

*UNIVERSIDAD DE BARCELONA*  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**FACTORES INMUNITARIOS PROTECTIVOS DEL  
HUÉSPED CONTRA LA INFECCIÓN POR EL VIH-1 Y  
LA PROGRESIÓN A SIDA:  
QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES.**

TESIS DOCTORAL

PRESENTA:

**CATALINA MARTÍNEZ IBARRA.**

Para optar por el grado de Doctor en Farmacia.

**BARCELONA, NOVIEMBRE DE 2001**

El **Dr. José María Gatell Artigas**, Profesor Titular de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, el **Dr. José M<sup>a</sup> Miró Meda**, Profesor Asociado de Medicina de la Universidad de Barcelona y el **Dra. Montserrat Plana Prades**, Doctora en Medicina por la Universidad de Barcelona.

**CERTIFICAN:**

Que la tesis titulada "**Factores protectivos inmunitarios del huésped contra la infección por el VIH-1 y la progresión a SIDA. Quimiocinas y sus receptores**", ha sido realizada por **Catalina Martínez Ibarra** y dirigida por los que suscriben, siendo apta para ser leída ante el Tribunal correspondiente, con la aspiración de obtener el grado de Doctor en Farmacia.

Lo que se hace constar a efectos oportunos, en Barcelona a 28 de Octubre de 2001

-----  
**Fdo: JM Gatell**

-----  
**Fdo: JM<sup>a</sup> Miró**

-----  
**Fdo: M. Plana**

## **DEDICATORIA**

**A MIS PADRES:**

**Dn Rufino Martínez Monroy.**

**†Dña Lucila Ibarra Cabrera.**

**A ELIZABETH Y ELVIS:**

**Quienes con su cariño y amistad han contribuido al logro de esta meta.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

## **A LAS INSTITUCIONES:**

Secretaría de Educación Pública. México.

Benémerita Universidad Autónoma de Puebla. México.

Universidad de Barcelona.

Faculta de Medicina, BUAP.

Facultad de Medicina, UB.

Al Hospital Clínic i Universitari de Barcelona.

Instituto Clínic de Infecciones e Inmunología.

Fundación Clínic para la Recerca Biomédica

Fundación Máximo Soriano Jiménez

**Al Dr.**

**J. M<sup>a</sup> Gatell Artigas.**

Jefe del Servicio de Enfermedades Infecciosas,  
Hospital Clínic i Universitari de Barcelona.

Por aceptar ser mi tutor académico.

**A los Drs.**

J. M<sup>a</sup> Miró Meda.

Consultor Servicio de Enfermedades Infecciosas,  
Hospital Clínic i Universitari de Barcelona.

y

Dra. Montserrat Plana Prades.

Doctor en Medicina por la UB.

Becario post-doctoral por la Fundació Clínic.

**Directores de esta tesis.**

**A la Dra.**

Teresa Gallart y Gallart.

Consultor del Servicio de Inmunología,  
Hospital Clínic i Universitari de Barcelona.

**Investigadora principal del proyecto FIS 99/0289.**

Al Dr. Jordi Vives Puiggròs.  
Jefe del Servicio de Inmunología,  
H. Clínic i Universitari de Barcelona.  
Sitio donde se ha llevado a cabo esta tesis.

A la Dra. Montserrat Plana Prades.  
Por su constante asesoramiento y fundamental colaboración.

Al Dr. Felipe García Alcaide.  
Por su calidad humana y profesional.

A los Drs. Álex Soriano y Juan Ignacio Aróstegui.  
Por sus comentarios, que han sido de gran valor.

A Lic. en estadística Dña Elisa De Lazzari.  
Por su apoyo en el análisis.

A Ma José Maleno, Mayte y Ana García.  
Por su amistad e imprescindible ayuda.

A Pepa Solé, Juanjo Barceló, Teresa Mejías y Alicia Capón.  
Por su apoyo logístico.

A las Sras. Ma. Antonia Rodríguez J., Flavia Invernizzi y Mercé Bayo.  
Por sus finas atenciones.

Y a todas las personas que de forma directa o indirecta han hecho posible este trabajo.



**A LOS INTEGRANTES DEL  
HONORABLE TRIBUNAL:**

# **ABREVIATURAS**

ADCC: Citotoxicidad dependiente de anticuerpos

ADVP: Adictos a drogas por vía parenteral.

ANITI: Análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa.

APC: Célula presentadora de antígeno.

CAF: *CD8+ T-cell antiviral factor* (Factor antiviral de células T CD8+).

CDC: *Centers of Diseases Control* (Centros de control de enfermedades).

CMV: Citomegalovirus.

CRS: Complejo relacionado a SIDA.

CTL: Linfocitos T citotóxicos.

CV: Carga viral.

DCs: Células dendríticas.

DNA: ácido desoxirribonucleico.

EBV: virus Epstein-Barr.

EIA: *Enzime immunoassay*.

ENI: Expuesto al VIH y no infectado.

ENI<sub>HM</sub>: Expuesto a hemoderivados contaminados con VIH y no infectado.

ENI<sub>sx</sub>: Expuesto vía sexual al VIH y no infectado.

ETS: Enfermedad de transmisión sexual.

FDA: *Food and Drug Administration*.

G-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas.

GM-CSF: Factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagos.

gp: Glicoproteína.

HAART: *highly active antiretroviral therapy*.

HLA: *Human leucocytes antigen* (antígeno de leucocitos humanos).

HLA-I: Antígeno de histocompatibilidad clase I.

HLA-II: Antígenos de histocompatibilidad clase II.

HTLV-III: *Human T-cell lymphotropic virus type III* .

ICAM-1: Molécula intracelular de adhesión-1.

IFI: *Indirect immunofluorescence*.

IFNs: Interferones.

Ig: Inmunoglobulina.

IL: Interleucinas.

IP: inhibidores de proteasas.

IPCs: Células productoras de interferon tipo 1.

IQR: *Interquartile range* (rango intercuartil).

LAV: *Lymphadenopathy-associated virus*.

LB: Linfocitos B.

LGP: Linfadenopatía generalizada persistente.

LIA: *Line immunoassay*.

LT: Linfocitos T.

LTNP: No progresor a largo plazo.

MAC: Complejo *Mycobacterium avium*.

MACS: *Multicenter AIDS cohorte study*.

MBLs: *Mannose-binding lectins* (lectinas unidas a manosa).

MHC: *Major complex histocompatibility* (Complejo principal de histocompatibilidad).

MHC-I: Moléculas clase I del MHC.

MHC-II: Moléculas clase II del MHC.

MIP-1 $\alpha$ : *Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* .

MIP-1 $\beta$ : *Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$* .

M-tropic: Macrofagotrópicas.

NK: natural killer.

NNITI: No nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa.

NP: Normo-progresor.

NSI: *Non syncytium-inducing* (no inductora de sincitios).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

ONUSIDA: Organización de las Naciones Unidas (SIDA).

OR: *Odds ratio*.

p: proteína.

PBMCs: *Peripheral blood mononuclear cells* (Células mononucleares de sangre periférica)

PCP: neumonía por *Pneumocystis carinii*

PCR: *polimerase chain reaction*

PHA: *Phytohemagglutinin* (fitohemaglutinina)

RANTES: *Regulated on activation, normal T expressed and secreted*.

RIPA: *Radioimmunoprecipitation assay*.

RNA: Ácido ribonucleico.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa mediante retrotranscripción previa de ARN a ADNc.

SDF-1: *Stromal-cell-derived factor-1*.

SI: *Syncytium-inducing* (inductoras de sincitios).

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

Tc: Célula T citotóxica.

TCR: Receptor de célula T.

Th: Célula T cooperadora.

Th1: linfocito T cooperador 1 (helper 1).

Th2: linfocito T cooperador 2 (helper 2).

TI: Transcriptasa inversa.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

T-tropic: Linfocitotrópicas.

USA: Estados Unidos de América.

VHB: Virus de la hepatitis B.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia adquirida.

VIS: Virus de la inmunodeficiencia del simio.

V3: Variable 3.

WB: *Western blot*..

## ÍNDICE



	Página
INDICE	1
1 INTRODUCCIÓN.	5
1.1 INFECCIÓN POR EL VIH/SIDA.	5
1.1.1 DEFINICIÓN.	5
1.1.2 EPIDEMIOLOGIA.	6
1.1.2.1 SITUACIÓN MUNDIAL.	7
1.1.2.2 SITUACIÓN ESPAÑA.	9
1.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y MOLECULARES DEL VIH.	13
1.2.1 RELACIONES EVOLUTIVAS DEL VIH.	13
1.2.2 ESTRUCTURA DE VIH.	13
1.2.3 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH.	17
1.2.4 CLASIFICACIÓN DEL VIH.	19
1.3 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.	21
1.4 CLASIFICACIÓN DE LA INFECCION POR EL VIH.	26
1.4.1 MARCADORES DE EVOLUCIÓN EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH.	30
1.5 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL VIH.	32
1.5.1 SEXUAL.	32
15.2 PARENTERAL.	33
1.5.3 VERTICAL.	34
1.6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VIH/SIDA	35
1.7 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIH/SIDA.	42
1.7.1 TRATAMIENTO DE LA PATOLOGÍA ASOCIADA.	42
1.7.2 TRATAMIENTO ANTI-RETROVIRAL.	44
1.7.3 OTRAS MEDIDAS TERAPÉUTICAS.	46
1.8 RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN VIH/SIDA.	48
1.8.1 SISTEMA INMUNE.	48
1.8.2 INMUNIDAD INNATA EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.	51
1.8.2.1 COMPONENTES SOLUBLES ANTI-VIH DE LA INMUNIDAD INNATA.	52
COMPLEMENTO.	
QUIMIOCINAS.	
CITOCINAS.	
INTERFERONES.	
1.8.2.2 COMPONENTES CELULARES ANTI-VIH DE LA	



INMUNIDAD INNATA.	54
CÉLULAS PRODUCTORAS DE INTERFERON TIPO 1.	
CÉLULAS NK.	
CÉLULAS CD8+ NO-CITOTÓXICAS.	
OTRAS CÉLULAS INMUNES.	
1.8.3 INMUNIDAD ADQUIRIDA EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.	60
1.8.3.1 COMPONENTES SOLUBLES ANTI-VIH DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA.	60
ANTICUERPOS.	
1.8.3.2 COMPONENTES CELULARES ANTI-VIH DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA.	63
CÉLULAS T.	
CÉLULAS T CD8+ CITOTÓXICAS.	
CÉLULAS T <i>HELPER</i> .	
1.9 ETIOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.	71
1.9.1 MECANISMOS NMUNOPATOGÉNICOS DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.	74
1.9.1.1 MECANISMOS DE DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4+.	75
EFECTO CITOPÁTICO DIRECTO.	
APOPTOSIS.	
LINFOCITOS CITOTÓXICOS ESPECÍFICOS AL VIH.	
CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO.	
MECANISMOS AUTOINMUNES.	
ANERGIA.	
DESEQUILIBRIO ENTRE DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T CD4+.	
1.10 RESISTENCIA A LA INFECCIÓN Y/O PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD POR EL VIH.	81
1.10.1 CÉLULAS T CD8+ CITOTÓXICAS.	84
1.10.2 CÉLULAS T CD8* NO-CITOTÓXICAS.	84
1.10.3 CÉLULAS T <i>HELPER</i> .	85
1.10.4 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.	85
1.10.5 FACTORES LOCALES.	85
1.10.6 REPERTORIO TCR.	86
1.10.7 MOLÉCULAS HLA.	88
1.10.8 INMUNIDAD INNATA.	92
1.11 QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES.	93
1.11.1 QUIMIOCINAS.	93
1.11.2 MECANISMOS DE INHIBICIÓN DEL VIH POR QUIMIOCINAS.	96
1.11.3 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.	97

1.11.3.1 CCR5.	100
1.11.3.2 CXCR4.	102
1.12 QUIMIOCINAS E INFECCIÓN VIH/SIDA.	106
1.13 VARIANTES GENÉTICAS EN LAS QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES.	110
1.13.1 ALELO CCR5- $\Delta$ 32.	111
1.13.1.1 HOMOCIGOCIA CCR5- $\Delta$ 32 Y RESISTENCIA AL VIH.	111
1.13.1.2 HETEOCIGOCIA CCR5- $\Delta$ 32 Y RESISTENCIA AL VIH.	112
1.13.1.3 HETEOCIGOCIA CCR5- $\Delta$ 32 Y PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD POR VIH.	113
1.13.2 ALELOS DEL PROMOTOR DE CCR5.	114
1.13.2.1 POLIMORFISMO CCR5 59029 G/A.	114
1.13.2.1 POLIMORFISMO CCR5-59356-T.	115
1.13.3 ALELO CCR2V64I.	115
1.13.4 ALELO SDF1-3'A.	116
1.13.4.1 HOMOCIGOCIA SDF1-3'A Y PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD POR VIH.	117
1.13.4.2 HETEROCIGOCIA SDF1-3'A Y RESISTENCIA A INFECCIÓN POR VIH.	117
2 HIPÓTESIS DE TRABAJO.	119
3 OBJETIVOS.	121
3.1 GENERAL.	
3.2 CONCRETOS.	
4 MATERIAL Y MÉTODOS.	123
4.1 PACIENTES.	123
4.2 MÉTODOS.	124
4.2.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE PLASMA DE SANGRE TOTAL.	124
4.2.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.	124
4.2.3. DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T.	125
4.2.4. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.	125
4.2.5. DETECCIÓN DE ALELO $\Delta$ 32 DEL GEN CCR5.	126
4.2.6 DETERMINACIÓN DE $\beta$ -QUIMIOCINAS EN PLASMA.	126
4.2.7 DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO SDF1-3'A.	127
4.2.8 DETERMINACIÓN DE SDF-1 EN PLASMA.	129
4.2.9 CUANTIFICACIÓN DE NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-16.	130

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	132
4.3.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.	
4.3.2 ESTADÍSTICA INFERENCIAL.	
5 RESULTADOS.	133
5.1 SUBPOBLACIONES CELULARES.	133
5.2 EXPRESIÓN DE LOS CO-RECEPTORES CCR5 Y CXCR4 EN CÉLULAS T.	145
5.3 POLIMORFISMO CCR5- $\Delta$ 32.	151
5.4 ALELO CCR5- $\Delta$ 32 Y EXPRESIÓN CCR5 EN CÉLULAS T.	155
5.5 NIVELES PLASMÁTICOS DE $\beta$ -QUIMIOCINAS.	164
5.6 GENOTIPOS SDF1-3'A.	171
5.7 NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1.	174
5.8 NIVELES DE SDF-1 Y GENOTIPOS SDF1-3'A.	176
5.9 NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-16.	178
5.10 RESUMEN DE RESULTADOS.	180
6. DISCUSIÓN.	185
7. CONCLUSIONES.	206
8. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.	208
9. BIBLIOGRAFÍA.	211

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1 INTRODUCCIÓN.

### 1.1 INFECCIÓN POR EL VIH/SIDA.

#### 1.1.1 DEFINICIÓN.

Infección por virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH).- Está caracterizada por un periodo asintomático prolongado de años o décadas, a la que sigue la enfermedad fatal, SIDA (Síndrome de inmunodeficiencia humana).

Aunque el SIDA primero fue identificado en hombres homosexuales en los Estados Unidos de América (USA), pronto fue observado en otros grupos, incluyendo adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), hemofílicos, receptores de transfusiones sanguíneas, heterosexuales y eventualmente en hijos de madres con la enfermedad; tales hallazgos sugieren que el SIDA es transmisible. Lo que comenzó con cinco casos reportados a los *Centers of Disease Control* (CDC) en 1981<sup>1</sup>, alcanzó proporciones inesperadas en pocos años.

