del VIH ha sido también descrita en neutrófilos sanguíneos por otros autores y por nuestro grupo [143, 174]. Sin embargo, se desconocen los mecanismos subyacentes que desencadenan la liberación de NETs en respuesta al VIH por los neutrófilos sanguíneos o genitales y si este mecanismo de defensa anti-VIH se ve afectado con el envejecimiento. En este trabajo hemos encontrado un retraso en la respuesta anti-VIH en neutrófilos sanguíneos y genitales de mujeres postmenopáusicas. La menopausia es un acontecimiento determinante en la vida de las mujeres donde hay un pronunciado descenso de las hormonas sexuales. Sin embargo, aunque las mujeres premenopáusicas muestran niveles significativamente más altos de E2 en plasma comparados con las mujeres postmenopáusicas, los niveles de estrógenos no dependían de la edad de las donantes. Este resultado podría ser explicado debido a dos principales motivos: Primero, los niveles en plasma de E2 cambian a lo largo del ciclo menstrual. Los niveles de estrógenos se incrementan

progresivamente durante la fase menstrual y proliferativa hasta alcanzar su pico antes de la ovulación. Tras este pico, los niveles de estrógenos caen rápidamente, con un pequeño incremento durante la fase secretora [98]. Segundo, la variabilidad en los niveles plasmáticos de estrógenos alrededor de los 40-50 años podría ser a consecuencia de la perimenopausia. La perimenopausia es el periodo de tiempo en el que las mujeres experimentan la senescencia reproductiva. Esta transición ocurre en mujeres entre los 40 y los 58 años, y se caracteriza por fluctuaciones hormonales [257]. Además, no encontramos una correlación significativa entre la liberación de NETs en respuesta a VIH y los niveles de E2, indicando que el descenso en los niveles de estrógenos en mujeres postmenopáusicas no afecta directamente a la liberación de NETs en respuesta a VIH. Por tanto, considerando que la menopausia no puede justificar los cambios producidos en la liberación de NETs en respuesta al VIH en mujeres postmenopáusicas, sugerimos que la senescencia celular sería responsable de dicha reducción. La senescencia celular es un estado celular donde el ciclo celular está bloqueado, lo cual significa que las células dejan de multiplicarse y de morir, mostrando un fenotipo secretorio asociado a una senescencia proinflamatoria (*SASP, senescence-associated secretory phenotype*). Se propuso que los estrógenos prevenían la senescencia celular al proteger las células de la senescencia inducida por daño en el ADN, y por estar involucrados en la inhibición de rutas y proteínas involucradas en el establecimiento de la senescencia celular [258]. Por tanto, mientras los estrógenos no pueden influir en la liberación de NETs en respuesta a VIH, pueden modificar la susceptibilidad celular a la senescencia. Nosotros proponemos que las mujeres postmenopáusicas tienen un defecto en la liberación de NETs en respuesta al VIH debido a la senescencia celular promovida por la ausencia de estrógenos. Sin embargo, sería muy interesante explorar el papel de otras hormonas sexuales como la progesterona.

Respecto al papel que juegan los NETs en la prevención de la infección por VIH, este retraso y reducción en la liberación de NETs sugiere que las mujeres más mayores serían incapaces de responder de forma inmediata a una exposición viral, contribuyendo potencialmente a ser expuestas a una cantidad mayor de partículas libres de VIH y, consecuentemente, a un incremento de ser susceptibles a una infección en el tracto genital femenino. Además, observamos de manera interesante que los neutrófilos genitales procedentes del endometrio incrementaron significativamente la liberación de NETs en aquellas mujeres que se encontraban en la perimenopausia. Esta observación podría ser explicada por la influencia del ambiente tisular en los neutrófilos genitales. Se ha demostrado que la fluctuación en los niveles de las hormonas sexuales durante el ciclo menstrual regula las poblaciones de células inmunológicas y su función en el aparato reproductor femenino para promover la implantación y el embarazo. Por ejemplo, las células T están reguladas de forma compartimental para proteger a las mujeres de infecciones sin interferir con la implantación. Sin embargo, una vez las mujeres alcanzan la menopausia y el embarazo no ocurre, las células T del endometrio experimentan cambios fenotípicos y funcionales [236]. El conocimiento acerca de si los neutrófilos genitales mejoran su función de liberación de NETs durante la perimenopausia y las diferencias

entre los distintos compartimentos del tracto genital femenino necesitan ser considerablemente investigadas.

De manera relevante, identificamos diferencias en cómo el envejecimiento impide la liberación de NETs en los neutrófilos sanguíneos y genitales en respuesta al VIH. En el tracto genital femenino, la señalización por TLRs era la principal ruta involucrada en la liberación de NETs inducidos por VIH en mujeres premenopáusicas, y el reconocimiento viral mediado por TLR8 (pero no por TLR7) se redujo en mujeres postmenopáusicas, resultando en un impedimento específico de la liberación temprana de NETs. Por el contrario, en neutrófilos sanguíneos de mujeres postmenopáusicas, la señalización por TLR8 y TLR7 se mantiene funcionalmente conservada. A pesar de que anteriores estudios demostraron que la señalización vía TLR7/8 estaba implicada en la liberación tardía de NETs en respuesta a VIH en neutrófilos de sangre periférica [174] y en neutrófilos genitales [143], en este trabajo ampliamos estos hallazgos descubriendo una participación secuencial de TLR8 y TLR7 en la liberación de NETs temprana y tardía, respectivamente, dentro de un rango de tiempo de 2 h de estimulación con VIH en neutrófilos procedentes de sangre y del tracto genital femenino. Además, demostramos que TLR8 es responsable de la formación inicial de NETs en respuesta al VIH en neutrófilos genitales y sanguíneos de mujeres postmenopáusicas. La razón por la que la señalización a través de TLR8 es preferencial necesita ser determinada, pero podría estar relacionada por una mayor expresión basal de TLR8 en comparación con TLR7 en neutrófilos [154].

Otro hallazgo novedoso presentado en este trabajo es la demostración de que el VIH induce un rápido incremento en los niveles intracelulares de calcio que desencadenan la liberación de NETs en neutrófilos sanguíneos de mujeres más jóvenes, pero esta respuesta está completamente ausente en los neutrófilos genitales, descubriendo una importante diferencia en los mecanismos responsables para la formación de NETs en neutrófilos sanguíneos y genitales. Es importante señalar que la liberación de NETs en respuesta al VIH mediada a través de TLRs endosomales y la mediada a través de calcio son dos rutas paralelas e independientes, debido a que los niveles citosólicos de calcio se mantuvieron inalterados cuando bloqueamos los TLRs endosomales previa estimulación con VIH. Nuestros datos indican que la liberación de NETs mediada por TLRs era dependiente a la endocitosis del virus, a través de un mecanismo dependiente de Rab5 y dinamina, mientras que las respuestas de calcio intracelular fueron desencadenadas por la envoltura del VIH, sugiriendo un posible papel para los receptores del VIH CD4 y CCR5 en este proceso. A pesar de que los neutrófilos no están considerados células diana para el VIH, nuestros resultados demuestran que la expresión de los receptores y correceptores del VIH en neutrófilos sanguíneos, aunque a muy bajos niveles, es consistente con estudios previos [223, 249, 259].

Curiosamente, a pesar de observar una mayor expresión de los receptores de VIH en los neutrófilos genitales que en los neutrófilos sanguíneos, la estimulación con VIH no indujo un incremento del calcio

intracelular en los neutrófilos procedentes de la mucosa genital, sugiriendo que la presencia de mecanismos que activamente suprimen las respuestas de calcio al VIH en los neutrófilos genitales. Se necesita profundizar más en esta área para descifrar los mecanismos moleculares responsables del incremento de calcio tras la estimulación con VIH. En algunas infecciones virales, como la del virus de la hepatitis B o el virus del herpes simplex humano, el incremento intracelular de calcio resulta en la regulación de las respuestas inmunológicas innatas y la transcripción de factores que ayudan a que el ciclo de replicación viral se lleve a cabo [260]. Se necesita investigar más sobre si el incremento en los niveles de calcio intracelular inducidos por VIH en los neutrófilos sanguíneos juega un papel protector o está involucrado en la patogénesis viral.

Se han descrito dos tipos principales de liberación de NETs: la liberación lítica, un mecanismo tardío de liberación de NETs dependiente de ROS que supone la ruptura de la membrana celular; y la liberación no lítica de NETs, un mecanismo temprano en el cual los NETs son expulsados desde la célula sin comprometer la integridad de la membrana celular. Los NETs líticos promueven un ambiente proinflamatorio y han sido implicados en condiciones patológicas de inflamación estéril y en infecciones bacterianas [193], mientras que la liberación no lítica de NETs se considera como un mecanismo antimicrobiano y que ocurre en respuesta a múltiples patógenos como bacterias y hongos [193, 194]. Hasta la fecha, no existen marcadores específicos que discriminen entre estos dos tipos de NETs. En este trabajo, identificamos dos tipos de NETs liberados en respuesta al VIH basándonos en la incorporación de anexina V con diferencias en propiedades funcionales y tiempo. Los NETs que incorporan anexina V se liberaron a tiempos más tardíos, y eran funcionalmente diferentes que los NETs que no incorporan anexina V por la incorporación específica de lactoferrina, una molécula proinflamatoria que se describió previamente que era secretada por células apoptóticas [261]. La lactoferrina promueve la quimioatracción de monocitos y macrófagos, mientras que inhibe la migración de neutrófilos y eosinófilos [256]. Considerando estos datos, especulamos que los NETs anexina V<sup>+</sup> proceden de aquellos neutrófilos que rompen su membrana plasmática para liberar NETs, exponiendo moléculas de fosfatidilserina, las cuales se localizan en la cara interna de la membrana en condiciones fisiológicas y se unen a anexina V tras la liberación lítica de los NETs [193, 194]. Por tanto, proponemos que la incorporación de anexina V en los NETs es un marcador potencial para visualizar la formación lítica de NETs con potencial proinflamatorio o patológico. La distinción entre los dos mecanismos de liberación de NETs es relevante porque los NETs han sido descritos como un arma de doble filo: son protectores debido a su actividad antimicrobiana, pero también son una fuente de inflamación patológica que promueve el daño tisular [262]. Hay que destacar que la mayoría de los NETs liberados en respuesta al VIH fueron NETs anexina V<sup>-</sup>, sugiriendo un mecanismo preferentemente no lítico. Los NETs anexina V<sup>+</sup> fueron liberados principalmente por neutrófilos sanguíneos, pero no por neutrófilos genitales, indicando que la liberación de NETs en respuesta al VIH en

el tracto genital femenino no promovería inflamación en el tejido ni reclutamiento de las células diana para el VIH. Estos mecanismos que previenen la formación de NETs que inducen daño tisular requieren un estudio más exhaustivo.

En general, nuestros resultados demuestran que la liberación de NETs en respuesta a la estimulación con VIH se retrasa y disminuye progresivamente en los neutrófilos sanguíneos y genitales a medida que las mujeres envejecen. Identificamos mecanismos de liberación de NETs en respuesta al VIH que eran independientes y que variaban según el origen de los neutrófilos y la edad de las mujeres, diferenciando entre la formación de NETs a partir del reconocimiento del ARN del VIH a través de los TLRs endosomales, así como el rápido incremento del calcio intracelular al reconocer la envoltura del VIH. Especulamos que se activan múltiples vías al mismo tiempo que permiten la liberación de NETs, sugiriendo que este mecanismo es importante para la inactivación del VIH. Es importante mencionar que identificamos marcadores para los NETs proinflamatorios y demostramos que los NETs proinflamatorios raramente son liberados por los neutrófilos genitales, indicando un bajo daño tisular y un mínimo reclutamiento de las células diana para el VIH en el aparato genital femenino, uno de los principales portales de entrada para el VIH [143]. Por último, el impedimento de este mecanismo antiviral en mujeres con el envejecimiento podría contribuir a un incremento en la susceptibilidad de adquirir el VIH.



## Conclusiones

1. La liberación temprana de NETs en respuesta al VIH se reduce progresivamente en mujeres a partir de la menopausia, lo que podría suponer un mayor riesgo de infección por VIH.
2. Los neutrófilos sanguíneos y de la mucosa genital emplean diferentes mecanismos para desencadenar la liberación de NETs en respuesta al VIH. Aunque tanto los neutrófilos genitales como los sanguíneos liberan NETs a través del reconocimiento del material genético del VIH por medio de TLRs endosomales, únicamente los neutrófilos sanguíneos emplean mecanismos de reconocimiento de la envoltura viral que conllevan un incremento de los niveles intracelulares de calcio. Estos resultados describen distintas respuestas ante un mismo patógeno por parte de neutrófilos humanos de sangre y tejido, alertando que las respuestas de neutrófilos tisulares no pueden deducirse a partir de modelos de neutrófilos sanguíneos.
3. Los mecanismos que desencadenan la liberación de NETs se ven afectados con el envejecimiento de manera diferente en neutrófilos de sangre y de la mucosa genital. Por un lado, los neutrófilos genitales de las mujeres postmenopáusicas presentan un defecto en el reconocimiento del VIH a través de TLR8. Este receptor no se ve afectado con la edad en neutrófilos sanguíneos. En cambio, los neutrófilos de sangre muestran una reducción progresiva del incremento de los niveles intracelulares de calcio en respuesta al VIH a medida que las mujeres aumentan en edad.
4. Los neutrófilos sanguíneos y genitales responden al VIH incrementando los niveles intracelulares de ROS. Sin embargo, mientras los neutrófilos sanguíneos incrementan ROS tras reconocer la envoltura del VIH mediante un mecanismo que se ve afectado por la menopausia, en los neutrófilos genitales el incremento de ROS es independiente del reconocimiento de la envoltura viral.
5. Existe una pequeña proporción de neutrófilos que expresan los receptores (CD4) y correceptores (CCR5 y CXCR4) del VIH, particularmente en el tracto genital femenino.
6. La endocitosis del VIH mediada por dinamina está parcialmente implicada en la liberación de NETs.
7. La incorporación de anexina V en NETs sirve como marcador para identificar NETs proinflamatorios liberados a través de procesos líticos (NETs ANXV+), permitiendo diferenciarlos de los NETs no líticos (NETs ANXV-).
8. Los neutrófilos genitales liberaron primordialmente NETs ANXV- en respuesta al VIH, lo que supone un bajo daño tisular que reduce el reclutamiento de las células diana para el VIH en el tracto genital femenino.

## Índice de ilustraciones, figuras y tablas

1. Índice de ilustraciones.....	87
2. Índice de figuras.....	88
3. Índice de tablas.....	90

## Índice de ilustraciones

- **Ilustración 1.** Diferencias entre neutrófilos sanguíneos y genitales durante la liberación de NETs.....X
- **Ilustración 2.** Mapa de prevalencia del VIH en mujeres mayores de 15 años en 2021.....4
- **Ilustración 3.** Estructura del VIH.....6
- **Ilustración 4.** Ciclo de replicación del VIH.....8
- **Ilustración 5.** Anatomía del aparato genital femenino y distribución de las células que lo componen ...19
- **Ilustración 6.** Procesamiento de muestras de tejido del tracto genital femenino y purificación de neutrófilos.....36
- **Ilustración 7.** Proceso de purificación de neutrófilos procedentes de sangre.....37
- **Ilustración 8.** Estrategia de selección de neutrófilos genitales mediante citometría de flujo.....42
- **Ilustración 9.** Disposición de moléculas de anexina V y fosfatidilserina durante la liberación de NETs.....76

## Índice de figuras

- **Figura 1.** Liberación de NETs por neutrófilos sanguíneos de mujeres pre y postmenopáusicas.....46
- **Figura 2.** Liberación de NETs por neutrófilos sanguíneos y captura del VIH.....47
- **Figura 3.** El envejecimiento retrasa la liberación temprana de NETs en respuesta al VIH en sangre.....48
- **Figura 4.** Niveles de estradiol en plasma sanguíneo procedente de mujeres pre y postmenopáusicas.....49
- **Figura 5.** Liberación de NETs por neutrófilos genitales de mujeres pre y postmenopáusicas.....50
- **Figura 6.** El envejecimiento tras la menopausia retrasa la liberación temprana de NETs en respuesta al VIH en el tracto reproductor femenino.....51
- **Figura 7.** Recuento de neutrófilos en las distintas regiones del tracto genital femenino.....52
- **Figura 8.** TLR8 y TLR7 median la liberación de NETs inducida por VIH en neutrófilos sanguíneos de manera secuencial.....54
- **Figura 9.** Inhibición de TLR8 y TLR7/9 en neutrófilos sanguíneos de mujeres pre y postmenopáusicas.....55
- **Figura 10.** Expresión de los TLR endosomales en neutrófilos de sangre de mujeres pre y postmenopáusicas.....55
- **Figura 11.** TLR8 y TLR7 median la liberación de NETs inducida por VIH en neutrófilos genitales de manera secuencial.....56
- **Figura 12.** Inhibición de TLR8 y TLR7/9 en neutrófilos genitales de mujeres pre y postmenopáusicas.....57
- **Figura 13.** Inducción del calcio intracelular en neutrófilos sanguíneos tras la estimulación con VIH.....59
- **Figura 14.** BAPTA bloquea la señal de calcio intracelular en neutrófilos estimulados y sin estimular.....59
- **Figura 15.** El envejecimiento compromete la respuesta de calcio a la estimulación con VIH.....60
- **Figura 16.** La liberación temprana de NETs inducida por VIH es dependiente de calcio.....61
- **Figura 17.** El incremento de calcio es dependiente del reconocimiento de la envoltura del VIH.....62
- **Figura 18.** Los neutrófilos genitales no incrementan los niveles intracelulares de calcio tras la estimulación con VIH.....63