El desarrollo de SIDA en hemofílicos que recibieron inyecciones de factor VII de plasma humano<sup>2</sup> comenzaron a apuntar hacia un agente viral; así un retrovirus nuevo fue identificado y asociado a SIDA por varios grupos independientes. Uno de ellos<sup>3</sup> aisló un virus asociado persistentemente a la linfadenopatía y lo llamaron LAV (lymphadenopathy-associated virus). En 1984 Popovic *et al*<sup>4</sup>, identificaron otro retrovirus al que llamaron HTLV-III (human T-cell lymphotropic virus type III). Este virus fue identificado de manera independiente por otro grupo<sup>5</sup>. Estudios subsecuentes demostraron que los tres virus aislados independientemente eran el mismo. Para evitar confusión un comité internacional, en 1986, llamó al virus, *virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)*; en el mismo

año se descubrió una variante y el virus original fue designado como VIH-1 (VIH) y la variante, VIH-2<sup>6</sup>; ambos son capaces de producir SIDA en seres humanos<sup>7</sup>. Los dos están genéticamente relacionados al virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV), el cual se encuentra en primates de África. El VIH-1 es más frecuente en África central, USA, Europa y Australia, y el VIH-2 se encuentra en África occidental y algunas partes de Europa. A nivel, molecular el VIH-2 se asemeja más al SIV. Cuando se compara con VIH-1, el VIH-2 tiene un mayor periodo de latencia clínica de la infección hasta que se desarrolla los síntomas.

El SIDA representa la expresión patológica final de la infección por el VIH; la destrucción del sistema inmunitario es la característica más importante del paciente infectado. Varias complicaciones caracterizan la infección por el VIH, incluyendo una grave alteración del estado general, “wasting”, daño neurológico, e infecciones oportunistas<sup>8</sup> y ciertos tipos de neoplasias; a partir de este momento se dice que el paciente tiene SIDA<sup>9,10</sup>. A partir de entonces el pronóstico, al menos en pacientes no tratados con anti-retrovirales, suele ser malo.

#### **1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA.**

Hace dos décadas, médicos de las ciudades Nueva York, San Francisco, y Los Ángeles, en Estados Unidos de Norteamérica, identificaron un nuevo síndrome de inmunodeficiencia entre varones jóvenes homosexuales. Inicialmente, la enfermedad fue llamada GRID (por, Gay-Related Immunodeficiency Syndrome). Sin embargo, pronto se vio que la enfermedad no estaba confinada a un sólo grupo de población, y tuvo diseminación silenciosa a través de otras poblaciones de alto riesgo, incluyendo ADVP; hemofílicos, receptores de transfusión de sangre;

heterosexuales de alto riesgo. Para fines de 1981, varios cientos de casos habían sido identificados, la enfermedad fue llamada SIDA y la investigación fue encaminada a la identificación de su causa. Tres años después se descubrió el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y las pruebas diagnósticas pronto estuvieron disponibles para identificar aquellos individuos infectados. En ese momento se tenía ya el agente causal, las pruebas diagnósticas para detectarlo y la vía de transmisión, con gran optimismo se pensó que la infección, pronto sería controlada; únicamente había que convertir esos conocimientos en acción para prevenir futuras expansiones de la enfermedad. Pronto nos dimos cuenta que nos enfrentamos a la peor pandemia del Siglo XX.

En la situación actual, los epidemiólogos no pueden predecir con certeza a qué velocidad se expandirá una epidemia determinada ni cuándo alcanzará su máximo, aunque sí pueden realizarse predicciones a corto plazo basadas en las tendencias del VIH y en la información sobre comportamientos de riesgo.

#### **1.1.2.1 SITUACIÓN MUNDIAL.**

A partir de datos disponibles la Organización de Naciones Unidas contra el SIDA (ONUSIDA) y la Organización Mundial para la Salud (OMS) estiman que, a finales del año 2000, el número de personas que viven con el VIH o con SIDA, es más de un 50% superior al que proyectó en 1991 el Programa Mundial sobre SIDA de la OMS. Para este mismo año, cerca de 60 millones de personas han sido identificadas como VIH+, de ellas se estima que 22 millones han muerto, 36 millones viven con VIH/SIDA y 5.3 millones se han infectado en año 2000 (TABLA 1 y FIGURA 1)<sup>7,11,12</sup>. La mayoría de ellos con menos de 25 años de edad y el 95% viviendo en

países en desarrollo<sup>7,13</sup>. Sólo en 1999, 3.0 millones de personas murieron a causa del SIDA, y en la década de los noventa 13 millones de niños quedaron huérfanos debido a la muerte prematura de sus padres; las estadísticas son crueles, pero el impacto sobre la humanidad es aún peor. Los más golpeados por la epidemia tienen edades entre 15 y 49 años, la etapa más productiva de su vida. En los países más afectados, el SIDA está afectando completamente las expectativas de vida de la población infectada; este impacto repercutirá en cada sector de la sociedad, de salud a agricultura, educación y el sector privado mermando las economías de las fuentes vitales y las contribuciones de una generación completa.

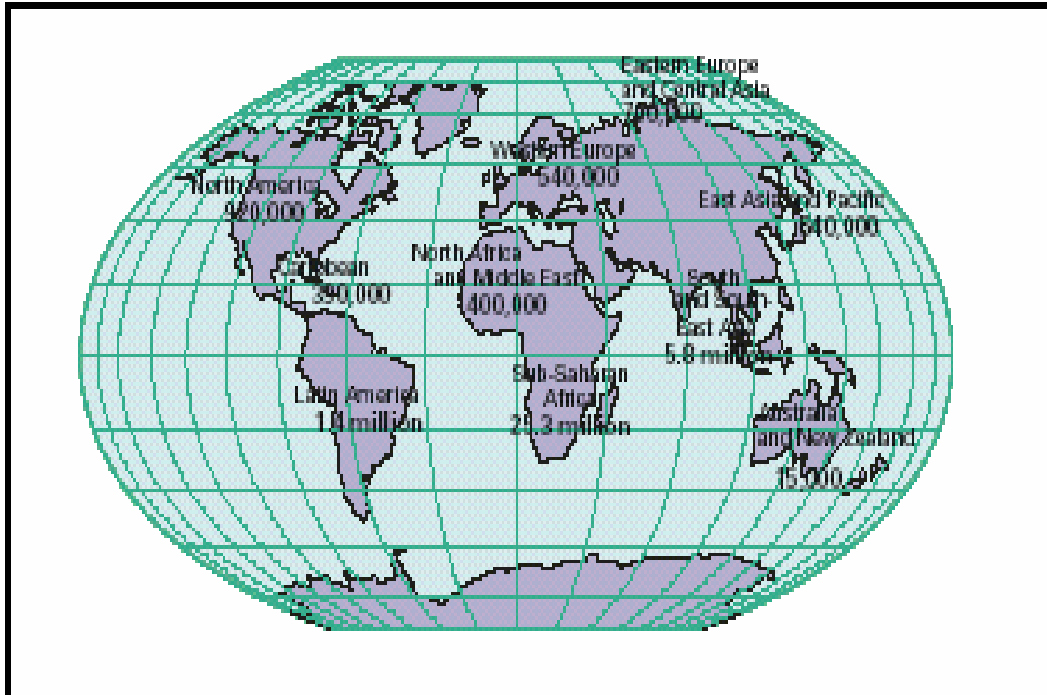
**TABLA 1. ESTIMACIÓN MUNDIAL DEL VIH/SIDA EN 2000. ADULTOS Y NIÑOS<sup>14</sup>.**

Personas que viven con VIH/SIDA	Adultos	34.7 millones
	Niños	1.4 millones
	Total	36.1 millones
Número acumulado de defunciones por causa del VIH/SIDA	Adultos	17.5 millones
	Niños	4.3 millones
	Total	21.8 millones
Nuevas infecciones por el VIH en 2000	Adultos	4.7 millones
	Niños	600 000
	Total	5.3 millones
VIH/SIDA en 2000 Defunciones por causa del	Adultos	2.5 millones
	Niños	500 000
	Total	3.0 millones

**Fuente: Report on the Global HIV/AIDS Epidemic, UNAIDS, WHO Working Group on Global HIV/AIDS and STD Surveillance, 2000.**



FIGURE 1. Number\* of adults and children estimated to be infected with HIV and AIDS — worldwide, 2000



\* n=36.1 million.

Source: Jointed United Nations Program on AIDS.

#### 1.1.2.2 SITUACIÓN EN ESPAÑA.

Durante el año 2000 se estima que se diagnosticaron en España 2 511 nuevos casos de SIDA, según datos corregidos por el retraso de notificación (TABLA 2)<sup>15</sup>.

El número de nuevos diagnósticos ha disminuido un 13% respecto al año anterior, continuando la tendencia iniciada en 1995 (TABLA 2) El número de casos nuevos de SIDA ha disminuido un 64% en los últimos cinco años debido al conjunto de los avances de la lucha contra el SIDA, tanto en la prevención como en la asistencia sanitaria, pero fundamentalmente es atribuible a los nuevos tratamientos anti-retrovirales.

La mayor caída se registró entre 1996 y 1997, mientras que en los últimos años el descenso se ha ido suavizando<sup>15</sup>.

El SIDA es una consecuencia tardía de la infección por el VIH, y por tanto, no refleja necesariamente la incidencia actual de nuevas infecciones. En cualquier caso, el descenso en la incidencia de SIDA es un dato positivo que indica una mejoría importante en el pronóstico y calidad de vida de las personas infectadas por el VIH<sup>15</sup>.

Desde 1981, año en el que comenzó la epidemia, se han acumulado un total de 59 466 casos de SIDA en España, pero en el 53,3% de ellos se ha notificado ya su fallecimiento. Hasta la fecha se ha recibido información de 1 744 casos diagnosticados en 2000, entre los cuales siguen predominando los hombres (77,9%). La edad media al diagnóstico de SIDA ha ascendido a 37,4 años. La proporción de casos pediátricos (menores de 13 años) ha seguido descendiendo y se sitúa a sólo el 0,5%. La vía de transmisión más frecuente ha sido el compartir material de inyección para la administración parenteral de drogas (56%), lo que se confirma tanto en hombres (59%) como en mujeres (48%). La transmisión por relaciones heterosexuales no protegidas asciende al 22%, pero adquiere especial relevancia en las mujeres, donde representa el 39% de los casos. La tercera vía de transmisión más frecuente ha sido las relaciones homosexuales no protegidas entre hombres, suponiendo el 11% de todos los casos y el 15% de los hombres<sup>15</sup>.

Los casos atribuidos a la transmisión heterosexual del VIH siguen aumentando en porcentaje respecto al total, y en 2000 han alcanzado el 22% de todos los casos nuevos diagnosticados. Además, esta categoría es

la única en la que en 2000 no ha disminuido el número de casos nuevos respecto a 1999. Aproximadamente una tercera parte de los casos de SIDA diagnosticados en 2000 no conocían su infección por VIH hasta que desarrollaron el SIDA, y este porcentaje supera el 50% entre los casos que adquirieron la infección por transmisión sexual. Esto demuestra la necesidad de mejorar el diagnóstico precoz de la infección por el VIH<sup>15</sup>.

**TABLA 2. CASOS DE SIDA EN ESPAÑA POR CATEGORÍAS DE TRANSMISIÓN Y AÑO DE DIAGNÓSTICO**

Datos corregidos por retraso de notificación. Situación a Diciembre de 2000.

	HOMO- BISEXUAL	ADVP	HEMODERIVADOS	TRANSFUSIÓN	MADRE- HIJO	HETEROSEXUAL	
AÑO	N	N	N	N	N	N	TOTAL
1981	1	0	0	0	0	0	1
1982	1	1	2	0	0	0	4
1983	4	5	4	2	0	0	15
1984	11	20	12	1	1	0	50
1985	37	108	18	1	6	2	174
1986	88	307	43	9	23	15	493
1987	209	706	47	19	32	45	1084
1988	340	1568	77	31	90	94	2254
1989	520	2151	84	31	88	182	3137
1990	585	2694	67	41	68	295	3885
1991	699	3032	76	44	85	377	4540
1992	789	3282	56	44	81	508	5031
1993	799	3535	55	3	84	635	5440
1994	907	4969	68	24	80	975	7323
1995	941	4608	56	22	80	1015	7014
1996	759	4223	49	16	48	1075	6470
1997	520	2970	22	14	37	841	4671
1998*	428	2079	10	5	19	694	3476
1999*	351	1654	9	9	16	551	2285
2000*	287	1403	4	5	12	559	2511

\*Estimaciones corregidas por retraso de que pueden sufrir modificaciones conforme se complete la notificación<sup>15</sup>.

## **1.2 CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS Y MOLECULARES DEL VIH.**

### **1.2.1 RELACIONES EVOLUTIVAS DE VIH.**

Los retrovirus pueden ser divididos en dos grupos: transformantes y citopáticos. Los primeros inducen cambios en el crecimiento celular y están asociados a cáncer. Los retrovirus citopáticos son miembros de la familia de lentivirus en donde están incluidos el VIH-1, VIH-2 y VIS. La propiedad fundamental de su replicación, a través de la transcripción inversa, de ahí su nombre, la comparten con otros virus animales y con algunos de plantas, así como con muchos elementos genéticos móviles celulares.