- **Figura 19.** Los neutrófilos genitales incrementan el calcio citosólico tras la estimulación con ionóforo de calcio.....64
- **Figura 20.** La estimulación con VIH induce la producción de ROS en neutrófilos sanguíneos a través de las proteínas de la envoltura.....66
- **Figura 21.** La producción de ROS es dependiente de calcio y de TLR7 en mujeres postmenopáusicas.....67
- **Figura 22.** La estimulación con VIH induce la producción de ROS en neutrófilos de la mucosa genital.....68
- **Figura 23.** Expresión de los receptores y correceptores de VIH en neutrófilos sanguíneos y genitales .....70
- **Figura 24.** Expresión de Rab5 en neutrófilos sanguíneos y genitales.....71
- **Figura 25.** Cuantificación de Rab5 en neutrófilos sanguíneos y genitales.....72
- **Figura 26.** La inhibición de la dinamina reduce la liberación de NETs.....72
- **Figura 27.** Análisis de los neutrófilos positivos para Cytotox en ausencia y presencia de VIH.....74
- **Figura 28.** Identificación de un subconjunto de NETs que incorporan anexina V.....75
- **Figura 29.** El ionóforo de calcio no induce la liberación de NETs positivos para anexina V.....76
- **Figura 30.** La inhibición de TLR8 y TLR7 reduce respectivamente la liberación de NETs negativos y positivos para anexina V.....77
- **Figura 31.** Los neutrófilos genitales liberan preferencialmente NETs negativos para anexina V.....78
- **Figura 32.** Co-expresión de lactoferrina y anexina V en NETs.....79

## Índice de tablas

- **Tabla 1.** Datos epidemiológicos del VIH a nivel mundial.....3
- **Tabla 2.** Inmunoreceptores expresados en neutrófilos humanos.....22
- **Tabla 3.** Expresión de TLRs en neutrófilos y sus ligandos.....23
- **Tabla 4.** Reactivos utilizados para el bloqueo de receptores, complejos o moléculas.....38

## Abreviaturas

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico
- **AIDS:** «acquired immunodeficiency syndrome» o síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
- **AM:** acetoximetil
- **ANXV:** anexina V
- **APC:** aloficocianina
- **ARN:** ácido ribonucleico
- **ART:** «antiretroviral therapy» o terapia antirretroviral
- **AZT:** zidovudina
- **C5a:** fragmento del componente C5 del complemento
- **cART:** «combined antiretroviral therapy» o terapia antirretroviral combinada
- **CD:** «cluster of differentiation» o grupo de diferenciación
- **CDC:** «Centers for Disease Control and Prevention» o Centro de Control y Prevención de Enfermedades
- **CLR:** «C-type lectin receptor» o receptor lectina de tipo C
- **CpG:** dinucleótidos que contienen citosina y guanina
- **CR:** «complement receptor» o receptor del complemento
- **DAPI:** «4',6-diamidino-2-phenylindole» o 4',6-diamidino-2-fenilindol
- **E2:** estradiol
- **ECX:** ectocérvix
- **EGFP:** «enhanced green fluorescent protein» o proteína verde fluorescente potenciada
- **EM:** endometrio
- **END:** endocérvix
- **Env:** envoltura vira
- **dsRNA:** ácido ribonucleico de doble cadena
- **ssRNA:** ácido ribonucleico de cadena sencilla
- **DAMPs:** «damage-associated molecular patterns» o patrón molecular asociado a daños
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DPI:** «diphenyleneiodonium chloride» o cloruro de difenilenoyodonio
- **EDTA:** ácido etilendiaminotetracético
- **EMA:** «European Medicines Agency» o Agencia Europea del Medicamento
- **ERK:** «extracellular signal-regulated kinase» o quinasa regulada por señales extracelulares
- **Fc:** fragmento cristalizante (región de la cola de un anticuerpo que interactúa con receptores)
- **FcR:** receptor Fc (receptor que interactúa con la región de la cola de un anticuerpo)
- **FDA:** «Food and Drug Administration» o Administración de Alimentos y Medicamentos
- **FITC:** fluoresceína-5-isotiocianato
- **FMO:** «fluorescence minus one» o fluorescencia menos uno
- **Fw:** «forward»

- **GFP:** «green fluorescent protein» o proteína verde fluorescente
- **GM-CSF** «granulocyte-macrophage colony-stimulating factor» o factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
- **GPCRs:** «G protein-coupled receptors» o receptores acoplados a proteína G
- **H3:** histona 3
- **HAART:** «highly active antiretroviral therapy» o terapia antirretroviral altamente activa
- **HBSS:** «Hank's balanced salt solution» o solución salina equilibrada de Hanks
- **ICAM:** «intercellular adhesion molecule» o molécula de adhesión intercelular
- **IKKε:** «I-kappa-B kinase epsilon»
- **IL:** interleucina
- **iODN:** inhibidor de oligodeoxinucleótidos
- **IRAK:** «interleukin-1 receptor-associated kinase» o quinasa asociada al receptor de la IL-1
- **LPS:** lipopolisacárido
- **LTF:** lactoferrina
- **MAP:** «mitogen-activated protein» o proteína activada por mitógenos
- **MEK:** «mitogen-activated protein kinase kinase» o proteína activada por mitógenos quinasa quinasa
- **MMP-9:** «matrix metalloproteinase 9» o metaloproteasa de la matriz 9
- **MPA:** medroxiprogesterona
- **MPO:** «myeloperoxidase» o mieloperoxidasa
- **NE:** «neutrophil elastase» o elastasa de neutrófilos
- **NETs:** «neutrophil extracellular traps» o trampas extracelulares de neutrófilos
- **NIH:** «National Institutes of Health» o Instituto Nacional de la Salud (EEUU)
- **NK:** «natural killer»
- **NRL:** «nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors» o receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos
- **NOX2:** NADPH oxidasa 2
- **ODN:** oligodeoxinucleótidos
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **ONUSIDA:** Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
- **ORF:** «open reading frame» o marco de lectura abierto
- **PAD4:** «protein arginine deiminase 4» o proteína arginina-deiminasa tipo 4
- **PAMPs:** «pathogen-associated molecular pattern molecules» o patrón molecular asociado a patógenos
- **PBS:** «phosphate-buffered saline» o tampón fosfato salino
- **PE:** «phycoerythrin» o ficoeritrina
- **PEP:** «post-exposure prophylaxis» o profilaxis posterior a la exposición
- **PI3K:** «phosphoinositide 3-kinase» o fosfoinositol-3 quinasa
- **PKC:** «protein kinase C» o proteína quinasa C



- **PMA:** «phorbol-12-myristate 13-acetate» o forbol 12-miristato 13-acetato
- **PrEP:** «pre-exposure prophylaxis» o profilaxis de preexposición
- **PRR:** «pattern recognition receptors» o receptores de reconocimiento de patrones
- **PS:** «phosphatidylserine» o fosfatidilserina
- **PV-VIH:** partículas virales de VIH
- **qPCR:** «quantitative polymerase chain reaction» o reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
- **RCU:** «red calibrated units» o unidades calibradas para la señal en rojo
- **RIG-I:** «retinoic acid-inducible gene I» o gen inducible por ácido retinoico
- **RLR:** «retinoic acid-inducible gene I (RIG-I)-like receptors» o receptores de ARN tipo gen inducible por ácido retinoico
- **ROS:** «reactive oxygen species» o especies reactivas del oxígeno
- **Rv:** «reverse»
- **SASP:** «senescence-associated secretory phenotype» o fenotipo secretorio asociado a una senescencia proinflamatoria
- **SIDA:** síndrome de la inmunodeficiencia adquirida
- **SK3:** «small-conductance calcium-activated potassium channel» o canal de potasio activado por calcio de baja conductancia
- **SSC:** «side scatter» o dispersión lateral
- **TBK1:** «TANK-binding kinase 1»
- **TGF:** tracto genital femenino
- **TLR:** «Toll-like receptor» o receptor tipo Toll
- **TNF:** «tumoral necrosis factor» o factor de necrosis tumoral
- **UNAIDS:** «Joint United Nations Programme on HIV/AIDS» o Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA
- **VIH:** virus de la inmunodeficiencia humana
- **VIH- $\Delta$ env:** virus de la inmunodeficiencia humana sin la envoltura viral
- **VIH-NETs:** NETs que han capturado el VIH
- **VIS:** virus de la inmunodeficiencia en simios