### **1.2.2 ESTRUCTURA DEL VIH.**

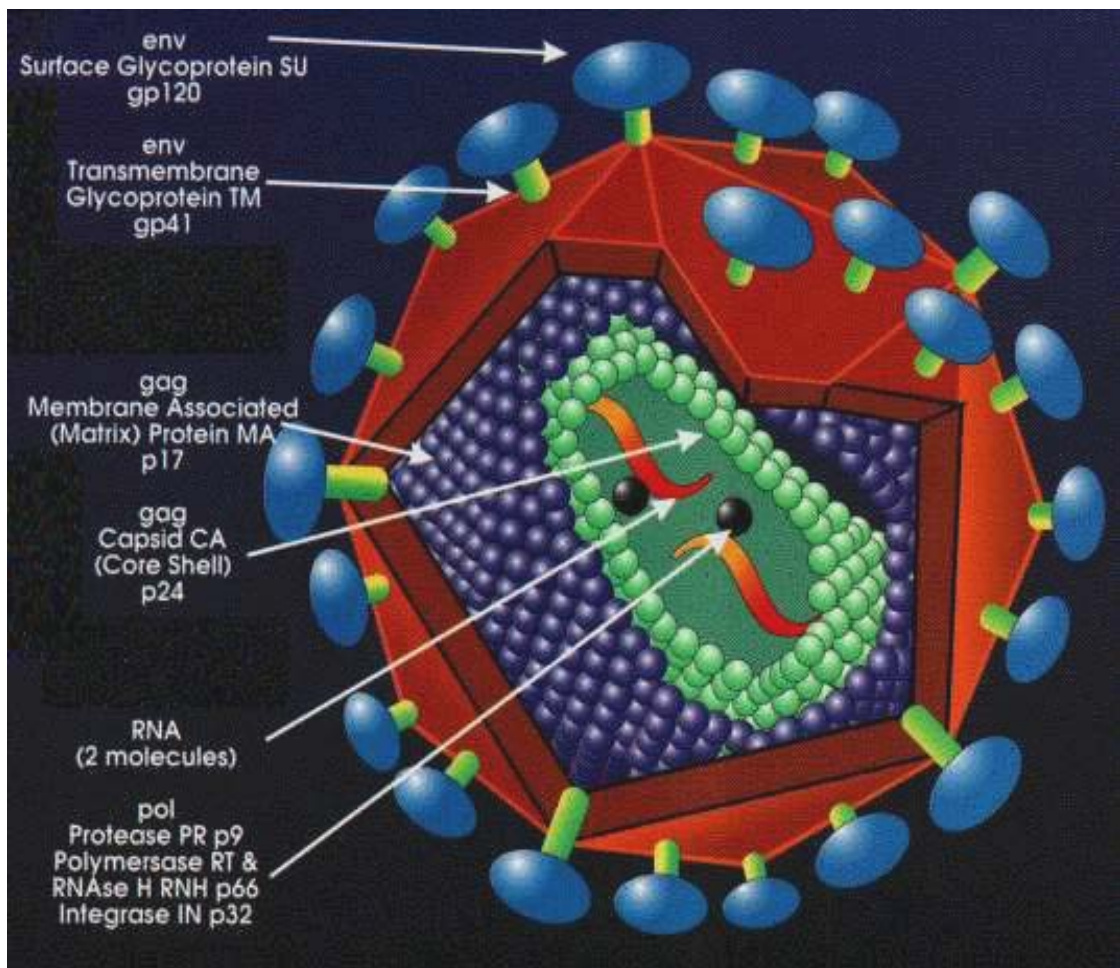
Todos los miembros de la familia lentivirus de los retrovirus comparte numerosas estructuras y características moleculares como es el hecho de poder integrar su material genético en el genoma de células no proliferantes como macrófagos o líneas celulares cuyo ciclo celular ha sido modificado<sup>16-18</sup> El VIH (FIGURA 2), está formado por una partícula esférica de 80 a 100 nm, con una estructura en tres capas; interna o nucleoide, que contiene RNA (ácido ribonucleico), la nucleoproteína y algunas enzimas necesarias para el ciclo vital<sup>6</sup>, una cápside icosaédrica y una envoltura derivada de la célula huésped donde se insertan las glicoproteínas (gp) y antígenos de histocompatibilidad clase I (HLA-I) y clase II (HLA-II). El genoma de este virus es una cadena única de RNA constituido por dos hebras idénticas de polaridad positiva y que contiene los genes estructurales y reguladores<sup>19</sup> y moléculas de TI, las cuales catalizan la transcripción inversa de RNA viral a DNA (ácido desoxirribonucleico) provirus que se integra en el genoma de la célula huésped. A partir de este provirus se transcriben los RNA mensajeros que codificarán las proteínas

correspondientes que, uniéndose al RNA genómico viral, constituyen la partícula que emerge por gemación a través de la membrana celular incorporando lípidos de ella y las glicoproteínas de envoltura, que a su vez incorporan azúcares derivados de la célula del huésped.

Las cadenas del genoma viral forman una proteína cilíndrica, *core*. En el VIH estas proteínas (p) *core* son llamadas p17 y p24: el *core* es una envoltura que el virus adquiere de la célula infectada del huésped por un proceso llamado *budding*. La membrana de las células del huésped se modifica por la inserción de dos glicoproteínas (gp) del VIH, gp120 y gp41. La gp41 expande la membrana; la gp120 se une a la gp41 pero extiende más allá la membrana. Tanto la gp120 como la gp41 tienen papeles importantes en la unión del VIH a la célula huésped en el proceso de infección<sup>20</sup>.

La característica más importante de estos virus es la riqueza de genes y proteínas reguladoras, que condicionarán la complejidad de la interacción virus célula y de ahí la patogenia de la enfermedad. Así como otros retrovirus poseen genes estructurales *gag*, *pol* y *env*, el VIH posee seis genes adicionales, reguladores y accesorios, en contraste con los HTLV que sólo poseen tres (TABLA 3).

**FIGURA 2. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA(VIH)**



**TABLA 3. GENES DEL VIH<sup>19</sup>.**

Gen	Proteínas	Funciones
Proteínas estructurales		
<i>gag</i>	p55. Precursora de p17 p24 p15. Precursora de p9 p6	Proteínas estructurales del <i>core</i> Proteína miristilada de la matriz Proteína de la cápside Proteína de la nucleocápside Proteína unida al ácido nucleico Ayuda a la maduración del virus
<i>pol</i>	p90. Precursora de p15 p13 p63, p55 p11 Integrasa	Enzimas Proteasa RNasa H Transcriptasa inversa Integración del DNAC viral
<i>env</i>	p160. Precursora de gp120 gp41	Proteínas de envoltura Proteína de envoltura (superficie) Proteína de envoltura (transmembrana)
Proteínas reguladoras		
<i>vpr</i>	p18	Acelerador del ciclo de replicación. Transporte nuclear
<i>vif</i>	p23	Proteína asociada a la infecciosidad del virión.
<i>tat</i>	p14	Activa la transcripción de todos los genes
<i>rev</i>	p19	Regulador de la expresión post-transcripcional de los genes <i>gag</i> y <i>env</i> Transporte selectivo de RNAm en el citoplasma.
<i>nef</i>	p27	Regulación negativa de CD4 y MHC-1. Parece inhibir la transcripción del VIH y retardar la transcripción viral
<i>vpu</i>	p15	Sólo en VIH. Aumenta la liberación de viriones de la célula infectada. Podría aumentar el título de virus presente en la persona infectada.

**MHC, major histocompatibility complex.**



### 1.2.3 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH.

La entrada del VIH a la célula diana involucra dos pasos: 1) el primer paso en la infección por el VIH es la unión de la glicoproteína (gp) 120 a los receptores de la célula diana. El principal receptor celular para el VIH es el CD4<sup>21,22</sup>. Debido a que las células T cooperadoras (Th, por T helper) expresan niveles elevados de CD4, se ha dicho que el VIH es linfocitotrópico<sup>23</sup>. Otras células que se unen al VIH incluyen macrófagos, monocitos, células dendríticas (DCs)<sup>24,25</sup>, células de Langerhans, células de la vagina y recto<sup>26</sup>. Entre las funciones de los macrófagos figuran procesamiento y presentación de antígenos extraños, síntesis de citocinas y factores de crecimiento necesarios para generar una respuesta inmune eficaz de células B y T, y el soporte de tipos celulares especializados como los del sistema nervioso central (SNC).

La importancia del CD4 en la unión al VIH pudo ser demostrada por transfección del gen que codifica CD4 en ciertas células en cultivo de tejido que carece de CD4; tales células previamente resistentes a la infección por el VIH, se hicieron susceptibles al VIH después que el gen CD4 fue transfectado en ellas<sup>27</sup>.

Aunque el CD4 es el receptor de alta afinidad para el VIH, varios estudios han demostrado que la presencia de CD4 no es suficiente para la célula diana sea infectada por el VIH. Por ejemplo, cuando el gen para el CD4 humano fue transfectado en células de ratón, éstas aún no pueden ser infectadas por el VIH aun cuando expresan CD4 en su membrana. Ésto permitió la especulación que algunas otras moléculas de membrana podrían participar en este proceso de entrada del VIH a la célula y 2), después de la unión del VIH a su receptor, la envoltura viral se fusiona con

la membrana plasmática de la célula diana<sup>20</sup>. La fusión parece estar inducida por una región hidrófoba.

Dentro del ciclo de replicación del VIH se pueden distinguir varias fases: adsorción, fusión e internalización del virión, transcripción inversa e integración, latencia, expresión temprana de genes reguladores, expresión tardía de genes estructurales y enzimáticos y morfogénesis y salida del virión<sup>19</sup>. La fase inicial el VIH comprende la interacción entre regiones definidas de la gp120 y epitopos específicos de la molécula CD4, primer receptor en identificarse<sup>21,22</sup> y los co-receptores de tipo CXCR4 y CXCR3<sup>28,29</sup>, que se encuentra en la membrana de la célula diana. La contribución de estos co-receptores al proceso de entrada del virus no es la fijación *per se*, de la envoltura del virus, que es la función de CD4. Una vez producida la interacción de gp160 en forma trimérica al CD4, se opera un cambio conformacional que permite la interacción de dos dominios del virus, la región variable 3 (V3) y una nueva región que permanecía enmascarada por V3 los co-receptores. Esta segunda interacción entre dominios ocultos de la envoltura y el co-receptor permite que se ponga en marcha el mecanismo que permite la fusión entre las membranas viral y celular y la entrada del *core* viral en la célula. Después de esto, el VIH penetra a la célula y se desenvuelve. Entonces la TI usa RNA viral como plantilla para fabricar una pequeña copia de DNA, formándose un híbrido RNA/DNA; el RNA se degrada; se sintetiza DNA y molécula de DNA lineal de doble cadena cambia su conformación y se hace circular. Parte de este DNA migra al núcleo y, subsecuentemente, se integra al DNA celular para formar el provirus de VIH por medio de la acción de la integrasa viral. La

replicación posterior de del VIH depende de los cambios dentro de la célula. El ciclo de replicación continúa con la traducción de RNA genómico viral. Dentro del citoplasma ocurre la etapa final de ensamble de proteínas virales y es seguida por gemación del virión maduro a través de la membrana celular, con adquisición simultánea de una envoltura.

#### 1.2.4 CLASIFICACIÓN DEL VIH.

El fenotipo de las cepas de HIV-1 está definido por las células en las cuales se replican *in vitro*, aunque éstos pueden cambiar *in vivo* con profundas implicaciones para la transmisión viral, patogenia y progresión de enfermedad.

Uno de los principales logros obtenidos a partir del descubrimiento de los co-receptores de VIH ha sido la comprensión de la base molecular del tropismo celular del virus y que ha permitido una nueva clasificación del VIH, basada en el uso de co-receptores. Hasta el presente tres clasificaciones estaban en uso. La primera define a las cepas primarias como a) macrofagotrópicas (M-tropic) y b) linfocitotrópicas (T-tropic), adaptadas a líneas celulares T. Sin embargo, este sistema disfraza el hecho que todas las cepas primarias replican en linfocitos T CD4+ activados. El segundo sistema categoriza las cepas como inductoras o no inductoras de sincitios (SI, syncytium-inducing ó NSI, non syncytium-inducing, respectivamente) con base de sí forman sincitios en células MT-2, las cuales expresan CXCR4 pero no CCR5<sup>30,31</sup>. Sin embargo, los virus NSI pueden fácilmente formar sincitios con células CCR5+. El tercer sistema define a los virus como lentos/bajos o rápidos/altos, dependiendo de la cinética de crecimiento en cultivos<sup>32</sup>. Estas clasificaciones se usan de una manera intercambiable, pero no son sinónimas; de tal forma que la

identificación del papel crucial de algunos receptores de quimiocinas en la entrada del VIH a las células diana, ha permitido el desarrollo de un sistema más preciso para identificar las propiedades fenotípicas de cepas virales. Un determinante principal del tropismo del VIH (fenotipo) está gobernado por la expresión de co-receptores conjuntamente con CD4; CCR5 y CXCR4 ó ambos.

El uso de CXCR4 es una característica de virus que forman sincitios en líneas celulares T, mientras que el uso de CCR5 es una propiedad de virus NSI, (M tropic)<sup>33-35</sup>. Así, una nomenclatura basada en el co-receptor usado proveería designación molecular precisa de una cepa dada que explica mejor su fenotipo. Se propone que las cepas que usan el CCR5 pero no CXCR4 se llamen variantes R5 y que las cepas que usan CXCR4 pero no CCR5 sean designadas X4 y aquellas que utilizan ambos son variantes multitrópicas o R5X4<sup>36</sup>. La variante viral R5 se aísla en el 90-95% de las infecciones primarias por el VIH<sup>37-40</sup>.

Los virus X4 son más citopáticos, *in vitro*, que las cepas R5, haciéndose la especulación que *in vivo* también podrían ser más virulentas y citopáticas para las células T CD4+<sup>41</sup>, ésto podría explicar el colapso tan rápido de la población de células T CD4+ que ocurre después que los virus X4 empiezan a predominar<sup>41,42</sup>.

Los mecanismos responsables de la emergencia de virus X4 durante la progresión de enfermedad se desconocen<sup>31,43</sup>. Es posible que el nivel de expresión de CXCR4 y CCR5 en células T CD4+ activadas pueda influir en el uso del co-receptor. Así, un fallo en el mecanismo de disminución de CXCR4 en células T activadas puede favorecer el uso de

este co-receptor por el VIH<sup>44</sup>. Las cepas duales podrían emerger como un estado transicional entre R5 y X4<sup>45</sup>. Se postula que una sola mutación puntual en el grupo N-terminal del *loop* extracelular-2 hace accesible CXCR4 a las variantes R5<sup>46,47</sup>.

### **1.3 HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.**

La historia natural de la infección por VIH incluye la infección aguda que va seguida de una fase asintomática de infección crónica, la cual finalmente desemboca en la fase de crisis SIDA<sup>48</sup>, que se inicia con el declive (por debajo de 500/ $\mu$ l), rápidamente progresivo de las células CD4+ circulantes<sup>49</sup>. Durante la fase inicial, conocida como primoinfección, caracterizada por una infección aguda de varias semanas de duración y en la cual el virus presente en el inóculo inicial replica en el huésped infectando las células que expresan CD4 y el co-receptor apropiado, usualmente el receptor de quimiocinas CCR5<sup>41</sup>; en el estado precoz de la infección por el VIH, los linfocitos T CD4+ parecen ser las principales células diana<sup>50</sup>. Pocas semanas después de la primera exposición se desarrolla una viremia acompañada, en algunos pacientes, de síntomas parecidos a una mononucleosis o una meningoencefalitis, los cuales se autolimitan en dos o tres semanas y posteriormente el paciente queda asintomático con o sin un síndrome linfadenopático durante varios años<sup>51-57</sup>. Esta latencia clínica<sup>58-60</sup> no se acompaña de una latencia virológica<sup>61-64</sup>, existiendo una gran interacción entre el VIH y el sistema inmunitario del paciente durante este período<sup>65,66</sup>. Algunos estudios sobre dinámica viral durante la infección primaria por el VIH y SIV, sugieren que la población

viral se duplica entre 6-10 horas en el estado inicial de la infección, con lo cual cada célula infectada da origen a 20 nuevas células infectadas. Durante la infección primaria sintomática, los niveles de virus infecciosos y de células infectadas en circulación son muy altos<sup>52</sup>. La concentración de partículas virales en la sangre es  $>10^6$ /ml y puede ser tan alta como  $10^8$ /ml. La infección sistémica inicial de los órganos linfoides periféricos con el VIH podría ocurrir como resultado de los altos niveles de viremia que se desarrolla durante la infección primaria<sup>67</sup>. A las pocas semanas, el nivel de virus en sangre disminuye; esta disminución coincide con el desarrollo de una respuesta inmune al VIH. De forma precoz aparecen linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos al virus y pueden representar un factor del huésped crucial en el control de la infección primaria del VIH<sup>68-71</sup>. Empleando como modelo el SIV se ha demostrado la importancia de los CTL CD8+ en el control de la viremia de la infección primaria; los monos depleccionados de células T CD8+ con anticuerpos monoclonales son incapaces de controlar la infección primaria<sup>70</sup>. Los efectos combinados de los CTL y de otros elementos de la respuesta inmune disminuyen la cantidad de virus en la sangre a un nivel más bajo que *set point*, definido éste como la estabilización de la carga viral (CV) después de la primoinfección; reflejando un balance tenue entre producción y destrucción de viriones; sin embargo, nunca se consigue una inmunidad protectora<sup>72</sup>.

La existencia de síntomas clínicos o no durante la primoinfección, y al salir de ésta, condiciona su posterior evolución<sup>72-75</sup>.

La segunda fase de la infección por el VIH o de latencia clínica, en general, de varios años de duración, es el gran periodo asintomático entre

la infección primaria y el desarrollo clínico de inmunodeficiencia (SIDA)<sup>55-57,67</sup>.

En la fase asintomática de la infección hay dos características fisiopatológicas relacionadas: replicación viral en tejidos linfoides periféricos y una pérdida gradual de células T CD4+. Aunque la fase asintomática puede representar un periodo de latencia clínica, el virus replica continuamente durante este tiempo; mediante métodos adecuados puede detectarse virus libre en circulación<sup>64</sup>, estos niveles son más bajos que los detectados en la fase sintomática de la infección o en pacientes con SIDA, en el estado final de la infección. Las células infectadas se detectan fácilmente en tejidos linfoides periféricos y, su número correlaciona directamente con niveles plasmáticos del virus, sugiriendo que el tejido linfoide es la principal fuente de virus en plasma<sup>62,63,76,77</sup>. Como los pacientes con *set point* de virus plasmáticos más alto progresan a SIDA más rápidamente, la disminución de las células CD4+ podría estar determinada por el nivel de replicación viral alcanzado<sup>78</sup>. Aun no están claros los mecanismos mediante los cuales se presenta la deplección de las células T CD4+ pero probablemente incluye una producción disminuida de células T por el timo y a un incremento en la tasa de destrucción de las células T en la periferia<sup>50,79</sup>.

La fase final de la infección por el VIH se caracteriza por inmunodeficiencia clínica con la presencia de enfermedades definitorias de SIDA. Un año o dos antes del desarrollo de SIDA, frecuentemente se presenta una disminución más rápida de las células T CD4+ precedida por

un incremento de la CV<sup>80</sup>, presentándose replicación viral en otros sitios aparte del tejido linfoide<sup>81</sup>.

Desde el comienzo de la epidemia de SIDA se ha logrado entender las complejidades del curso clínico de la enfermedad por el VIH. Además de la caracterización de las diferentes fases de la infección por el VIH, estudios prospectivos que involucran grandes cohortes de individuos infectados por el VIH han indicado claramente que la velocidad de progresión de la enfermedad por VIH puede ser substancialmente diferente entre individuos infectados por VIH (TABLA 4)<sup>58,60,73,82-87</sup>.



**TABLA 4. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES INFECTADOS POR VIH SEGÚN LA PROGRESIÓN<sup>85</sup>.**

---

<i>Progresores rápidos (5%-10%)</i>	
• <i>Definición</i>	- <i>Progresión a SIDA entre 1 y 5 años de la infección</i> - <i>Disminución rápida en los niveles de linfocitos CD4</i>
Características	- Bajos niveles de anticuerpos contra proteínas del VIH
• <i>Inmunológicas</i>	- Niveles bajos o ausencia de anticuerpos neutralizantes de las variantes autólogas del VIH - Disminución rápida de la respuesta CD8 no citolítica que suprime la replicación vírica. - Niveles muy altos de marcadores biológicos de progresión a SIDA.
• <i>Viroológicas</i>	- <i>Carga viral alta (&gt; de 10 000 copias de RNA/ml) que no cae de forma importante tras la infección primaria.</i>
<i>Normo-progresores (80-90%)</i>	
• <i>Definición</i>	- Progresión a partir de los 5 años con mediana de progresión a SIDA de 10 años - Disminución progresiva de los niveles de CD4
Características	- <i>Niveles altos de anticuerpos neutralizantes</i>
• <i>Inmunológicas</i>	- <i>Respuesta CD8 citotóxica importante tras la primoinfección, que posteriormente disminuye de forma progresiva.</i>
• <i>Viroológicas</i>	- Caída muy importante de la CV tras la primoinfección. - En la infección primaria las cepas son homogéneas. - Durante la fase clínica latente las cepas que se aíslan son NSI se replican lentamente. - Durante la fase de progresión a SIDA las cepas se replican más rápidamente.
<i>No progresores (5-10%)</i>	
• <i>Definición</i>	- <i>Pacientes asintomáticos infectados por el VIH con más de 10 años de seguimiento sin inmunosupresión celular (&gt;500 linfocitos CD4/mm<sup>3</sup>) y sin haber recibido tratamiento antirretroviral.</i>
Características	- Fuerte respuesta inmunológica humoral y celular (CD8 y TH1 > TH2).
• <i>inmunológicas</i>	- No predominio HLA clase I/II
• <i>Viroológicas</i>	- <i>Carga viral muy baja o negativa</i> - <i>VIH de fenotipo no inductor de sincitios (NSI)</i> - <i>Gen NEF intacto</i>

---

HLA.- Human leucocyte antigen

En ausencia de terapia anti-retroviral de alta eficacia (HAART, por *highly active antiretroviral therapy*), aproximadamente, el 10% de los pacientes infectados por el VIH tienen una progresión de enfermedad inusualmente rápida a SIDA en los dos o tres primeros años de la infección (PR, por progresores rápidos)<sup>86-88</sup>. Otro grupo de sujetos (5%-10%, con base en diferentes cohortes) que no experimentan enfermedad progresiva durante varios años (8 a 10) después de la infección primaria y a los que se llama no progresores a largo plazo (LTNP, *long-term nonprogressor*)<sup>58,73,82,84-87</sup>; definidos estrictamente como quienes, en ausencia de tratamiento permanecen asintomáticos y tienen cuentas de células T CD4 normales y CV baja o indetectable a pesar de periodos prolongados de infección con VIH y preservación del sistema inmune<sup>58,60,73,82-87,89</sup>, y aquellos que progresan a SIDA. La mayoría (70-80%) de los individuos infectados por el VIH pertenecen al grupo de normo-progresores típicos (NP). La progresión a enfermedad clínicamente aparente o a enfermedades definitorias de SIDA ocurre entre 8-10 años<sup>58-60,90-93</sup>. Cuando la cuenta de células T CD4+ está por debajo de 200 células /ml, el panorama clínico puede ser caracterizado por signos y síntomas persistentes y severos<sup>94</sup>.

#### **1.4 CLASIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.**

Hasta la fecha han habido tres clasificaciones de los CDC para los adultos con infección por el VIH, la de 1986<sup>21651</sup><sup>9,10</sup> y, la última en 1993<sup>95</sup> (TABLA 5). Cuyo objetivo fundamental de esta nueva clasificación y definición de SIDA fue reflejar la importancia clínica de un recuento de

linfocitos CD4+ inferior a  $200/\text{mm}^3$ . La categoría clínica A se aplica a la infección primaria y a pacientes asintomáticos con o sin linfadenopatías generalizadas persistentes (LGP). La categoría clínica B se aplica a pacientes que presenten o hayan presentado síntomas debidos a enfermedades no pertenecientes a la categoría C, pero relacionadas con la infección por VIH o cuyo tratamiento y cuidado puedan complicarse debido a la presencia de la infección por el VIH (TABLA 6). La categoría clínica C se aplica a pacientes que presenten o hayan presentado alguna de las complicaciones ya incluidas en la definición de SIDA de 1987<sup>96</sup>. Más otras 3 nuevas que se han añadido y han sido aceptadas también por la OMS para Europa. (TABLA 6). Los pacientes incluidos en las categorías C1, C2, C3, A3 y B3 se consideran afectados de SIDA. Las dos últimas categorías (A3 y B3) representan una ampliación respecto a la de 1987, basada exclusivamente en el recuento de linfocitos CD4 que, por el momento, no ha sido aceptada por la OMS para Europa. Si no se dispone del recuento de linfocitos CD4 en valor absoluto, puede utilizarse el porcentaje respecto a la cifra de linfocitos totales.

**TABLA 5. CLASIFICACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH Y CRITERIOS DE DEFINICIÓN DE SIDA PARA ADULTOS Y ADOLESCENTES (MAYORES DE 13 AÑOS).** Propuesta por los CDC. Entró en vigor en enero de 1993<sup>96</sup>.

Cifra de linfocitos T CD4+	Categorías clínicas		
	A	B	C (SIDA)
1. $\geq 500/\text{mm}^3$ ( $\geq 29\%$ )	A1	B1	C1
2. 200-499/ $\text{mm}^3$ (14-28%)	A2	B2	C2
3. $< 199/\text{mm}^3$ (SIDA) ( $< 14\%$ )	A3	B3	C3

**TABLA 6. SITUACIONES CLÍNICAS DIAGNÓSTICAS DE SIDA, CORRESPONDIENTES A LA CLASIFICACIÓN DE 1993, CUANDO EL PACIENTE TIENE UNA INFECCIÓN POR EL VIH BIEN DEMOSTRADA Y NO EXISTEN OTRAS CAUSAS DE INMUNODEFICIENCIA QUE PUEDAN EXPLICARLAS.** Contiene las 23 categorías aceptadas en las anteriores clasificaciones (1986 y 1987) más 3 nuevas (señaladas con asterisco)<sup>9,10,96</sup>.

---

1. Candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar.
  2. Candidiasis esofágica.
  3. Carcinoma de cérvix invasivo.\*
  4. Coccidioidomicosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares).
  5. Criptococosis extrapulmonar.
  6. Criptosporidiasis, con diarrea de más de un mes.
  7. Infección por citomegalovirus de un órgano diferente del hígado, bazo o ganglios linfáticos, en un paciente de más de un mes de edad.
  8. Retinitis por citomegalovirus.
  9. Encefalopatía por VIH.
  10. Infección por virus del herpes simple que cause una úlcera mucocutánea de más de un mes de evolución, o bronquitis, neumonitis o esofagitis de cualquier duración, que afecten a un paciente de más de un mes de edad.
  11. Histoplasmosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares).
  12. Isosporidiasis crónica (más de un mes).
  13. Sarcoma de Kaposi.
  14. Linfoma de Burkitt o equivalente.
  15. Linfoma inmunoblástico o equivalente.
  16. Linfoma cerebral primario.
  17. Infección por *M avium-intracellulare* o *M kansasii* diseminada o extrapulmonar.
  18. Tuberculosis pulmonar.\*
  19. Tuberculosis extrapulmonar o diseminada.
  20. Infección por otras micobacterias, diseminada o extrapulmonar.
  21. Neumonía por *Pneumocystis carinii*
  22. Neumonía recurrente.\*
  23. Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
  24. Sepsis recurrente por especies de *Salmonella* diferentes de *S. tify*.
  25. Toxoplasmosis cerebral en un paciente de más de un mes de edad.
  26. Wasting syndrome.
-

#### 1.4.1 MARCADORES DE EVOLUCIÓN EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH.

Los factores que influyen en la evolución a SIDA y las causas de por qué los progresores rápidos evolucionan a SIDA en menos de dos o tres años de la infección, mientras que en otros este proceso dura más de diez años no se conocen con exactitud<sup>97-99</sup>. Se han descrito diversos factores que pueden influir en esta evolución (TABLA 7); algunos dependen del huésped como la expresión genotípica y fenotípica de los co-receptores de entrada del VIH (CCR5 y CXCR4)<sup>100-104</sup>, el grado de respuesta citotóxica y proliferativa de los linfocitos CD4+ frente a antígenos del VIH<sup>105-107</sup>, el grado de activación inmunitaria<sup>108,109</sup> y los niveles circulantes de lectinas unidas a manosa (MBLs, por mannose-binding lectins). En varios estudios, los individuos con bajos niveles circulantes de MBLs tienen un riesgo superior de infección por VIH y una realizada progresión a enfermedad<sup>110,111</sup>.

En algunos casos la progresión de la enfermedad está asociada con la evolución de cepas virales (X4) más patógenas que utilizan el co-receptor CXCR4 en lugar de co-receptor CCR5 (cepas R5)<sup>31,112-114</sup>. Así, la infección precoz por el VIH está caracterizada por la presencia de cepas R5, mientras que las X4 tienden a emerger durante estados avanzados de la infección por el VIH<sup>115-117</sup>.

Varios reportes fuertemente sugieren que un virus atenuado puede disminuir la velocidad de progresión de enfermedad<sup>118-120</sup>. Infección progresiva muy lenta ha sido reportada en personas portadoras de cepas de VIH con una delección en el gen *nef*<sup>9,83,121-123</sup>. Así, portar un virus

atenuado puede retardar pero no prevenir la progresión a inmunosupresión<sup>124</sup>.

Como al caer la cuenta de células CD4 (< 200 células / $\mu$ l), aparecen infecciones oportunistas, el grado de disminución de las células T CD4+ es un excelente predictor de riesgo de una infección particular, provee un fuerte apoyo para la noción que la pérdida de células T CD4+ es la causa principal de inmunodeficiencia en esta enfermedad<sup>9,67,125</sup>.

Estudios realizados en la cohorte MACS (multicenter AIDS cohorte study), han demostrado con total claridad que el nivel de viremia plasmática es mejor marcador para predecir la progresión a SIDA y la supervivencia. Aunque el *set point* viral no es absoluto, se ha visto que está inversamente correlacionado con el tiempo de progresión de enfermedad<sup>72,126-129</sup>.

La cifra de linfocitos CD4+ tiene menor valor predictivo, quizás porque los cambios se producen con retraso respecto a los cambios en la viremia. Hay que destacar, sin embargo, que no existe un tope inferior, por debajo del cual no haya progresión, y que para cualquier nivel de linfocitos CD4 hay una gran dispersión de viremias.

En el caso particular de la primoinfección, existe una serie de datos, que si se identifican, hacen prever una evolución bastante rápida; como por ejemplo, la progresión es más rápida si la viremia, durante la primoinfección, alcanza cifras superiores a 100.000 copias/ml de plasma o sí, al estabilizarse tras la primoinfección, es mayor de 10.000 copias /ml.

## **TABLA 7. MARCADORES DE MALA EVOLUCIÓN DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA<sup>97,130,131</sup>.**

---

- Primoinfección sintomática, incluyendo erupción cutánea.
  - Linfocitos CD4 relativamente bajos que no se recuperan.
  - Detección de antígeno p24 y retraso en la aparición de anticuerpos anti-p24.
  - Retraso en la positivización de las pruebas de enzimoimmunoanálisis (ELISA) para anticuerpos.
  - Detección de cepas resistentes o formadoras de sincitios (SI) desde el principio.
  - Menos tropismo para los macrófagos.
  - Virus que escapan a la acción de los anticuerpos neutralizantes.
  - Viremia plasmática RNA superior a 100.000 copias /ml o superior a 10.000 copias/ml de forma persistente (más de una determinación).
- 

### **1.5 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN DEL VIH.**

#### **1.5.1 TRANSMISIÓN POR VÍA SEXUAL.**

Relaciones homosexuales en las que haya intercambio de secreciones. Como factores de riesgo asociados con esta vía de transmisión destacan el elevado número de contactos; la promiscuidad sexual; las relaciones anales activas y principalmente receptivas y la coexistencia de otras enfermedades de transmisión sexual (ETS)<sup>132,133</sup>. El riesgo es mayor en la penetración anal, con un riesgo de transmisión del 0.08 a 3.2%<sup>134</sup>, que en la vaginal; y a su vez mayor en ésta que en el sexo orogenital; aunque se ha comprobado que puede ser la vía de transmisión hasta en el 6.6% de los casos de pacientes primoinfectados<sup>135</sup>.