## Bibliografía

1. Department of Health and Human Services. *HIV and AIDS Resources. A Timeline of HIV and AIDS*. 2023; Available from: <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/history/hiv-and-aids-timeline/>.
2. United Nations. *Global Issues - AIDS*. 2023; Available from: <https://www.un.org/en/global-issues/aids>.
3. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. **220**(4599): p. 868-71.
4. Lucas, S. and A.M. Nelson, *HIV and the spectrum of human disease*. *J Pathol*, 2015. **235**(2): p. 229-41.
5. UNAIDS. *The joint United Nations programme on HIV and AIDS. HIV and AIDS - Basic facts*. 2023; Available from: <https://www.unaids.org/en/frequently-asked-questions-about-hiv-and-aids>.
6. Turner, B.G. and M.F. Summers, *Structural biology of HIV*. *J Mol Biol*, 1999. **285**(1): p. 1-32.
7. WHO, *HIV - Key facts*. 2023.
8. UNAIDS, *Global HIV and AIDS statistics*. 2023.
9. UNAIDS, *Prevalence of HIV/AIDS - Prevalence by gender*. 2021.
10. CDC, *Diagnoses of HIV infection in the United States and dependent areas, 2019*.
11. Grosso, T.M., et al., *Identifying the needs of older people living with HIV (>= 50 years old) from multiple centres over the world: a descriptive analysis*. *AIDS Res Ther*, 2023. **20**(1): p. 10.
12. Rubtsova, A.A., et al., *Healthy Aging in Older Women Living with HIV Infection: a Systematic Review of Psychosocial Factors*. *Curr HIV/AIDS Rep*, 2017. **14**(1): p. 17-30.
13. Durvasula, R., *HIV/AIDS in older women: unique challenges, unmet needs*. *Behav Med*, 2014. **40**(3): p. 85-98.
14. Akatukwasa, C., et al., *Dimensions of HIV-related stigma in rural communities in Kenya and Uganda at the start of a large HIV 'test and treat' trial*. *PLoS One*, 2021. **16**(5): p. e0249462.
15. NIA-NIH. *HIV, AIDS, and Older Adults*. 2021; Available from: <https://www.nia.nih.gov/health/hiv-aids-and-older-adults#:~:text=Older%20people%20living%20with%20HIV,tend%20to%20be%20more%20isolated>.
16. Westreich, D., M. Rosenberg, S. Schwartz, and G. Swamy, *Representation of women and pregnant women in HIV research: a limited systematic review*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e73398.
17. Namiba, A., et al., *From presumptive exclusion towards fair inclusion: perspectives on the involvement of women living with HIV in clinical trials, including stakeholders' views*. *Ther Adv Infect Dis*, 2022. **9**: p. 20499361221075454.
18. Curno, M.J., et al., *A Systematic Review of the Inclusion (or Exclusion) of Women in HIV Research: From Clinical Studies of Antiretrovirals and Vaccines to Cure Strategies*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2016. **71**(2): p. 181-8.
19. E, O.M., et al., *Oral pre-exposure prophylaxis (PrEP) to prevent HIV: a systematic review and meta-analysis of clinical effectiveness, safety, adherence and risk compensation in all populations*. *BMJ Open*, 2022. **12**(5): p. e048478.
20. Freed, E.O., *HIV-1 assembly, release and maturation*. *Nat Rev Microbiol*, 2015. **13**(8): p. 484-96.
21. *Human Immunodeficiency Viruses and Human T-Cell Lymphotropic Viruses*. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1996. **67**: p. 1-424.
22. Fanales-Belasio, E., M. Raimondo, B. Suligoj, and S. Butto, *HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview*. *Ann Ist Super Sanita*, 2010. **46**(1): p. 5-14.
23. Emerman, M. and M.H. Malim, *HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology*. *Science*, 1998. **280**(5371): p. 1880-4.
24. Garcia, J.V. and A.D. Miller, *Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef*. *Nature*, 1991. **350**(6318): p. 508-11.

25. Aiken, C., et al., *Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain*. Cell, 1994. **76**(5): p. 853-64.
26. Grivel, J.C., R.J. Shattock, and L.B. Margolis, *Selective transmission of R5 HIV-1 variants: where is the gatekeeper?* J Transl Med, 2011. **9 Suppl 1**(Suppl 1): p. S6.
27. Rodriguez-Garcia, M., M.V. Patel, and C.R. Wira, *Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract*. J Reprod Immunol, 2013. **97**(1): p. 74-84.
28. Shen, Q., et al., *Nuclear Import of HIV-1*. Viruses, 2021. **13**(11).
29. Rossi, E., M.E. Meuser, C.J. Cunanan, and S. Cocklin, *Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein*. Life (Basel), 2021. **11**(2).
30. *The HIV life cycle*. Available from: <https://scienceofhiv.org/wp/life-cycle/>.
31. Ritchie, M.R.a.H., *HIV/AIDS*. Our World in Data, 2018.
32. Kelesidis, T. and R.J. Landovitz, *Preexposure prophylaxis for HIV prevention*. Curr HIV/AIDS Rep, 2011. **8**(2): p. 94-103.
33. Sepodes, B., et al., *Implementation and Access to Pre-exposure Prophylaxis for Human Immunodeficiency Virus by Men Who Have Sex With Men in Europe*. Front Med (Lausanne), 2021. **8**: p. 722247.
34. Durham, S.H., A. Milam, D. Waer, and E.B. Chahine, *Cabotegravir: The First Long-Acting Injectable for HIV Preexposure Prophylaxis*. Ann Pharmacother, 2023. **57**(3): p. 306-316.
35. Baeten, J.M., et al., *Antiretroviral prophylaxis for HIV prevention in heterosexual men and women*. N Engl J Med, 2012. **367**(5): p. 399-410.
36. Rodriguez-Garcia, M., K. Connors, and M. Ghosh, *HIV Pathogenesis in the Human Female Reproductive Tract*. Curr HIV/AIDS Rep, 2021. **18**(2): p. 139-156.
37. Hodges-Mameletzis, I., et al., *Pre-Exposure Prophylaxis for HIV Prevention in Women: Current Status and Future Directions*. Drugs, 2019. **79**(12): p. 1263-1276.
38. Abdool Karim, Q., et al., *Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women*. Science, 2010. **329**(5996): p. 1168-74.
39. Van Damme, L., et al., *Preexposure prophylaxis for HIV infection among African women*. N Engl J Med, 2012. **367**(5): p. 411-22.
40. Marrazzo, J.M., et al., *Tenofovir-based preexposure prophylaxis for HIV infection among African women*. N Engl J Med, 2015. **372**(6): p. 509-18.
41. Delany-Moretlwe, S., et al., *Tenofovir 1% vaginal gel for prevention of HIV-1 infection in women in South Africa (FACTS-001): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Infect Dis, 2018. **18**(11): p. 1241-1250.
42. Jain, S. and K.H. Mayer, *Practical guidance for nonoccupational postexposure prophylaxis to prevent HIV infection: an editorial review*. AIDS, 2014. **28**(11): p. 1545-54.
43. Diaz-Brito, V., et al., *Post-exposure prophylaxis for HIV infection: a clinical trial comparing lopinavir/ritonavir versus atazanavir each with zidovudine/lamivudine*. Antivir Ther, 2012. **17**(2): p. 337-46.
44. Menendez-Arias, L. and R. Delgado, *Update and latest advances in antiretroviral therapy*. Trends Pharmacol Sci, 2022. **43**(1): p. 16-29.
45. Fauci, A.S., *HIV and AIDS: 20 years of science*. Nat Med, 2003. **9**(7): p. 839-43.
46. McLeod, G.X. and S.M. Hammer, *Zidovudine: five years later*. Ann Intern Med, 1992. **117**(6): p. 487-501.
47. (España), A.e.d.m.y.p.s.M.d.S. *ATRIPLA 600 mg/200 mg/245 mg COMPRIMIDOS RECUBIERTOS CON PELICULA*. 2023; Available from: <https://cima.aemps.es/cima/publico/detalle.html?nregistro=07430001#>.
48. Lee, F.J., J. Amin, and A. Carr, *Efficacy of initial antiretroviral therapy for HIV-1 infection in adults: a systematic review and meta-analysis of 114 studies with up to 144 weeks' follow-up*. PLoS One, 2014. **9**(5): p. e97482.