La transmisión heterosexual del VIH ocurre de modo muy heterogéneo. Las relaciones heterosexuales son las responsables de la mayoría de las transmisiones por vía sexual en el mundo<sup>11,12,136,137</sup>; del 6-



10% de los casos en USA y Europa y en el caso particular de África, es la principal vía de transmisión<sup>138</sup>.

La información disponible sugiere que la relación durante la menstruación y la presencia de úlceras genitales facilitan la transmisión del VIH en la relación heterosexual<sup>139-142</sup>. Por otra parte, algunas circunstancias ajenas a la propia relación sexual se asocian a una mayor transmisibilidad, como es un estadio más avanzado de la infección en la pareja seropositiva<sup>142-144</sup> un mayor número de relaciones sexuales con ella<sup>145</sup> y la CV<sup>142,144</sup>.

#### **1.5.2 TRANSMISIÓN POR VÍA PARENTEAL.**

Los mecanismos involucrados a esta vía son: drogadicción parenteral, transfusión de sangre y hemoderivados y, trasplante de órganos y tejidos<sup>143,146-148,149</sup>.

Los factores asociados con la transmisión por drogadicción parenteral son los siguientes: intercambio de jeringuilla; intercambio de otros objetos de uso personal entre ADVP; elevado tiempo de adicción y elevada frecuencia de consumo; clase social baja y ámbito penitenciario; contacto sexuales con otros drogadictos<sup>146</sup>.

El grupo de hemofílicos representa el 1% de los casos de SIDA en Estados Unidos y en torno al 3% de los casos en Europa. Entre los factores de riesgo asociados con este grupo destacan el empleo de factores de coagulación elaborados antes de detección sistemática de VIH o distribuidos sin desactivar el virus y la gravedad del trastorno de coagulación que implicaría mayor número de transfusiones<sup>143</sup>.

En el momento actual, el riesgo de transmisión del VIH a partir de sangre sometida a las técnicas habituales de *screening* en Estados Unidos

es de 1/450,000 a 1/600,000. En países subdesarrollados continúa siendo una forma de transmisión de gran importancia y se sitúa en torno al 10%. La seroconversión se produce en el 90% de los receptores de sangre infectada por el VIH<sup>150,149</sup>

Se asocian a esta forma de transmisión factores como: transfusiones realizadas entre 1978 y 1985; existencia de un elevado número de transfusiones, inadecuada selección de donantes y la posibilidad de transfusión de sangre testada durante el periodo ventana.

También se ha descrito la transmisión del VIH a partir de trasplante renal<sup>151</sup>, hepático, cardíaco, pancreático y óseo<sup>152</sup>.

### **1.5.3 TRANSMISIÓN VERTICAL**

La tasa de transmisión materno-infantil oscila entre 14 y 35%. Con la introducción a partir de 1994 de la Zidovudina (AZT) como profilaxis de transmisión vertical se ha reducido a 3.7-8%<sup>153-158</sup>.

Son tres los momentos en que puede presentar la transmisión del VIH de manera vertical:

**Prenatal:** La infección durante la gestación tiene lugar por el paso del VIH materno a través de la placenta a partir de la octava semana<sup>158-161</sup>.

**Perinatal:** Durante el parto el recién nacido puede infectarse por exposición directa de sus mucosas al VIH o por vía ascendente; la infección puede verse favorecida por las contracciones uterinas<sup>160</sup>. El 65% de las infecciones ocurren durante el parto, aumentando esta proporción cuando se trata de partos prematuros<sup>162</sup>.

**Posnatal:** El factor involucrado en esta forma de transmisión del VIH es la lactancia materna y el riesgo de infección por esta vía aumenta con el tiempo de amamantamiento<sup>163,164</sup>, con la lactancia mixta y en caso de

mastitis. De tal forma que el riesgo añadido de adquirir la infección por VIH en los niños amamantados al pecho es del 14%, en las madres infectadas prenatalmente, y del 26% en caso de que la infección de la madre ocurriera inmediatamente después del parto y coincide con niveles elevados de viremia<sup>163,165-172</sup>.

Entre los factores asociados con la transmisión vertical destacan los maternos: madres sintomáticas durante la gestación con relaciones sexuales no protegidas e infecciones en el tracto genital; la ruptura prematura de membranas amnióticas; el sangrado vaginal y las expulsiones prolongadas<sup>173-175</sup>. Varios estudios han demostrado que la CV de las gestantes es un factor predictivo de la transmisión vertical. Así, las madres con CV elevada corren mayor riesgo de transmitir la infección al producto<sup>176</sup>; mientras que las viremias bajas o indetectables se asocian con un riesgo muy bajo de transmisión<sup>177-179</sup>, aún cuando se ha reportado casos de transmisión materno-infantil en madres con CV indetectable<sup>158</sup>.

## **1.6 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR VIH.**

Sólo a través de métodos de laboratorio puede establecerse, de modo definitivo, el diagnóstico de la infección por el VIH ya que las manifestaciones clínicas, aunque sugestivas, no son específicas en ningún estadio de la enfermedad.

Pruebas serológicas.- La identificación de sujetos infectados por VIH se hace a través de la investigación de anticuerpos en suero<sup>180-182</sup>. Sin embargo, la presencia de anticuerpos anti-VIH, lejos de reflejar una

exposición y erradicación inmune del virus en el pasado, significa el estado de portador actual.

El diseño de algunas pruebas de laboratorio permite realizar un gran número de análisis a la vez; a éstas se les conoce como de *screening*. Otras son de realización más compleja y se utilizan para la confirmación de la reactividad de la prueba inicial de *screening*, las cuales proporcionan mayor especificidad. TABLA 8.

La seropositividad se define por la demostración de anticuerpos frente a las proteínas víricas, con reactividad repetida en las pruebas de *screening* y, además, con alguna de las pruebas de confirmación<sup>180-182</sup>.

El análisis inmunoenzimático (EIA) es el método más utilizado como prueba de *screening*<sup>180,181</sup>. Los antígenos provienen del lisado viral de un cultivo (EIA de 1ª generación), o bien corresponden a proteínas recombinantes o péptidos sintéticos (EIA de 2ª generación), que reproducen epitopos del virus. Los EIA de 2ª generación son más sensibles y, sobre todo, más específicos que los de 1ª generación. Estos pueden presentar falso positivos, especialmente en pacientes con enfermedades autoinmunes o con determinados fenotipos HLA<sup>180,181</sup>. En general, los EIA indirectos son más sensibles y los EIA competitivos más específicos<sup>180,181</sup>.

El *Western blot* (WB) es la metodología más empleada para la confirmación de resultados obtenidos con pruebas de *screening*. De modo ventajoso permite discriminar frente a qué antígenos víricos se dirigen los anticuerpos presentes en la muestra problema. Otras metodologías de confirmación, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o el análisis por radioinmunoprecipitación (RIPA) presentan una alta subjetividad y

complejidad, respectivamente, que dificultan su utilización rutinaria como pruebas de confirmación<sup>180,181</sup>.

**TABLA 8. PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIH.**

---

**Pruebas de *screening*:**

EIA

Indirecto

Competitivo

Tipo sándwich

De captura

Prueba de aglutinación

Método de adherencia (por ejemplo, GACPAT, Wellcome)

Análisis por *dot-blot* (por ejemplo, HIVCHEK, Ortho)

Otros (por ejemplo, IMX, Abbott)

**Pruebas de confirmación**

Western blot

IFI

RIPA

LIA y variantes (por ejemplo, RIBA, Ortho; PEPTI-LAV,

Pasteur; Matrix, Abbott; INNOLIA Boehringer).

---

En 1987 la *Food and Drug Administration* (FDA) propuso unos criterios de positividad del WB muy restrictivos: sólo debían considerarse positivas las muestras con bandas frente al menos una proteína de cada uno de los tres genes estructurales. La especificidad de los criterios de la FDA es muy elevada, aunque su escasa sensibilidad proporciona un

inaceptable número de resultados indeterminados<sup>181</sup>. Por ejemplo, muchos pacientes con SIDA presentan una pérdida de anti-p24 que impide su correcta identificación serológica. En 1989 los CDC revisaron los criterios de positividad del WB que definieron por la presencia de al menos dos de las tres bandas correspondientes a los genes estructurales que codifican las proteínas p24, gp41 y gp120/gp160. Estos criterios ofrecen una mayor sensibilidad, conservándose la especificidad. En una nueva reunión de expertos de la OMS en abril de 1990 se redactó una nueva nomenclatura de las bandas del WB (TABLA 9), y una nueva interpretación de los resultados<sup>183</sup>.

Los criterios de la OMS para la interpretación del WB parecen ser más específicos que otros. La OMS<sup>183</sup> ha hecho las siguientes recomendaciones para tres situaciones especiales: a) Presencia aislada de la banda de la matriz nuclear p17. Esta reactividad puede considerarse como negativa y no es necesario un seguimiento posterior; b) Una banda de la envoltura con o sin otra(s). Este patrón es infrecuente y puede observarse durante la seroconversión, en la infección por VIH-2 (si se utiliza el WB para VIH-1) o viceversa. Es necesario repetir el WB sobre la misma muestra. Si persiste el mismo patrón, debe esperarse dos semanas y repetir el WB en una nueva muestra de ese momento; c) Otros patrones (*gag* y/o *pol* sin *env*). Pueden sugerir una seroconversión; una infección por VIH-2 (si se utiliza el WB para VIH-1) o viceversa; o reactividad inespecífica. Deben repetirse análisis periódicos durante al menos 6 meses. Si por entonces el WB continúa siendo indeterminado y el paciente niega factores de riesgo y está asintomático, puede considerarse negativo.

**TABLA 9. NOMENCLATURA DE LAS BANDAS DEL WESTERN BLOT.**

---

Gen	Proteína	Denominación
<i>env</i>	Precursora de la envoltura*	gp160
	Glucoproteína externa	gp120
	Glucoproteína transmembrana	gp41
<i>gag</i>	Precursora del <i>core</i>	p55
	Precursora del <i>core</i>	p40
	Proteína principal	p24
	Proteína de la matriz	p17
<i>pol</i>	Transcriptasa-inversa	p66
	Transcriptasa-inversa	p51
	Endonucleasa	p31

---

\* En algunos lotes de WB no están suficientemente diferenciadas las proteínas de alto peso molecular (gp120 y gp160), de modo que la reactividad frente a dos bandas de la envoltura requerirá la presencia de anti-gp41. En resumen, la positividad por WB para VIH requiere la presencia de al menos dos bandas de la envoltura; la negatividad resulta de la ausencia de bandas y el resto de patrones se consideran indeterminados.

Hasta ahora, el WB ha sido la metodología más utilizada para la confirmación de la reactividad de las pruebas de *screening*, los inconvenientes de la técnica están desplazando su uso. Recientemente se han diseñado unos sistemas informatizados de semicuantificación de las bandas del WB que persiguen objetivar la reactividad de las muestras y la interpretación final del patrón del WB.

Aunque las pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH son indicadores muy sensibles de la infección por el VIH, no aportan la evidencia directa de su presencia. Desde 1986 se dispone de pruebas de

EIA para el reconocimiento de antígenos, básicamente p24, del VIH en plasma, suero y líquido cefalorraquídeo (LCR). La proteína puede reconocerse durante la primo infección por el VIH (tanto por VIH-1 como por VIH-2) en ausencia de otros marcadores serológicos<sup>181,182,184,185</sup>. Sin embargo, la utilización de péptidos sintéticos puede ser la causa de falsos negativos en la infección aguda y en la pediátrica<sup>186</sup>.

En la mayoría de los casos las pruebas serológicas son suficientes para establecer el diagnóstico de la infección; sin embargo, presentan el inconveniente de depender no sólo de la capacidad de respuesta del sistema inmune<sup>187-190</sup>, sino también de la variabilidad antigénica del virus; lo cual puede inducir anticuerpos de diferente especificidad, no reconocibles por los métodos de detección en la mayoría de los laboratorios. Dada las características biológicas del VIH, la mejor herramienta diagnóstica para reconocer a los sujetos infectados deberían ser pruebas directas que investigan la presencia del genoma vírico. Sin embargo, las técnicas de hibridación directa (*dot blot* e hibridación *in situ*), tan útiles en el virus de la hepatitis B (VHB), han resultado infructuosas en la infección por VIH<sup>191</sup>, probablemente porque el número de linfocitos circulantes portadores del genoma vírico en cada paciente es muy reducido: menos del 0.01% en los sujetos asintomáticos<sup>192,193</sup> y menos del 1% en los individuos en estadios finales de la infección<sup>193,194</sup>. Esto se pudo resolver mediante técnicas basadas en la amplificación enzimática selectiva y que han revolucionado la biología molecular en los últimos años<sup>195,196</sup>.



Mediante la denominada reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por *polimerase chain reaction*), se han podido detectar fragmentos del genoma del VIH en pacientes con SIDA, en individuos infectados asintomáticos y en sujetos de colectivos de alto riesgo expuestos recientemente al virus y que aún no habían desarrollado una respuesta inmune<sup>197</sup>. La detección de material genético se puede llevar a cabo sobre dos tipos de moléculas: DNA y RNA. Debido a sus respectivas características funcionales, cada una de ellas nos ofrecerá distintos tipos de información, Así, mediante PCR se han estudiado secuencias genómicas de DNA del VIH extraído de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por *peripheral blood mononuclear cell*) de los pacientes; se trata del DNA provírico presente en los linfocitos T infectados que, mayoritariamente, constituyen las células diana del virus<sup>192,198</sup>. La PCR también nos permite cuantificar el número de copias de DNA del VIH, parámetro denominado carga proviral.

La detección de secuencia de RNA del VIH se realiza mediante una metodología similar, pero antes de la amplificación debemos convertir el RNA en DNA de cadena doble mediante la reacción enzimática con la retrotranscriptasa (RT). La detección de secuencias de RNA del VIH mediante PCR refleja el grado de replicación vírica y permite realizar la evaluación funcional de las células infectadas<sup>192,197,199</sup>, pudiéndose cuantificar el número de linfocitos que producen activamente viriones (infección activa) respecto a los que permanecen con una infección latente<sup>192,194,200</sup>.

Una de las técnicas más específicas para el diagnóstico de la infección por retrovirus es el aislamiento vírico. Su mayor aplicación se produce en estudios de variabilidad genética, epidemiología molecular<sup>201,202</sup>, sensibilidad a antivíricos<sup>192,203,204</sup>, cinéticas de replicación, fenotipo<sup>205-208</sup>, tropismo celular<sup>209</sup>, y uso de co-receptores<sup>43,210,211</sup>. En el caso particular del VIH-1, el cultivo vírico es útil en el diagnóstico de la infección pediátrica<sup>212-215</sup>.

El VIH ha sido aislado a partir de tejidos linfoides, plasma, saliva, semen, lágrimas, tejido cerebral, LCR, leche materna y orina<sup>43,209-212</sup>. Sin embargo, el virus es aislado más fácilmente de PBMC.

**1.7 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIH/SIDA.** El tratamiento del paciente infectado por el VIH comprende los siguientes aspectos: a) tratamiento de la patología asociada, b) tratamiento anti-retroviral, y c) otras medidas terapéuticas.