49. Brizzi, M., S.E. Perez, S.M. Michienzi, and M.E. Badowski, *Long-acting injectable antiretroviral therapy: will it change the future of HIV treatment?* Ther Adv Infect Dis, 2023. **10**: p. 20499361221149773.
50. Shubber, Z., et al., *Patient-Reported Barriers to Adherence to Antiretroviral Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis*. PLoS Med, 2016. **13**(11): p. e1002183.
51. Iacob, S.A., D.G. Iacob, and G. Jugulete, *Improving the Adherence to Antiretroviral Therapy, a Difficult but Essential Task for a Successful HIV Treatment-Clinical Points of View and Practical Considerations*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 831.
52. (EMA), E.M.A. *VOCABRIA Authorisation details*. 2020; Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vocabria#authorisation-details-section>.
53. (EMA), E.M.A., *Rekamby's Authorisation details*. 2020.
54. Gandhi, M., J. Nachega, V. Miller, and T. Wilkin, *Benefits and limitations of different study designs for long-acting antiretroviral therapy among people living with HIV with viremia*. J Int AIDS Soc, 2023. **26 Suppl 2**(Suppl 2): p. e26093.
55. Calleja-Hernandez, M.A., et al., *Contribution of cabotegravir + rilpivirine long-acting for the treatment of HIV-1 infection*. Farm Hosp, 2022. **46**(4): p. 208-214.
56. Paik, J., *Lenacapavir: First Approval*. Drugs, 2022. **82**(14): p. 1499-1504.
57. Roser, M.R., H. *HIV/AIDS - Share of people practicing safe sex*. 2019; Available from: <https://ourworldindata.org/hiv-aids#share-of-people-practicing-safe-sex>.
58. Baggaley, R.F., R.G. White, and M.C. Boily, *HIV transmission risk through anal intercourse: systematic review, meta-analysis and implications for HIV prevention*. Int J Epidemiol, 2010. **39**(4): p. 1048-63.
59. Jin, F., et al., *Per-contact probability of HIV transmission in homosexual men in Sydney in the era of HAART*. AIDS, 2010. **24**(6): p. 907-13.
60. Boily, M.C., et al., *Heterosexual risk of HIV-1 infection per sexual act: systematic review and meta-analysis of observational studies*. Lancet Infect Dis, 2009. **9**(2): p. 118-29.
61. de Lara, L.M., R.S. Parthasarathy, and M. Rodriguez-Garcia, *Mucosal Immunity and HIV Acquisition in Women*. Curr Opin Physiol, 2021. **19**: p. 32-38.
62. Zink, T., et al., *Comparison of methods for identifying ano-genital injury after consensual intercourse*. J Emerg Med, 2010. **39**(1): p. 113-8.
63. Brawner, B.M., et al., *Exploring Genitoanal Injury and HIV Risk Among Women: Menstrual Phase, Hormonal Birth Control, and Injury Frequency and Prevalence*. J Acquir Immune Defic Syndr, 2016. **71**(2): p. 207-12.
64. Nazli, A., et al., *Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation*. PLoS Pathog, 2010. **6**(4): p. e1000852.
65. Carias, A.M., et al., *Defining the interaction of HIV-1 with the mucosal barriers of the female reproductive tract*. J Virol, 2013. **87**(21): p. 11388-400.
66. Yasen, A., et al., *Release of HIV-1 sequestered in the vesicles of oral and genital mucosal epithelial cells by epithelial-lymphocyte interaction*. PLoS Pathog, 2017. **13**(2): p. e1006247.
67. Ferreira, V.H., et al., *Medroxyprogesterone Acetate Regulates HIV-1 Uptake and Transcytosis but Not Replication in Primary Genital Epithelial Cells, Resulting in Enhanced T-Cell Infection*. J Infect Dis, 2015. **211**(11): p. 1745-56.
68. Wu, Z., Z. Chen, and D.M. Phillips, *Human genital epithelial cells capture cell-free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ Cells: implications for mechanisms of sexual transmission*. J Infect Dis, 2003. **188**(10): p. 1473-82.
69. Sloan, R.D., et al., *Productive entry of HIV-1 during cell-to-cell transmission via dynamin-dependent endocytosis*. J Virol, 2013. **87**(14): p. 8110-23.
70. Masson, L., et al., *Genital inflammation and the risk of HIV acquisition in women*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(2): p. 260-9.
71. Passmore, J.S. and H.B. Jaspan, *Vaginal microbes, inflammation, and HIV risk in African women*. Lancet Infect Dis, 2018. **18**(5): p. 483-484.

72. Dabee, S., et al., *Defining characteristics of genital health in South African adolescent girls and young women at high risk for HIV infection*. PLoS One, 2019. **14**(4): p. e0213975.
73. Zevin, A.S., et al., *Microbiome Composition and Function Drives Wound-Healing Impairment in the Female Genital Tract*. PLoS Pathog, 2016. **12**(9): p. e1005889.
74. Klatt, N.R., et al., *Vaginal bacteria modify HIV tenofovir microbicide efficacy in African women*. Science, 2017. **356**(6341): p. 938-945.
75. Arnold, K.B., et al., *Increased levels of inflammatory cytokines in the female reproductive tract are associated with altered expression of proteases, mucosal barrier proteins, and an influx of HIV-susceptible target cells*. Mucosal Immunol, 2016. **9**(1): p. 194-205.
76. Anahtar, M.N., et al., *Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract*. Immunity, 2015. **42**(5): p. 965-76.
77. Lennard, K., et al., *Microbial Composition Predicts Genital Tract Inflammation and Persistent Bacterial Vaginosis in South African Adolescent Females*. Infect Immun, 2018. **86**(1).
78. Gosmann, C., et al., *Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women*. Immunity, 2017. **46**(1): p. 29-37.
79. McKinnon, L.R., et al., *The Evolving Facets of Bacterial Vaginosis: Implications for HIV Transmission*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2019. **35**(3): p. 219-228.
80. Tyssen, D., et al., *Anti-HIV-1 Activity of Lactic Acid in Human Cervicovaginal Fluid*. mSphere, 2018. **3**(4).
81. Tachedjian, G., D.E. O'Hanlon, and J. Ravel, *The implausible "in vivo" role of hydrogen peroxide as an antimicrobial factor produced by vaginal microbiota*. Microbiome, 2018. **6**(1): p. 29.
82. R Scott McClelland, J.R.L., Sujatha Srinivasan, John Kinuthia, Grace C John-Stewart, Walter Jaoko, Barbra A Richardson, Krista Yuhua, Tina L Fiedler, Kishorchandra N Mandaliya, Matthew M Munch, Nelly R Mugo, Craig R Cohen, Jared M Baeten, Connie Celum, Julie Overbaugh, David N Fredricks., *Evaluation of the association between the concentrations of key vaginal bacteria and the increased risk of HIV acquisition in African women from five cohorts: a nested case-control study*. The Lancet Infectious Diseases, 2018. **18**(5): p. 554-564.
83. Hoang, T., et al., *The cervicovaginal mucus barrier to HIV-1 is diminished in bacterial vaginosis*. PLoS Pathog, 2020. **16**(1): p. e1008236.
84. Cherne, M.D., et al., *Matrix Metalloproteinases Expressed in Response to Bacterial Vaginosis Disrupt the Endocervical Epithelium, Increasing Transmigration of HIV*. Infect Immun, 2020. **88**(4).
85. Kaur, H., M. Merchant, M.M. Haque, and S.S. Mande, *Crosstalk Between Female Gonadal Hormones and Vaginal Microbiota Across Various Phases of Women's Gynecological Lifecycle*. Front Microbiol, 2020. **11**: p. 551.
86. Smith, S.B. and J. Ravel, *The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology*. J Physiol, 2017. **595**(2): p. 451-463.
87. Gliniewicz, K., et al., *Comparison of the Vaginal Microbiomes of Premenopausal and Postmenopausal Women*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 193.
88. Hickey, R.J., et al., *Vaginal microbiota of adolescent girls prior to the onset of menarche resemble those of reproductive-age women*. mBio, 2015. **6**(2).
89. WHO, *Violence against women*. 2021.
90. Cools, S.K., A., *Resources and Intimate Partner Violence in Sub-Saharan Africa*. World Development, 2017. **95**: p. 211-230.
91. Durevall, D. and A. Lindskog, *Intimate partner violence and HIV in ten sub-Saharan African countries: what do the Demographic and Health Surveys tell us?* Lancet Glob Health, 2015. **3**(1): p. e34-43.
92. LeGrand, S., et al., *A Review of Recent Literature on Trauma Among Individuals Living with HIV*. Curr HIV/AIDS Rep, 2015. **12**(4): p. 397-405.
93. UNESCO. *UNESCO strategy on education for health and well-being*. 2023; Available from: <https://unesdoc.unesco.org/ark:/48223/pf0000381728>.

94. UNAIDS. *Women and HIV*. 2021; Available from: <https://www.avert.org/professionals/hiv-social-issues/key-affected-populations/women>.
95. Torkashvand, S.P., A.; Jiriae, N.; Hoseini, M.; Ahmadpanah, M. , *Sexual Violence in Women with HIV Positive Spouse and Their Mental Health*. J Res Health Sci, 2020 Feb. **20**.
96. Pascoe, S.J., et al., *Poverty, food insufficiency and HIV infection and sexual behaviour among young rural Zimbabwean women*. PLoS One, 2015. **10**(1): p. e0115290.
97. Abdool Karim, Q., S. Sibeko, and C. Baxter, *Preventing HIV infection in women: a global health imperative*. Clin Infect Dis, 2010. **50 Suppl 3**(Suppl 3): p. S122-9.
98. Wira, C.R., M. Rodriguez-Garcia, and M.V. Patel, *The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(4): p. 217-30.
99. Givan, A.L., et al., *Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina*. Am J Reprod Immunol, 1997. **38**(5): p. 350-9.
100. Rodriguez-Garcia, M., et al., *Phenotype and susceptibility to HIV infection of CD4+ Th17 cells in the human female reproductive tract*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(6): p. 1375-85.
101. Trifonova, R.T., J. Lieberman, and D. van Baarle, *Distribution of immune cells in the human cervix and implications for HIV transmission*. Am J Reprod Immunol, 2014. **71**(3): p. 252-64.
102. Hickey, D.K., M.V. Patel, J.V. Fahey, and C.R. Wira, *Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections*. J Reprod Immunol, 2011. **88**(2): p. 185-94.
103. McKinnon, L.R., et al., *Optimizing viable leukocyte sampling from the female genital tract for clinical trials: an international multi-site study*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e85675.
104. Wira, C.R., et al., *Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions*. Immunol Rev, 2005. **206**: p. 306-35.
105. Rodriguez-Garcia, M., et al., *Dendritic cells from the human female reproductive tract rapidly capture and respond to HIV*. Mucosal Immunol, 2017. **10**(2): p. 531-544.
106. Pena-Cruz, V., et al., *HIV-1 replicates and persists in vaginal epithelial dendritic cells*. J Clin Invest, 2018. **128**(8): p. 3439-3444.
107. Roan, N.R., et al., *Interaction of fibronectin with semen amyloids synergistically enhances HIV infection*. J Infect Dis, 2014. **210**(7): p. 1062-6.
108. Usmani, S.M., et al., *Direct visualization of HIV-enhancing endogenous amyloid fibrils in human semen*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 3508.
109. Balandya, E., et al., *Semen protects CD4+ target cells from HIV infection but promotes the preferential transmission of R5 tropic HIV*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7596-604.
110. Allen, S.A., et al., *Characterization of the Influence of Semen-Derived Enhancer of Virus Infection on the Interaction of HIV-1 with Female Reproductive Tract Tissues*. J Virol, 2015. **89**(10): p. 5569-80.
111. Roan, N.R., et al., *Semen amyloids participate in spermatozoa selection and clearance*. Elife, 2017. **6**.
112. George, A.F., et al., *Seminal plasma promotes decidualization of endometrial stromal fibroblasts in vitro from women with and without inflammatory disorders in a manner dependent on interleukin-11 signaling*. Hum Reprod, 2020. **35**(3): p. 617-640.
113. Camus, C., et al., *Comparison of the effect of semen from HIV-infected and uninfected men on CD4+ T-cell infection*. AIDS, 2016. **30**(8): p. 1197-208.
114. Kafka, J.K., et al., *Endometrial epithelial cell response to semen from HIV-infected men during different stages of infection is distinct and can drive HIV-1-long terminal repeat*. AIDS, 2012. **26**(1): p. 27-36.
115. Marques de Menezes, E.G., et al., *Seminal Plasma-Derived Extracellular-Vesicle Fractions from HIV-Infected Men Exhibit Unique MicroRNA Signatures and Induce a Proinflammatory Response in Cells Isolated from the Female Reproductive Tract*. J Virol, 2020. **94**(16).