#### **1.7.1 TRATAMIENTO DE LA PATOLOGÍA ASOCIADA.**

El tratamiento y, sobre todo, la profilaxis de las infecciones oportunistas tiene una especial significación para la supervivencia y calidad de vida de estos pacientes. No debemos olvidar que más del 90% de ellos fallecen a consecuencia de infecciones oportunistas, y un número mucho menor por las neoplasias asociadas. El progresivo deterioro inmune causado por el VIH da lugar a que un numeroso grupo de microorganismos pueda producir enfermedades más frecuentemente y con mayor gravedad. Las infecciones más graves aparecen cuando el individuo alcanza un nivel de linfocitos CD4+ < 200 células / mm<sup>3</sup>. La profilaxis de las infecciones más graves que afectan a estos sujetos ha reducido su prevalencia, prolongando su

supervivencia y mejorando su calidad de vida. Sin embargo, la profilaxis y tratamiento de estas infecciones se ve limitada por dos circunstancias: toxicidad e interacciones farmacológicas<sup>212,216,217</sup>. La profilaxis de las infecciones oportunistas comprende la prevención del primer episodio (profilaxis primaria), de las recurrencias (profilaxis secundaria), y la no-exposición del paciente a nuevos patógenos. La profilaxis primaria se estableció a partir de 1989, cuando se demostró que era posible disminuir la incidencia de la neumonía por *Pneumocystis carinii* (PCP) en pacientes con cifras de linfocitos CD4+ < 200 células / mm<sup>3</sup>, mediante la administración de cotrimoxazol o pentaminida<sup>212,218</sup>. Desde entonces otras muchas infecciones se han beneficiado de esta misma actitud<sup>219,220</sup>.

La mayoría de infecciones oportunistas recurren cuando el tratamiento para un episodio agudo es interrumpido. Sin embargo, el tratamiento puede mantenerse de por vida como profilaxis secundaria. Esto es particularmente cierto en el caso de infecciones oportunistas como la neumonía por PCP, encefalitis toxoplásmica, retinitis por citomegalovirus (CMV), criptococosis e infección por complejo *Mycobacterium avium* (MAC)<sup>221-224</sup>.

La prevención de la exposición a nuevos patógenos es importante, sobre todo en el caso de algunas infecciones que no tienen un tratamiento eficaz, y en las cuales es difícil realizar la profilaxis con medicamentos.

Los principales factores que deben considerarse para decidir frente a qué infecciones se debe realizar profilaxis primaria, secundaria o ambas son el nivel de inmunosupresión del paciente, la incidencia de la infección

en el área de residencia, la eficacia del fármaco y su influencia en la calidad de vida del paciente<sup>219,220</sup>.

#### **1.7.2 TRATAMIENTO ANTI-RETROVIRAL.**

Desde el inicio de la terapia anti-retroviral en 1986, el manejo de estos fármacos se ha hecho con criterios clínicos e inmunológicos; sin embargo, durante los últimos años, los criterios virológicos han venido a ocupar un lugar trascendente en las decisiones terapéuticas. Ello ha sido debido a un mejor entendimiento de la dinámica de replicación del VIH y a la introducción de técnicas que facilitan la cuantificación de viremia plasmática y el conocimiento de la resistencia de diferentes aislados del VIH a los fármacos antirretrovirales.

El ciclo de replicación del VIH puede ser dividido en dos fases distintas, en relación con la integración del DNA provírico en el genoma de la célula diana, el linfocito T CD4+. En la fase de preintegración existen dos objetivos de la terapia anti-retroviral, el primero al nivel de la unión de la gp120 al receptor CD4 de la membrana celular; y el segundo, inhibiendo la TI del virus, enzima que cataliza la conversión de RNA vírico en DNA vírico complementario (cDNA) el cual, posteriormente pasa al núcleo celular, donde queda incorporado como provirus. En la segunda fase de ciclo vital del VIH, también denominada replicativa o posintegración, el DNA provírico se transcribe en mRNA, que es transportado al citoplasma celular, donde se produce la síntesis de las proteínas víricas precursoras, que son posteriormente fragmentadas, por acción de proteasas, en las proteínas definitivas del virus. El correcto ensamblaje de éstas y, finalmente, la liberación de viriones, aprovechando parte de la membrana celular, pone fin al ciclo replicativo.

Los fármacos anti-retrovirales pueden actuar a diferentes niveles de esta secuencia de acontecimientos TABLA 10. Inhiben la proteasa o la TI del VIH y reciben la denominación de inhibidores de la proteasa (IP) o inhibidores de la TI análogos o no análogos de los nucleósidos, según su estructura química.

La comercialización de los IP, que coincidió con un cambio en la estrategia terapéutica (utilización de combinaciones potentes casi siempre de tres medicamentos o más) y con la posibilidad de monitorizar la respuesta terapéutica mediante la medición de la CV plasmática<sup>225</sup>, representó una verdadera revolución en el tratamiento anti-retroviral que condujo a una reducción muy importante de las complicaciones clínicas (infecciones oportunistas y neoplasias) asociadas con el SIDA<sup>219,220,226,227</sup> y a un aumento espectacular de la supervivencia<sup>228</sup>. El reverso de la moneda lo representa el hecho de que, con los medicamentos actualmente disponibles y las estrategias terapéuticas que se están utilizando<sup>219,229,230</sup>, la posibilidad de erradicar el VIH parece descartada, incluso tras más de 10 años de tratamiento aparentemente eficaz<sup>231-234</sup>.

El principio fundamental del tratamiento anti-retroviral actual puede enunciarse como sigue: suprimir la replicación del VIH lo antes posible y durante el mayor tiempo posible<sup>226</sup>, con la finalidad de permitir que el sistema inmunitario, de forma espontánea, no tan sólo no continúe deteriorándose, sino que se recupere; ello incluye la capacidad de respuesta frente a antígenos con que ya se había estado en contacto, pero que en apariencia se había perdido<sup>233,235-243</sup>.

Así, está demostrado que la HAART, sola no es capaz de erradicar el virus; entonces es necesario diseñar estrategias alternativas con el propósito de modular el sistema inmune que permitan controlar el VIH, entre estas posibilidades se pueden englobar la hidroxiurea<sup>244-249</sup>; las vacunas terapéuticas<sup>250</sup>; la interleucina (IL)-2<sup>251</sup>; las autovacunas mediante las interrupciones estructuradas de tratamiento<sup>252,253</sup>, o la Ciclosporina A<sup>254</sup>.

### **1.7.3 OTRAS MEDIDAS TERAPÉUTICAS.**

Debemos hacer una especial mención a los aspectos nutricionales, los cuidados paliativos y el apoyo psicológico que permitirán al paciente con infección por VIH/SIDA mejorar su calidad de vida<sup>255</sup>.

**TABLA 10. SITIOS DE ACCIÓN DE LOS PRINCIPALES AGENTES ANTI-RETROVIRALES.**

Penetración	Citoplasma Transcriptasa inversa	Núcleo Integración (provirus) Transcripción	Citoplasma Traducción	Citoplasma Ensamblaje
Polisacáridos Sulfatados AL-721 CD4sr	<b>Análogos de nucleósidos</b> Zidovudina Didanosina Zalcitabina Estavudina Lamivudina Abacavir <b>Análogos de nucleótidos</b> Adefovir  <b>ITINN</b> Nevirapina Efavirenz Delavirdina	<b>Inhibidores del <i>tat</i></b>  <b>Oligómeros RNA antisentido</b>	<b>Inhibidores de la proteasa</b> Ritonavir Indinavir Saquinavir Nelfinavir  <b>Inhibidores de la glucosidasa</b> Catanospermina	<b>Interferones</b> Interferon- $\alpha$

## **1.8 RESPUESTA INMUNE FRENTE A LA INFECCIÓN VIH/SIDA.**

Muchas infecciones virales no son eliminadas por el huésped pero son controladas por una respuesta inmune efectiva<sup>256</sup>; como ejemplos tenemos: virus Epstein Barr (EBV) y el CMV, los cuales establecen una infección de toda la vida en el huésped pero no causan una enfermedad persistente en personas con un sistema inmune intacto. El establecimiento de respuestas inmunes mediadas por células específicas contra el virus resulta en un equilibrio y el virus permanece latente<sup>257</sup>.

El VIH, por su enorme capacidad replicativa, su rápida velocidad de mutación, su capacidad para alcanzar verdadera latencia y su habilidad para suprimir y finalmente destruir el sistema inmune, evade efectivamente las defensas del huésped; la infección es persistente y finalmente progresiva en una basta mayoría de sujetos no tratados<sup>50,258,259</sup>. Sin embargo, aunque el tiempo de infección no tratada depende de factores virológicos<sup>260</sup> y del huésped<sup>261,262</sup> está claro que los mecanismos inmunes afectan esta infección y probablemente juegan un papel principal en determinar el desenlace clínico.

### **1.8.1 SISTEMA INMUNE.**

El sistema inmune es un sistema de defensa que ha evolucionado en vertebrados para protegerlos de microorganismos patógenos invasores y del cáncer. Es capaz de generar una enorme variedad de células y moléculas capaces de reconocer y eliminar específicamente una variedad aparentemente ilimitada de agentes extraños. Estas células y moléculas actúan conjuntamente en una red exquisitamente adaptable y dinámica.

Las interacciones entre virus y sistema inmunitario del huésped no sólo son complejas sino también fundamentales para determinar el



resultado final de la infección y las estrategias para su prevención. Los virus comparten con otros patógenos, las cualidades de ser inmunógenos complejos que se replican en el huésped. Pueden estimular las respuestas inmunes celular y humoral, que entonces tendrán mayor influencia en el desenlace de la infección. Sin embargo, ya que los virus afectan los procesos metabólicos celulares durante su propia replicación, tiene la propiedad única de alterar directamente la estructura y función celulares.

Funcionalmente, una respuesta inmune puede ser dividida en dos actividades inter-relacionadas: reconocimiento y respuesta. El reconocimiento inmune es remarcado por su especificidad. El sistema inmune es capaz de reconocer cambios químicos sutiles que distinguen un patógeno de otro. Al mismo tiempo, el sistema es capaz de discriminar entre moléculas extrañas y proteínas y células propias del organismo. Una vez que el organismo extraño es reconocido, el sistema inmune prepara la participación de una variedad de moléculas y células para montar una respuesta apropiada, conocida como una función efectora, para eliminar o neutralizar el microorganismo. En este sentido, el sistema inmune es capaz de convertir un reconocimiento inicial en diferentes respuestas efectoras, cada una adaptada para eliminar un tipo particular de patógeno. Posteriores exposiciones al mismo agente extraño inducen una respuesta de memoria, caracterizada por una inmunidad altamente reactiva que sirve para eliminar el patógeno y prevenir la enfermedad. La respuesta inmune tiene componentes tanto inespecíficos como específicos.

La inmunidad natural o no específica, se refiere a la resistencia básica a enfermedad que una especie posee, mientras que la inmunidad

adquirida o específica refleja la presencia de un sistema inmune funcional que es capaz de reconocer y eliminar selectivamente microorganismos y moléculas extrañas. Cuatro propiedades caracterizan las respuestas inmunes: especificidad, diversidad, memoria y discriminación entre lo propio y lo extraño. La especificidad puede ser vista en su capacidad para distinguir diferencias sutiles entre antígenos. Además el sistema inmune es capaz de generar una gran diversidad en su reconocimiento a moléculas. Una vez que el sistema inmune ha respondido a un antígeno, presenta memoria, ésto es, en un segundo encuentro con el mismo antígeno, produce un estado elevado de reactividad inmune. Debido a este atributo, el sistema inmune puede conferir inmunidad, a lo largo de la vida, para muchos agentes infecciosos. Finalmente, la capacidad del sistema inmune de responder sólo a agentes extraños indica que es capaz de distinguir entre los propio y lo no propio. La inmunidad específica no ocurre independientemente de la inmunidad natural TABLA 13

La respuesta inmune frente a las infecciones víricas abarca prácticamente todos los mecanismos efectores del sistema inmunitario TABLA 11<sup>263,264</sup>.

**TABLA 11. COMPONENTES DE LA INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA<sup>264</sup>.**

INMUNIDAD INNATA	INMUNIDAD ADQUIRIDA
<p>Componentes celulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Células dendríticas</li> <li>- Macrófagos</li> <li>- Células productoras de interferón (IPCs)</li> <li>- Células <i>natural killer</i> (NK)</li> <li>- Neutrófilos</li> <li>- Eosinófilos</li> <li>- Células T CD8+ (no citotóxicas)</li> </ul>	<p>Componentes celulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Células dendríticas</li> <li>- Macrófagos</li> <li>- Células B</li> <li>- Células T CD4+</li> <li>- Células T CD8+ (citotóxicas)</li> </ul>
<p>Componentes solubles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Citocinas (Interferones)</li> <li>- Quimiocinas</li> <li>- Complemento</li> <li>- Colectinas o proteínas unidas a lectina</li> <li>- Defensinas</li> <li>- Proteínas de fase aguda</li> </ul>	<p>Componentes solubles:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Anticuerpos</li> <li>- Citocinas (IL-12)</li> </ul>

### 1.8.2 INMUNIDAD INNATA EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.

El sistema de inmunidad innata reconoce patógenos por los componentes en la superficie microbiana más que por una secuencia específica (como es el caso de la inmunidad adquirida)<sup>265,266</sup>. A través de un número limitado de receptores celulares se pueden distinguir un gran subgrupo de patógenos potenciales. Tanto componentes solubles como celulares contribuyen a la respuesta de la inmunidad innata (TABLA 11). Las principales diferencias con la inmunidad adquirida incluyen la velocidad de

la respuesta innata, la ausencia de memoria y la generalidad del sistema de reconocimiento.

Las DCs, los macrófagos y algunas células T pueden unir estos dos principales tipos de respuesta inmune y contribuir tanto a la rapidez de la inmunidad innata y al retardo de la respuesta inmune adquirida.

#### **1.8.2.1 COMPONENTES SOLUBLES ANTI-VIH DE LA INMUNIDAD INNATA.**

Entre los componentes solubles de la inmunidad innata con actividad anti-VIH están las lectinas unidas a manosa (MBLs, por mannose-binding lectins) y el complemento (C). Estos productos solubles se unen al VIH y lo lisan directamente o ayudan a la fagocitosis viral por los macrófagos.

**COMPLEMENTO.-** El sistema del complemento puede también inactivar rápidamente al VIH<sup>267</sup> o servir como opsonina para la fagocitosis del virus. Algunos estudios sugieren que el complemento lisa el VIH en presencia de anticuerpos antivirales específicos<sup>268,269</sup>. De esta forma, el sistema del complemento participa tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. Otros factores solubles de la inmunidad innata son liberados después de la interacción con el patógeno con diferentes células del sistema inmune.

**QUIMIOCINAS.-** Las quimiocinas (citocinas quimiotácticas), pueden reclutar células NK, células T y macrófagos a los sitios de infección por el VIH y aumentar la función citotóxica de estas células<sup>270</sup>. La producción de quimiocinas, y particularmente la presencia o ausencia de sus receptores, podría también influir en la capacidad del VIH para infectar las células<sup>33,41,271,272</sup>.

**CITOCINAS.-** El desarrollo de una respuesta inmune eficaz involucra células linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas. Las complejas interacciones entre estas células están mediadas por un grupo de

proteínas secretadas de bajo peso molecular que son llamadas citocinas para determinar su papel en la comunicación célula-célula. Las citocinas colaboran en la regulación del desarrollo de las células inmunes efectoras y algunas de ellas poseen funciones efectoras directas. Así como las hormonas sirven como mensajeros del sistema endocrino, las citocinas funcionan como mensajeros del sistema inmune; No obstante, a diferencia de las hormonas endocrinas, las cuales ejercen sus efectos a grandes distancias, las citocinas generalmente actúan localmente. Una citocina particular puede presentar acción paracrina, uniéndose a receptores de membrana de la misma célula que la secretó; puede ejercer una acción paracrina, uniéndose a receptores de una célula diana cercana a la que la produjo; en pocos casos ejerce acción endocrina, uniéndose a células diana en distintas partes del cuerpo.

Las citocinas regulan la intensidad y duración de una respuesta inmune por estimulación o inhibición de la activación, proliferación y/o diferenciación de varias células y por regular la producción de anticuerpos u otras citocinas. Las citocinas inmunes innatas como las IL-12, IL-4 y IL-6, pueden determinar si predomina una respuesta inmune adquirida Th1 o Th2. La producción de citocinas induce tanto respuestas innatas como celulares al VIH<sup>270,273</sup>.

**INTERFERONES.-** La infección viral de células estimula directamente la producción de interferones. Los interferones tipo I son producidos de manera no-específica por muchas células en respuesta a infección viral y conducen a la inducción de un “estado antiviral” en las células, el cual está caracterizado por inhibición tanto de replicación viral como de proliferación

celular y realzan la capacidad de las células NK para lisar las células infectadas por virus<sup>270,273</sup>, así como activas la función de otros componentes de la inmunidad innata celular<sup>274,275</sup>. Los IFNs tipo 1 pueden aumentar el reconocimiento del HIV a través de la respuesta inmune adquirida por aumento de la expresión de moléculas clase I del MHC (MHC-I), en las APCs<sup>275</sup>. Los IFNs tipo 1 también aumentan la producción de IFN- $\gamma$  por las células T CD4+<sup>276</sup>; también promueven las respuestas inmunes Th1<sup>277</sup>.

#### **1.8.2.2 COMPONENTES CELULARES ANTI-VIH DE LA INMUNIDAD INNATA.**

Las respuestas inmunes requieren la interacción momentánea de múltiples tipos celulares en microambientes específicos. Durante las respuestas primarias los linfocitos T y B antígeno-específicos necesitan maximizar la posibilidad de encontrarse con el antígeno y unos con otros. Ellos lo hacen así, recirculando a través de órganos linfoides secundarios donde el antígeno es transportado y presentado por células presentadoras de antígeno (APC, por *antigen-presenting cell*). En contraste, en la fase efectora de la respuesta inmune, las células T efectoras deben ser capaces de entrar a cualquier tejido donde puedan estar los patógenos y las células T deben ser capaces de interactuar con otros leucocitos como eosinófilos, mastocitos y basófilos (en el caso de las reacciones alérgicas), o macrófagos y neutrófilos (en el caso de reacciones DTH). Finalmente, las células T de memoria proveen vigilancia inmediata y protección en tejidos contra un segundo desafío y también son capaces de alcanzar los órganos linfoides secundario para sufrir expansión clonal adicional. Así, el tráfico de leucocitos representa un elemento clave en la regulación de la respuesta

inmune. Estudios recientes indican que la selectividad y flexibilidad necesarias para regular el tráfico celular bajo condiciones homeostáticas e inflamatorias están dadas por una diferente distribución tisular de quimiocinas y una expresión regulada de receptores de quimiocinas en diferentes subpoblaciones de leucocitos<sup>278</sup>.

**CÉLULAS PRODUCTORAS DE INTERFERON (IFN) TIPO 1 (IPCs).**- Las IPCs fueron descritas por primera vez en la década de los 70s como células plasmocitoides asociadas a T<sup>279</sup>, y se desconocía su función. Estudios subsecuentes demostraron que este tipo de células es el principal productor de IFNs-1; producen aproximadamente 1000 veces más IFN que otros tipos celulares del organismo<sup>280</sup>. Otros reportes indican que estas células son DCS inmaduras (pDC-2) que pueden madurar a DCS (DC-2)<sup>281-283</sup>. Estas células expresan CD4 y el receptor de IL-3 (IL-3R) pero son negativas para CD11c; se encuentran principalmente en tejidos linfoides<sup>279</sup>. y en un 0.2 – 0.9% en PBMCs<sup>284</sup>. Las IPCs pueden ser derivadas de células CD34+ mediante factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF, por granulocyte colony-stmulating factor) y pueden ser cultivadas por pocos días en presencia de IL-3<sup>285,286</sup>. Las IPCs secretan IFNs tipo 1 después de exposición a virus herpes simple (HSV, por herpes simple virus) u otros patógenos<sup>280</sup>. Estudios clínicos fuertemente sugieren la importancia de las IPCs en la infección por VIH. Recientemente, la pérdida de IPCs y de producción de IFN- $\alpha$  se ha asociado con altos niveles de RNA del VIH y SIDA<sup>284</sup>.

**CÉLULAS NK.**- Son un subgrupo de linfocitos que se encuentran en sangre y tejido. Fenotípicamente carecen de los marcadores de superficie que

definen a las células T y B. Las células NK poseen la capacidad de reconocer y lisar células infectadas por virus y ciertas células tumorales. Actúan mediante un mecanismo que no presenta especificidad antigénica, pero tienen un grado de selectividad para destruir células “anormales” por lisis; además, no necesitan de expansión clonal para ser efectivas. Esto les da la ventaja de actuar en etapas muy precoces de la infección viral, y pueden limitar la infección, mientras los linfocitos antígeno-específicos están siendo reclutados y expandidos clonalmente<sup>270</sup>.

Las células NK eliminan directamente las células infectadas por el VIH o a través de citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC, por antibody-directed cellular cytotoxicity)<sup>270</sup>. La ADCC puede ser clínicamente relevante en la infección por el VIH<sup>287</sup>, una fuerte función de células NK está asociada con un estado clínico saludable<sup>288</sup>. Las células NK son también una fuente de varias citocinas como factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$  y GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) también de  $\beta$ -quimicinas<sup>270,289</sup>.

**CÉLULAS T CD8+ NO-CITOTÓXICA.-** Muchos estudios sugieren que las células T CD8+ son otro ejemplo del componente inmune que puede participar tanto en la respuesta innata como adquirida contra el VIH. Las células T CD8+ pueden controlar la replicación del VIH en las células infectadas tanto por actividad citotóxica clásica<sup>290</sup> y una respuesta antiviral no-citotóxica<sup>291</sup>. La respuesta anti-VIH no citotóxica de las células CD8+ difiere de la actividad citotóxica de las mismas. Es decir, las células T CD8+ pueden también controlar la infección por el VIH sin matar a las células infectadas. Esta función de las células T CD8+ fue notada hace



varios años, cuando estudios en individuos infectados por el HIV pero saludables mostraron que el virus se podía recuperar de las PBMCs aisladas sólo cuando se retiraban las células T CD8+<sup>292</sup>. La adición subsecuente de células T CD8+ a las células T productoras de virus suprimió la replicación viral de una manera dosis-dependiente<sup>291</sup>. La respuesta no-citotóxica antiviral tiene muchas características de una respuesta inmune innata. (TABLA 12).

En la década de los 80's fue reconocido que las células T CD8+ de individuos infectados por el VIH secretan un factor o factores solubles que inhiben la replicación del VIH en PBMC *in vitro*<sup>292</sup> y en macrófagos y DCs<sup>293</sup>. La implicación fundamental de esta observación fue que la infección por el VIH podría estar influenciada y controlada por una respuesta celular que no depende del clásico mecanismo de citotoxicidad; sugiriendo que estos factores podrían contribuir al control de la infección *in vivo*. Este(os) factor(es) antiviral (es) fueron llamados CAF (CD8+ T-cell antiviral factor)<sup>292,294</sup>. Así, el CAF es un factor parcialmente definido<sup>291,294</sup>, se trata de factor(es) producido(s) exclusivamente por células T CD8+, su acción es dosis dependiente y sin restricción por MHC<sup>291</sup>; es activo contra VIH-1, VIH-2 y SIV, es capaz de bloquear la transcripción viral y carece de identidad con citocinas conocidas. Se ha mostrado que la concentración de CAF está inversamente correlacionada con progresión de enfermedad y que está involucrado en la resistencia a la infección por VIH en individuos expuestos no infectados (ENI)<sup>84</sup>.

En individuos seguidos de un estado asintomático hasta el desarrollo de enfermedad, la supresión de la replicación del VIH se

observa inmediatamente después de la infección y disminuye con el tiempo<sup>295</sup>.

Cocchi *et al*<sup>296</sup>, han mostrado que las  $\beta$ -quimiocinas, RANTES (regulated on activation, normal T expressed and secreted); MIP-1 $\alpha$  (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) y MIP-1 $\beta$ , son responsables de la actividad antiviral de las células T CD8+, con la hipótesis de que estas sustancias se unen a un receptor (CCR5), que el virus requiere para entrar a la célula diana. También se ha sugerido un posible papel de otra citocina quimiotáctica, interleucina-16 (IL-16), en el control de la replicación viral<sup>297</sup>.

**OTRAS CÉLULAS INMUNES.-** Entre las otras células inmunes que son importantes en la defensa contra infecciones microbianas, los neutrófilos, las DCs y las células T $\gamma\delta$  merecen especial atención en la infección por el VIH.

Los neutrófilos son las células inmunes más abundantes que responden en las infecciones primarias. Además de su actividad fagocítica, liberan muchas proteínas y citocinas inflamatorias que ayudan al control de la infección<sup>298,299</sup>.

Las DCs expresan receptores de quimiocinas que el VIH usa para entrar a la célula diana. Los receptores de quimiocinas atraen a las DCs a las zonas de inflamación y ellas logran protección contra el VIH a través de su producción de quimiocinas e IFNs tipo 1. También son importantes mediadoras del reconocimiento antigénico y de activar tanto la respuesta innata como la adquirida, mediante la secreción de citocinas como IL-1, IL-1, IL-12 y TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ )<sup>300</sup>.

Las células T $\gamma\delta$ , comúnmente se encuentran en las mucosas y generalmente no reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC, pero interactúan directamente con antígenos no-peptídicos o con proteínas de choque térmico (HSP, por *heat shock proteins*)<sup>266</sup>. Estas células pueden lisar las dianas infectadas por VIH<sup>301</sup>.

**TABLA 12. ACTIVIDAD ANTI-VIRAL NO CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS T CD8<sup>+</sup><sup>264</sup>.**

- 
- No específica contra el VIH; afecta a varios retrovirus.
  - No restringida por moléculas HLA clase I ó clase II.
  - Provee una rápida y temprana respuesta anti-VIH.
  - Se encuentra en individuos expuestos no infectados y se pierde con el tiempo si no hay más exposiciones al VIH (no tiene memoria).
  - Mediada por citocinas secretadas que afectan la replicación viral.
  -
-

**TABLA 13. TIPOS DE RESPUESTA INMUNE**

	INESPECÍFICA	ESPECÍFICA
HUMORAL	Sistema complemento. Interferones.	Anticuerpos.
CELULAR	Fagocitosis. Células NK. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Factores solubles (citocinas, quimiocinas).	Linfocitos T.

Como primera línea de defensa, la inmunidad innata puede prevenir la transmisión del VIH y proteger de infecciones oportunistas y cáncer. Muchos de los patógenos potenciales son detectados y rápidamente destruidos por la inmunidad innata. Si esta protección no es completa, la actividad inmune provee el tiempo y condiciones para que se desarrolle una inmunidad adquirida.

### **1.8.3 INMUNIDAD ADQUIRIDA EN EL CONTROL DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.**

Durante los episodios muy precoces de la infección primaria por el VIH se han detectado vigorosas respuestas inmunes tanto humoral como mediadas por células<sup>51,52,68,69,302-304</sup>. El papel de estas respuestas en el control y la disminución de la replicación viral ha sido objeto de considerable debate. Sin embargo, tanto la inmunidad humoral como la

celular, miembros de la respuesta inmune, contribuyen a la supresión del estallido inicial de la replicación del virus.

#### **1.8.3.1 COMPONENTES SOLUBLES ANTI-VIH DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA.**

**ANTICUERPOS.-** Los anticuerpos específicos pueden proteger contra las infecciones virales. Los anticuerpos antivirales más efectivos son los neutralizantes; son anticuerpos que se unen al virus, usualmente a proteínas de la envuelta o de la cápside viral y bloqueando la unión con la célula huésped, impidiendo su entrada. Los anticuerpos específicos al virus pueden también actuar como opsoninas favoreciendo la fagocitosis de partículas virales junto con la activación del complemento. Además, en el caso de algunas infecciones virales, las proteínas del virus son expresadas en la superficie de la célula infectada y actuar como dianas para los anticuerpos específicos al virus y conducir a lisis mediada por complemento, de la célula infectada o bien, pueden activar a un subgrupo de células NK para destruir, a través de ADCC.

En mucosas como la respiratoria y gastrointestinal, la infección viral puede inducir la producción de anticuerpos específicos de isotipo IgA, los cuales pueden ser protectores contra infección local. Sin embargo, no todos los anticuerpos a virus son protectores, en ciertos casos, pueden facilitar su entrada en la célula a través de los receptores Fc del anticuerpo. Durante el curso de la infección viral, el anticuerpo es más efectivo en el estado precoz de la infección, antes de que el virus entre a la célula. En este sentido, el anticuerpo es relativamente inefectivo en la infección viral primaria debido principalmente al retraso en su producción.

El papel de la respuesta inmune humoral en prevenir la infección por el VIH o retrasar la progresión de enfermedad no está completamente claro. Sin embargo, las evidencias sugieren que aunque esta rama del sistema inmune no es completamente protectora, puede ser capaz de suprimir el virus y que la inmunidad medida por células o una combinación de inmunidad celular y humoral es crucial.

Títulos altos de anticuerpos específicos para una variedad de proteínas de VIH son un componente principal de la respuesta primaria al virus<sup>51-53,303</sup>. En efecto, las pruebas sanguíneas comúnmente empleadas (ELISA y *western blot*) para el diagnóstico de la infección por el VIH están basadas en la detección de anticuerpos al VIH. En los estados precoces de la infección por el VIH, los anticuerpos anti-VIH pueden ser apenas detectados o no son detectados; sin embargo, durante el periodo de seroconversión se detectan títulos altos de estos anticuerpos en el momento del pico de viremia o en el punto de disminución de la viremia<sup>51,52</sup>. Debe hacerse notar el hecho que los anticuerpos producidos durante la infección primaria carecen de actividad neutralizante<sup>68,303</sup>. Por estas razones se piensa que estos anticuerpos tienen poco o ningún efecto sobre la expansión y diseminación viral inicial, sugiriendo que la respuesta de anticuerpos primaria contra el VIH no es protectora. No obstante, esta respuesta de anticuerpos puede contribuir significativamente a la disminución de la viremia, lo cual en efecto, coincide con la detección de títulos altos de anticuerpos. Por lo tanto, aunque la respuesta inicial de anticuerpos puede no ser protectora, puede representar un mecanismo importante para la eliminación de un gran número de partículas virales de

la circulación y para su deposición en el tejido<sup>305-307</sup>. En contraste a este componente no protector de la respuesta humoral específica al VIH, los anticuerpos neutralizantes, los cuales se piensa representan el componente protector de esta respuesta<sup>308-311</sup>, se detectan posteriormente durante el curso de la infección, cuando ha ocurrido la transición de la fase aguda a la crónica de la infección; la neutralización del virus se define como la reducción de infectividad *in vitro* por anticuerpos y por receptor soluble (CD4 soluble) en ausencia de otros factores inactivantes como ADCC; mientras que la neutralización *in vivo* es definida generalmente, en términos de protección<sup>312</sup>. Aún no está claro el por qué los anticuerpos neutralizantes no son generados durante la infección primaria y sólo aparecen posteriormente, algunas veces, aún varios meses después de la seroconversión; se ha sugerido que estos anticuerpos neutralizantes pueden estar dirigidos contra epitopos ocultos que no son expuestos durante la infección primaria<sup>313-318</sup>. Además del efecto neutralizante de los anticuerpos, otras funciones de ellos parecen ser importantes en el control de la viremia. Por ejemplo, los anticuerpos en presencia de complemento pueden lisar viriones<sup>267</sup>.