116. Tavoschi, L., J. Gomes Dias, A. Pharris, and E.E.H.S. Network, *New HIV diagnoses among adults aged 50 years or older in 31 European countries, 2004-15: an analysis of surveillance data*. *Lancet HIV*, 2017. **4**(11): p. e514-e521.
117. Pudney, J., A.J. Quayle, and D.J. Anderson, *Immunological microenvironments in the human vagina and cervix: mediators of cellular immunity are concentrated in the cervical transformation zone*. *Biol Reprod*, 2005. **73**(6): p. 1253-63.
118. Galand, P., F. Leroy, and J. Chretien, *Effect of oestradiol on cell proliferation and histological changes in the uterus and vagina of mice*. *J Endocrinol*, 1971. **49**(2): p. 243-52.
119. Vishwanathan, S.A., et al., *High susceptibility to repeated, low-dose, vaginal SHIV exposure late in the luteal phase of the menstrual cycle of pigtail macaques*. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2011. **57**(4): p. 261-4.
120. Saba, E., et al., *Productive HIV-1 infection of human cervical tissue ex vivo is associated with the secretory phase of the menstrual cycle*. *Mucosal Immunol*, 2013. **6**(6): p. 1081-90.
121. Nilsson, K., B. Risberg, and G. Heimer, *The vaginal epithelium in the postmenopause--cytology, histology and pH as methods of assessment*. *Maturitas*, 1995. **21**(1): p. 51-6.
122. Aaby, P., et al., *Age of wife as a major determinant of male-to-female transmission of HIV-2 infection: a community study from rural West Africa*. *AIDS*, 1996. **10**(13): p. 1585-90.
123. Morrison, C.S., et al., *Hormonal contraception and the risk of HIV acquisition: an individual participant data meta-analysis*. *PLoS Med*, 2015. **12**(1): p. e1001778.
124. Hapgood, J.P., *Is the Injectable Contraceptive Depo-Medroxyprogesterone Acetate (DMPA-IM) Associated with an Increased Risk for HIV Acquisition? The Jury Is Still Out*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2020. **36**(5): p. 357-366.
125. Curtis, L.T., S. Sebens, and H.B. Frieboes, *Modeling of tumor response to macrophage and T lymphocyte interactions in the liver metastatic microenvironment*. *Cancer Immunol Immunother*, 2021. **70**(5): p. 1475-1488.
126. Edfeldt, G., et al., *Regular Use of Depot Medroxyprogesterone Acetate Causes Thinning of the Superficial Lining and Apical Distribution of Human Immunodeficiency Virus Target Cells in the Human Ectocervix*. *J Infect Dis*, 2022. **225**(7): p. 1151-1161.
127. Evidence for Contraceptive, O. and H.I.V.O.T. Consortium, *HIV incidence among women using intramuscular depot medroxyprogesterone acetate, a copper intrauterine device, or a levonorgestrel implant for contraception: a randomised, multicentre, open-label trial*. *Lancet*, 2019. **394**(10195): p. 303-313.
128. Punyadeera, C., et al., *Effects of selective oestrogen receptor modulators on proliferation in tissue cultures of pre- and postmenopausal human endometrium*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008. **112**(1-3): p. 102-9.
129. Gipson, I.K., et al., *Mucin genes expressed by human female reproductive tract epithelia*. *Biol Reprod*, 1997. **56**(4): p. 999-1011.
130. Vigil, P., et al., *Scanning electron and light microscopy study of the cervical mucus in women with polycystic ovary syndrome*. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 2009. **58**(1): p. 21-7.
131. Mall, A.S., et al., *Mucus and Mucins: do they have a role in the inhibition of the human immunodeficiency virus?* *Virology*, 2017. **14**(1): p. 192.
132. Elstein, M., *Functions and physical properties of mucus in the female genital tract*. *Br Med Bull*, 1978. **34**(1): p. 83-8.
133. Shukair, S.A., et al., *Human cervicovaginal mucus contains an activity that hinders HIV-1 movement*. *Mucosal Immunol*, 2013. **6**(2): p. 427-34.
134. Wira, C.R., et al., *Innate immunity in the human female reproductive tract: endocrine regulation of endogenous antimicrobial protection against HIV and other sexually transmitted infections*. *Am J Reprod Immunol*, 2011. **65**(3): p. 196-211.
135. Patel, M.V., et al., *Innate immunity in the vagina (Part II): Anti-HIV activity and antiviral content of human vaginal secretions*. *Am J Reprod Immunol*, 2014. **72**(1): p. 22-33.

136. Patel, M.V., J.V. Fahey, R.M. Rossoll, and C.R. Wira, *Innate immunity in the vagina (part I): estradiol inhibits HBD2 and elafin secretion by human vaginal epithelial cells*. *Am J Reprod Immunol*, 2013. **69**(5): p. 463-74.
137. Fahey, J.V., et al., *Estradiol selectively regulates innate immune function by polarized human uterine epithelial cells in culture*. *Mucosal Immunol*, 2008. **1**(4): p. 317-25.
138. Wagner, R.D. and S.J. Johnson, *Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to Candida albicans*. *J Biomed Sci*, 2012. **19**(1): p. 58.
139. Fahey, J.V. and C.R. Wira, *Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture*. *J Infect Dis*, 2002. **185**(11): p. 1606-13.
140. Evans, J. and L.A. Salamonsen, *Inflammation, leukocytes and menstruation*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2012. **13**(4): p. 277-88.
141. Chavan, A.R., O.W. Griffith, and G.P. Wagner, *The inflammation paradox in the evolution of mammalian pregnancy: turning a foe into a friend*. *Curr Opin Genet Dev*, 2017. **47**: p. 24-32.
142. Azlan, A., L.A. Salamonsen, J. Hutchison, and J. Evans, *Endometrial inflammasome activation accompanies menstruation and may have implications for systemic inflammatory events of the menstrual cycle*. *Hum Reprod*, 2020. **35**(6): p. 1363-1376.
143. Barr, F.D., C. Ochsenbauer, C.R. Wira, and M. Rodriguez-Garcia, *Neutrophil extracellular traps prevent HIV infection in the female genital tract*. *Mucosal Immunol*, 2018. **11**(5): p. 1420-1428.
144. Smith, J.M., C.R. Wira, M.W. Fanger, and L. Shen, *Human fallopian tube neutrophils--a distinct phenotype from blood neutrophils*. *Am J Reprod Immunol*, 2006. **56**(4): p. 218-29.
145. Mohammadi, A., et al., *The impact of cervical cytobrush sampling on cervico-vaginal immune parameters and microbiota relevant to HIV susceptibility*. *Sci Rep*, 2020. **10**(1): p. 8514.
146. Liew, P.X. and P. Kubes, *The Neutrophil's Role During Health and Disease*. *Physiol Rev*, 2019. **99**(2): p. 1223-1248.
147. Mortaz, E., et al., *Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2171.
148. Edwards, S.W., *The development and structure of mature neutrophils*. *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*, ed. S.W. Edwards. 2005, Edwards S. New York: Cambridge Univ. Press. 33-76.
149. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, *Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse*. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(6): p. 378-91.
150. Futosi, K., S. Fodor, and A. Mocsai, *Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways*. *Int Immunopharmacol*, 2013. **17**(3): p. 638-50.
151. Hidalgo, A., E.R. Chilvers, C. Summers, and L. Koenderman, *The Neutrophil Life Cycle*. *Trends Immunol*, 2019. **40**(7): p. 584-597.
152. Ng, L.G., R. Ostuni, and A. Hidalgo, *Heterogeneity of neutrophils*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(4): p. 255-265.
153. Amarante-Mendes, G.P., et al., *Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2379.
154. Hayashi, F., T.K. Means, and A.D. Luster, *Toll-like receptors stimulate human neutrophil function*. *Blood*, 2003. **102**(7): p. 2660-9.
155. Sengelov, H., *Complement receptors in neutrophils*. *Crit Rev Immunol*, 1995. **15**(2): p. 107-31.
156. Zimmermann, M., et al., *IFNalpha enhances the production of IL-6 by human neutrophils activated via TLR8*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 19674.
157. Pare, G., et al., *The Inhibitory Receptor CLEC12A Regulates PI3K-Akt Signaling to Inhibit Neutrophil Activation and Cytokine Release*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 650808.
158. Guerrero-Juarez, C.F., et al., *C-type lectin receptor expression is a hallmark of neutrophils infiltrating the skin in epidermolysis bullosa acquisita*. *Front Immunol*, 2023. **14**: p. 1266359.
159. Borrego, F., *The CD300 molecules: an emerging family of regulators of the immune system*. *Blood*, 2013. **121**(11): p. 1951-60.



160. Tokieda, S., et al., *Dendritic cell immunoreceptor 1 alters neutrophil responses in the development of experimental colitis*. BMC Immunol, 2015. **16**: p. 64.
161. van Rees, D.J., et al., *Immunoreceptors on neutrophils*. Semin Immunol, 2016. **28**(2): p. 94-108.
162. Kirsebom, F.C.M., et al., *Neutrophil recruitment and activation are differentially dependent on MyD88/TRIF and MAVS signaling during RSV infection*. Mucosal Immunol, 2019. **12**(5): p. 1244-1255.
163. Kawasaki, T. and T. Kawai, *Toll-like receptor signaling pathways*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 461.
164. Ajibade, A.A., H.Y. Wang, and R.F. Wang, *Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling*. Trends Immunol, 2013. **34**(7): p. 307-16.
165. Koller, B., et al., *Innate immune receptors on neutrophils and their role in chronic lung disease*. Eur J Clin Invest, 2009. **39**(7): p. 535-47.
166. Thiam, H.R., S.L. Wong, D.D. Wagner, and C.M. Waterman, *Cellular Mechanisms of NETosis*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2020. **36**: p. 191-218.
167. Winterbourn, C.C., A.J. Kettle, and M.B. Hampton, *Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function*. Annu Rev Biochem, 2016. **85**: p. 765-92.
168. Mollinedo, F., *Neutrophil Degranulation, Plasticity, and Cancer Metastasis*. Trends Immunol, 2019. **40**(3): p. 228-242.
169. DeLeo, F.R. and L.H. Allen, *Phagocytosis and neutrophil extracellular traps*. Fac Rev, 2020. **9**: p. 25.
170. Ustyanovska Avtenyuk, N., N. Visser, E. Bremer, and V.R. Wiersma, *The Neutrophil: The Underdog That Packs a Punch in the Fight against Cancer*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
171. Cao, L., et al., *An unexpected role of neutrophils in clearing apoptotic hepatocytes in vivo*. Elife, 2023. **12**.
172. Manfredi, A.A., G.A. Ramirez, P. Rovere-Querini, and N. Maugeri, *The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 288.
173. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
174. Saitoh, T., et al., *Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1*. Cell Host Microbe, 2012. **12**(1): p. 109-16.
175. Raftery, M.J., et al., *beta2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps*. J Exp Med, 2014. **211**(7): p. 1485-97.
176. Mohanty, T., et al., *A novel mechanism for NETosis provides antimicrobial defense at the oral mucosa*. Blood, 2015. **126**(18): p. 2128-37.
177. Cacciotto, C., et al., *Mycoplasma lipoproteins are major determinants of neutrophil extracellular trap formation*. Cell Microbiol, 2016. **18**(12): p. 1751-1762.
178. Byrd, A.S., et al., *An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to Candida albicans*. J Immunol, 2013. **190**(8): p. 4136-48.
179. Rossaint, J., et al., *Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation*. Blood, 2014. **123**(16): p. 2573-84.
180. Chen, T., et al., *Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 775267.
181. Ma, F., et al., *Streptococcus Suis Serotype 2 Stimulates Neutrophil Extracellular Traps Formation via Activation of p38 MAPK and ERK1/2*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 2854.
182. Hiroki, C.H., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Effectively Control Acute Chikungunya Virus Infection*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 3108.
183. Sung, P.S. and S.L. Hsieh, *CLEC2 and CLEC5A: Pathogenic Host Factors in Acute Viral Infections*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2867.
184. Palmer, L.J., C. Damgaard, P. Holmstrup, and C.H. Nielsen, *Influence of complement on neutrophil extracellular trap release induced by bacteria*. J Periodontal Res, 2016. **51**(1): p. 70-6.
185. Clark, H.L., et al., *Protein Deiminase 4 and CR3 Regulate Aspergillus fumigatus and beta-Glucan-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation, but Hyphal Killing Is Dependent Only on CR3*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 1182.

186. Doua, D.N., M.A. Khan, H. Grasemann, and N. Palaniyar, *SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(9): p. 2817-22.
187. DeSouza-Vieira, T., et al., *Neutrophil extracellular traps release induced by Leishmania: role of PI3Kgamma, ERK, PI3Ksigma, PKC, and [Ca<sup>2+</sup>]*. J Leukoc Biol, 2016. **100**(4): p. 801-810.
188. Hakkim, A., et al., *Activation of the Raf-MEK-ERK pathway is required for neutrophil extracellular trap formation*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(2): p. 75-7.
189. Doua, D.N., et al., *Akt is essential to induce NADPH-dependent NETosis and to switch the neutrophil death to apoptosis*. Blood, 2014. **123**(4): p. 597-600.
190. Hueber, W., et al., *Effects of AIN457, a fully human antibody to interleukin-17A, on psoriasis, rheumatoid arthritis, and uveitis*. Sci Transl Med, 2010. **2**(52): p. 52ra72.
191. Wang, Y., et al., *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J Cell Biol, 2009. **184**(2): p. 205-13.
192. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2007. **176**(2): p. 231-41.
193. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-94.
194. Tan, C., M. Aziz, and P. Wang, *The vitals of NETs*. J Leukoc Biol, 2021. **110**(4): p. 797-808.
195. Khan, M.A., et al., *JNK Activation Turns on LPS- and Gram-Negative Bacteria-Induced NADPH Oxidase-Dependent Suicidal NETosis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 3409.
196. Stacey, H.D., et al., *IgA potentiates NETosis in response to viral infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021. **118**(27).
197. Kessenbrock, K., et al., *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 623-5.
198. Martinelli, S., et al., *Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 44123-32.
199. Pilszczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
200. Manda, A., M.P. Pruchniak, M. Arazna, and U.A. Demkow, *Neutrophil extracellular traps in physiology and pathology*. Cent Eur J Immunol, 2014. **39**(1): p. 116-21.
201. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nat Med, 2012. **18**(9): p. 1386-93.
202. Kenny, E.F., et al., *Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways*. Elife, 2017. **6**.
203. Leshner, M., et al., *PAD4 mediated histone hypercitrullination induces heterochromatin decondensation and chromatin unfolding to form neutrophil extracellular trap-like structures*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 307.
204. Delgado-Rizo, V., et al., *Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 81.
205. Yousefi, S., et al., *Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps*. Cell Death Differ, 2009. **16**(11): p. 1438-44.
206. Denning, N.L., M. Aziz, S.D. Gurien, and P. Wang, *DAMPs and NETs in Sepsis*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2536.
207. Papayannopoulos, V., *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 134-147.
208. Poli, V. and I. Zanoni, *Neutrophil intrinsic and extrinsic regulation of NETosis in health and disease*. Trends Microbiol, 2023. **31**(3): p. 280-293.
209. Van Avondt, K., et al., *Neutrophils in aging and aging-related pathologies*. Immunol Rev, 2023. **314**(1): p. 357-375.
210. Parmigiani, A., et al., *Impaired antibody response to influenza vaccine in HIV-infected and uninfected aging women is associated with immune activation and inflammation*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e79816.

211. Chatta, G.S., et al., *Hematopoietic progenitors and aging: alterations in granulocytic precursors and responsiveness to recombinant human G-CSF, GM-CSF, and IL-3*. J Gerontol, 1993. **48**(5): p. M207-12.
212. Chatta, G.S., T.H. Price, J.R. Stratton, and D.C. Dale, *Aging and marrow neutrophil reserves*. J Am Geriatr Soc, 1994. **42**(1): p. 77-81.
213. De Martinis, M., M. Modesti, and L. Ginaldi, *Phenotypic and functional changes of circulating monocytes and polymorphonuclear leucocytes from elderly persons*. Immunol Cell Biol, 2004. **82**(4): p. 415-20.
214. Fulop, T., Jr., et al., *Changes in apoptosis of human polymorphonuclear granulocytes with aging*. Mech Ageing Dev, 1997. **96**(1-3): p. 15-34.
215. Sapey, E., et al., *Phosphoinositide 3-kinase inhibition restores neutrophil accuracy in the elderly: toward targeted treatments for immunosenescence*. Blood, 2014. **123**(2): p. 239-48.
216. Sapey, E., et al., *Pulmonary Infections in the Elderly Lead to Impaired Neutrophil Targeting, Which Is Improved by Simvastatin*. Am J Respir Crit Care Med, 2017. **196**(10): p. 1325-1336.
217. Niwa, Y., T. Kasama, Y. Miyachi, and T. Kanoh, *Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging: cross-sectional and longitudinal studies*. Life Sci, 1989. **44**(22): p. 1655-64.
218. Butcher, S.K., et al., *Senescence in innate immune responses: reduced neutrophil phagocytic capacity and CD16 expression in elderly humans*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(6): p. 881-6.
219. Hazeldine, J., et al., *Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals*. Aging Cell, 2014. **13**(4): p. 690-8.
220. Ogawa, K., et al., *The association of elevated reactive oxygen species levels from neutrophils with low-grade inflammation in the elderly*. Immun Ageing, 2008. **5**: p. 13.
221. Uhl, B., et al., *Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response*. Blood, 2016. **128**(19): p. 2327-2337.
222. Liu, K., et al., *Increased Neutrophil Aging Contributes to T Cell Immune Suppression by PD-L1 and Arginase-1 in HIV-1 Treatment Naive Patients*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 670616.
223. Carrillo-Salinas, F.J., et al., *Short-Chain Fatty Acids Impair Neutrophil Antiviral Function in an Age-Dependent Manner*. Cells, 2022. **11**(16).
224. Heil, F., et al., *Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1526-9.
225. Tomezsko, P.J., et al., *Determination of RNA structural diversity and its role in HIV-1 RNA splicing*. Nature, 2020. **582**(7812): p. 438-442.
226. Tanji, H., et al., *Toll-like receptor 8 senses degradation products of single-stranded RNA*. Nat Struct Mol Biol, 2015. **22**(2): p. 109-15.
227. Zhang, Z., et al., *Structural Analyses of Toll-like Receptor 7 Reveal Detailed RNA Sequence Specificity and Recognition Mechanism of Agonistic Ligands*. Cell Rep, 2018. **25**(12): p. 3371-3381 e5.
228. Reno, T.A., et al., *The Youngbloods. Get Together. Hypercoagulation, Complement, and NET Formation in HIV/SIV Pathogenesis*. Frontiers in Virology, 2022. **1**.
229. Sivanandham, R., et al., *Neutrophil extracellular trap production contributes to pathogenesis in SIV-infected nonhuman primates*. J Clin Invest, 2018. **128**(11): p. 5178-5183.
230. Levinson, P., et al., *Levels of innate immune factors in genital fluids: association of alpha defensins and LL-37 with genital infections and increased HIV acquisition*. AIDS, 2009. **23**(3): p. 309-17.
231. Fan, S.R., X.P. Liu, and Q.P. Liao, *Human defensins and cytokines in vaginal lavage fluid of women with bacterial vaginosis*. Int J Gynaecol Obstet, 2008. **103**(1): p. 50-4.
232. Costa-Fujishima, M., et al., *Nonoptimal bacteria species induce neutrophil-driven inflammation and barrier disruption in the female genital tract*. Mucosal Immunol, 2023. **16**(3): p. 341-356.
233. Ramsuran, V., et al., *Duffy-null-associated low neutrophil counts influence HIV-1 susceptibility in high-risk South African black women*. Clin Infect Dis, 2011. **52**(10): p. 1248-56.

234. Kourtis, A.P., M.G. Hudgens, D. Kayira, and B.A.N.S. Team, *Neutrophil count in African mothers and newborns and HIV transmission risk*. N Engl J Med, 2012. **367**(23): p. 2260-2.
235. Ghosh, M., M. Rodriguez-Garcia, and C.R. Wira, *The immune system in menopause: pros and cons of hormone therapy*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2014. **142**: p. 171-5.
236. Rodriguez-Garcia, M., J.M. Fortier, F.D. Barr, and C.R. Wira, *Aging impacts CD103(+) CD8(+) T cell presence and induction by dendritic cells in the genital tract*. Aging Cell, 2018. **17**(3): p. e12733.
237. Rodriguez-Garcia, M., J.M. Fortier, F.D. Barr, and C.R. Wira, *Isolation of Dendritic Cells from the Human Female Reproductive Tract for Phenotypical and Functional Studies*. J Vis Exp, 2018(133).
238. Rodriguez-Garcia, M., Z. Shen, J.M. Fortier, and C.R. Wira, *Differential Cytotoxic Function of Resident and Non-resident CD8+ T Cells in the Human Female Reproductive Tract Before and After Menopause*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1096.
239. Forthal, D.N., et al., *IgG2 inhibits HIV-1 internalization by monocytes, and IgG subclass binding is affected by gp120 glycosylation*. AIDS, 2011. **25**(17): p. 2099-104.
240. Li, Y., et al., *Characterization of antibody responses elicited by human immunodeficiency virus type 1 primary isolate trimeric and monomeric envelope glycoproteins in selected adjuvants*. J Virol, 2006. **80**(3): p. 1414-26.
241. Rodriguez-Garcia, M., M.V. Patel, Z. Shen, and C.R. Wira, *The impact of aging on innate and adaptive immunity in the human female genital tract*. Aging Cell, 2021. **20**(5): p. e13361.
242. Vitzthum, V.J., *The ecology and evolutionary endocrinology of reproduction in the human female*. Am J Phys Anthropol, 2009. **140 Suppl 49**: p. 95-136.
243. Stricker, R., et al., *Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer*. Clin Chem Lab Med, 2006. **44**(7): p. 883-7.
244. Pauerstein, C.J., et al., *Temporal relationships of estrogen, progesterone, and luteinizing hormone levels to ovulation in women and infrahuman primates*. Am J Obstet Gynecol, 1978. **130**(8): p. 876-86.
245. Giraldo, D.M., J.C. Hernandez, and S. Urcuqui-Inchima, *HIV-1-derived single-stranded RNA acts as activator of human neutrophils*. Immunol Res, 2016. **64**(5-6): p. 1185-1194.
246. Zhang, S., et al., *Small-molecule inhibition of TLR8 through stabilization of its resting state*. Nat Chem Biol, 2018. **14**(1): p. 58-64.
247. Stunnenberg, M., et al., *Synthetic Abortive HIV-1 RNAs Induce Potent Antiviral Immunity*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 8.
248. Neeli, I., S.N. Khan, and M. Radic, *Histone deimination as a response to inflammatory stimuli in neutrophils*. J Immunol, 2008. **180**(3): p. 1895-902.
249. Biswas, P., et al., *Expression of CD4 on human peripheral blood neutrophils*. Blood, 2003. **101**(11): p. 4452-6.
250. Mosier, D.E., *Virus and target cell evolution in human immunodeficiency virus type 1 infection*. Immunol Res, 2000. **21**(2-3): p. 253-8.
251. Lai, W., et al., *The role of dynamin in HIV type 1 Env-mediated cell-cell fusion*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011. **27**(9): p. 1013-7.
252. Bracq, L., M. Xie, S. Benichou, and J. Bouchet, *Mechanisms for Cell-to-Cell Transmission of HIV-1*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 260.
253. Miyauchi, K., et al., *HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes*. Cell, 2009. **137**(3): p. 433-44.
254. Saitoh, S., et al., *Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(12): p. E2327-E2336.
255. Vidricaire, G. and M.J. Tremblay, *Rab5 and Rab7, but not ARF6, govern the early events of HIV-1 infection in polarized human placental cells*. J Immunol, 2005. **175**(10): p. 6517-30.
256. Park, S.Y. and I.S. Kim, *Engulfment signals and the phagocytic machinery for apoptotic cell clearance*. Exp Mol Med, 2017. **49**(5): p. e331.

257. Brinton, R.D., et al., *Perimenopause as a neurological transition state*. Nat Rev Endocrinol, 2015. **11**(7): p. 393-405.
258. Ng, M.H., LN., *Evidence of sex differences in cellular senescence*. Neurobiology of Aging, 2022. **120**: p. 88-104.
259. Yousefi, S., et al., *Cloning and expression analysis of a novel G-protein-coupled receptor selectively expressed on granulocytes*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 1045-52.
260. Panda, S., S. Behera, M.F. Alam, and G.H. Syed, *Endoplasmic reticulum & mitochondrial calcium homeostasis: The interplay with viruses*. Mitochondrion, 2021. **58**: p. 227-242.
261. Bournazou, I., et al., *Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin*. J Clin Invest, 2009. **119**(1): p. 20-32.
262. Kaplan, M.J. and M. Radic, *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2689-95.