#### **1.8.3.2 COMPONENTES CELULARES ANTI-VIH DE LA INMUNIDAD ADQUIRIDA**

Las respuestas inmunes celulares son una parte crítica de las defensas del huésped contra las infecciones virales, y los linfocitos T CD8+ forman un componente primario de inmunidad contra protozoos, bacterias, y virus; entre éstos, el VIH<sup>70,319-322</sup>. Estudios *in vitro* han mostrado una potente inhibición de la replicación viral por células T CD8+ tanto por mecanismos líticos como no-lítics<sup>323</sup>. Dado que los mecanismos efectores tanto por

anticuerpos como por CTL son coordinados, regulados y, frecuentemente, dependen de la función de la subpoblación de células Th CD4+, el papel de ellas en la defensa anti-VIH del huésped es casi implícita<sup>324-330</sup>.

Las respuestas inmunes contra el VIH mediadas por células son detectadas muy precozmente durante la infección primaria<sup>68,69,302,304</sup> y son dominadas por grandes aumentos en el número de linfocitos T CD8+<sup>69</sup> que pueden ser 20 veces más que el rango normal (200-600/ $\mu$ l de sangre). En contraste, la caída de la magnitud variable en el número de células T CD4+ está consistentemente asociada con el pico de viremia. Las funciones mediadas por las células T CD4+ están disminuidas durante la infección primaria; esto puede ser el resultado de una disminución numérica en las células T CD4+ o de supresión mediada por factores solubles como citocina.

**CÉLULAS T.-** Hay dos subpoblaciones de células T: Células T cooperadoras (Th, por T helper) y células T citotóxicas (Tc, por T cytotoxic). Las células Th y Tc pueden distinguirse con base en dos glicoproteínas de membrana CD4 y CD8. Las células T que expresan CD4 generalmente funcionan como células Th, mientras que las que expresan CD8 generalmente lo hacen como células T citotóxicas. En respuesta al reconocimiento de un complejo antígeno/molécula-MHC, una célula Th secreta varios factores llamados citocinas o más especialmente, linfocinas; las cuales juegan un papel importante en la activación de células B, células Tc, macrófagos y otras células que participan en la respuesta inmune.

Las diferencias en el patrón de citocinas producidas por las células Th, resulta en diferencias cualitativas en el tipo de respuesta que



desarrolla. Bajo la influencia de citocinas derivadas de células Th, una célula Tc que reconoce un complejo antígeno/MHC se diferencia y prolifera en una célula efectora llamada CTL; el cual tiene una función vital en monitorear las células del organismo y eliminar cualquier antígeno expresado bien como células infectadas por virus, células tumorales, y células de tejidos extraños.

**CÉLULAS T CD8+ CITOTÓXICAS.-** Las principales células efectoras involucradas en eliminar una infección viral son los linfocitos T CD8+ citotóxicos; ellos reconocen antígenos que le son presentados en el contexto de MHC-I.

Un atributo de las células T CD8+ citotóxicas, es su capacidad para matar células diana que expresan complejos péptido/MHC-I específicos. La citolisis fue reconocida como potencialmente significativa en la resistencia a virus porque esta lisis de las células infectadas podría eliminar la producción viral y contribuir de esta forma, a la resolución de la infección<sup>323,331</sup>. Los CTL matan a estas células por lisis o apoptosis<sup>332,333</sup>.

Muchos datos indican el papel importante de los CTL en la infección por el VIH<sup>331,334-338</sup>. Aunque no está muy claro cuales de sus funciones son más importantes en el control del VIH. Ellos producen citocinas que pueden afectar la replicación viral<sup>339</sup>. Esto incluye interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ )<sup>340,341</sup>. Quizás la evidencia más directa llega de estudios recientes que muestran que la CV aumenta dramáticamente después de la deplección experimental de células T CD8+ en monos rhesus infectados con SIV<sup>70,342</sup>. Además, estudios recientes usando nuevos métodos para enumerar los CTL específicos al antígeno han confirmado que la frecuencia de CTL

específicos al VIH es claramente muy alta en muchos individuos infectados<sup>343,344</sup>.

La infección por el VIH conduce al desarrollo de respuestas CTL contra una variedad de antígenos virales, particularmente a epitopos en el *gag*, transcriptasa reversa (RT), *Nef* y proteínas de la envuelta (*Env*)<sup>343,345,346</sup>. La actividad efectora de los CTL ha sido detectada en todas las fases de la infección viral y no disminuye consistentemente con el desarrollo de SIDA<sup>71,347-351</sup>. Sin embargo, las frecuencias del precursor de CTL están reducidas con la progresión a enfermedad<sup>352-355</sup>. Si esta correlación entre la frecuencia del precursor y el estado clínico es un indicador de un papel de los CTL en el control de la infección por el VIH todavía no ha sido determinado. A este respecto, la presencia de niveles altos de CTL a péptidos del VIH no previene el desarrollo de SIDA<sup>354</sup>. Además, estudios en primates no han mostrado correlación entre respuestas CTL y protección de la infección por el SIV<sup>356</sup>.

Con respecto a la función mediada por células T CD8+; se ha demostrado, en un modelo con el SIV, que se pueden detectar CTL específicos al virus cinco días después de la infección<sup>304,357,358</sup>. Similarmente, en muchos sujetos con infección primaria por el VIH, los CTL específico al virus son consistentes y fácilmente detectados durante el síndrome viral agudo y su aparición se correlaciona con la disminución de la viremia<sup>68,69,302</sup>. Un retardo en la aparición de actividad CTL generalmente se asocia con un síndrome viral agudo prolongado con persistencia de síntomas y niveles altos de viremia<sup>68</sup>. En general, la actividad citotóxica específica al VIH puede ser detectada contra proteínas estructurales (*env* y

*gag*) y contra proteínas reguladoras (*tat* y *rev*) del VIH; sin embargo, durante la infección primaria la actividad citotóxica se detecta predominantemente contra proteínas estructurales. Estudios en individuos LTNP han mostrado fuertes respuestas CTL<sup>106,341,359-362</sup> también han reportado respuestas CTL individuos ENI o en individuos infectados transitoriamente, sugiriendo que estas personas pueden haber generado una respuesta CTL protectora; aunque estos datos no son concluyentes<sup>363</sup> debido a las dificultades para su demostración. Una evidencia más completa del papel protector de la respuesta CTL *in vivo* viene con el desarrollo de ensayos cuantitativos más sensibles<sup>344</sup>; mediante la visualización directa de las células CD8+ específicas al antígeno por citometría de flujo<sup>106</sup>.

Por lo tanto, los linfocitos T CD8+ pueden contribuir a la disminución de la viremia por eliminación de las células que expresan el virus (células en las cuales el VIH se replica activamente) vía un mecanismo citotóxico o por supresión de la replicación viral mediada por factores solubles<sup>296,297,364</sup>.

**CÉLULAS T HELPER (Th).**- En concordancia con las observaciones en modelos animales, varios grupos han confirmado la importancia de las células T CD4+ específicas al virus en el control de infecciones virales crónicas en humanos<sup>365-370</sup>.

La inmunidad mediada por células T CD4+ es la respuesta por células T-*helper*, y es importante en el mantenimiento de la respuesta de célula T CD8+ en otras infecciones virales persistentes<sup>324,326</sup>. Las células T-*helper* CD4+ son específicas; se activan cuando se unen a epitopos virales reconocibles presentados en el contexto de MHC-II. Una vez

activadas, secretan IL-2 y otras citocinas que realzan las repuestas humoral y CTL. Estos estudios subrayan el papel clave de las células Th CD4+ en la inducción de una respuestas inmune efectiva durante la infección viral aguda y en orquestar la función inmune en infecciones virales humanas crónicas. En particular, las células Th proveen señales vía citocinas a CTL virus específicos, las cuales estimulan la función adicional de los CTL.

Dado que el VIH infecta selectivamente a las células T CD4+ activadas, las células Th podrían ser depleccionadas prematuramente; así, las personas con infección crónica carecen de función de células Th CD4+ específicas contra el VIH, lo cual podría ser una razón importante para el insuficientemente subsecuente control del virus por CTL<sup>371</sup>; aunque recientemente esto ha sido refutado<sup>329</sup>. Los mecanismos responsables de la deficiencia en las respuestas celulares Th específicas contra el VIH no están claras; las células Th CD4+ activadas son las dianas principales del VIH y son muertas por infección<sup>23</sup> y por apoptosis inducida por el VIH<sup>372,373</sup>. Durante la infección viral aguda las células T CD4+ específicas para el virus infectante llegan a ser activadas en respuesta a la estimulación por el virus y entonces presentan expansión clonal. Las diferencias en la interpretación pueden surgir dependiendo de del ensayo usado para medir la función de las células T. La proliferación de linfocitos *versus* expresión intracelular de citocinas *in vitro*, por ejemplo<sup>329</sup>. Por otro lado tanto los defectos cuantitativos como funcionales de las células Th probablemente contribuyen al defecto inmune dependiendo de el estado de enfermedad. La restauración de la función Th puede ser posible a través de la

administración de citocinas o compuestos como ligando de CD40, molécula que está presente en células T activadas. A través de la interacción con el CD4 en la APC, el ligando CD40 induce producción de citocinas que contribuyen al desarrollo de una función Th efectiva<sup>374</sup>. Kalams SA, *et al*<sup>327,328</sup>, investigando respuestas Th y actividad CTL en personas infectadas por el VIH no tratadas y con un amplio rango de CV, recientemente mostraron que las respuestas proliferativas Th correlacionan positivamente con actividad CTL específica a *gag* y están negativamente correlacionadas con CV. Entonces, tanto las células Th y los CTL específicos contra el virus pueden ser vitales en el control de progresión de enfermedad, y la persistencia de CTLs funcionales puede depender, en parte de la preservación de la respuesta Th. En este mismo estudio, los CTL fueron detectados, en algunas ocasiones, en ausencia de función Th detectable, pero estos CTL no estuvieron asociados con control de la replicación viral. Por lo tanto, niveles altos de CTL específicos contra el VIH en personas con enfermedad progresiva pueden ser subóptimamente efectivos, en parte debido a que la respuesta Th específica contra el VIH está ausente; esta idea puede ayudar a explicar la capacidad del VIH para replicar activamente ante una respuesta CTL vigorosa.

Las respuestas T CD4+ específicas al VIH han sido investigadas en sujetos crónicos no tratados usando pruebas tradicionales de proliferación y, en general, estas respuestas han sido bajas (índice de estimulación  $\leq 5$ ) o indetectables en la mayoría de individuos independientemente del estadio de enfermedad<sup>325,371,375</sup>, llegando a la conclusión que el virus no fue capaz de inducir fuertes respuestas de células T-helper CD4+

específicas al virus; aunque en la interpretación de estos estudio es importante hacer notar que los ensayos de proliferación no provee información precisa sobre la frecuencia de células T CD4+ específicas al antígeno, sólo refleja el número absoluto de células respondedoras y su capacidad para expandirse exponencialmente después de 5-7 días de incubación *in vitro*.

La pérdida de la función de la células Th específicas al VIH ocurre muy pronto durante la infección primaria<sup>235,371,375</sup>. El tratamiento durante la infección crónica no restablece, fidedignamente, la respuesta Th específica contra el virus<sup>235,253,376-378</sup>. Entonces, uno de los beneficios teóricos de identificar y tratar la infección aguda por el VIH es el posible desarrollo y preservación de respuestas T-helper<sup>325,375,379-381</sup>. De tal forma que se ha visto que el tratamiento de la infección aguda por el VIH no solo preserva la función T-helper específica al VIH<sup>107,382,383</sup> sino que en algunos casos está asociada con respuesta CTL específica al VIH preservada<sup>384,385</sup>.

#### **EFFECTOS DEL VIH SOBRE LA RESPUESTA INMUNE**

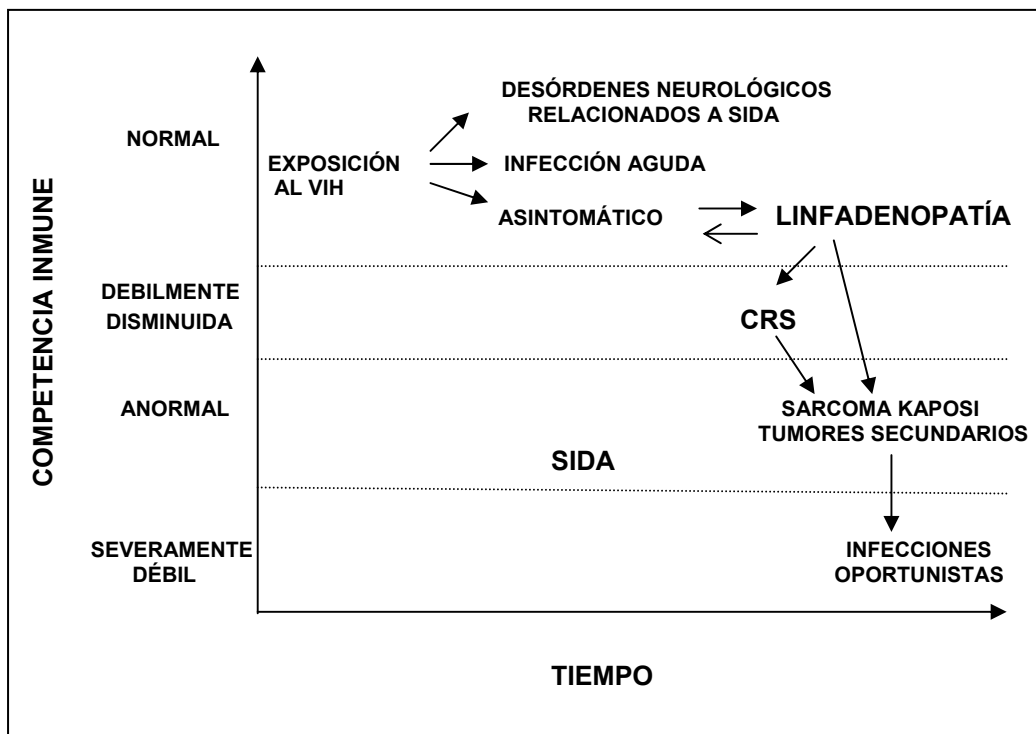
La infección con el VIH representa una paradoja inmunológica, en la cual el VIH induce una fuerte respuesta inmune antiviral, mientras que simultánea y progresivamente altera la capacidad del sistema inmune para responder a nuevas infecciones y antígenos, para finalmente, conducir a una severa deficiencia inmune.

La infección con el VIH está asociada en la mayoría de los casos, con la producción de anticuerpos específicos, algunos de los cuales muestran capacidad *in vitro*, para neutralizar el virus. Además, en la mayoría de los pacientes hay una fuerte respuesta CTL específica al virus, la que se asocia a una caída inicial en el título de virus. Sin embargo, esta

respuesta CTL no parece ser capaz de eliminar el virus y persiste la infección. Hay una disminución progresiva del número de células T CD4+ en el tiempo; la cual se acelera en los pacientes que progresan a SIDA, en quienes la respuesta CTL cae y la viremia se eleva.

Entonces, la infección por el VIH *per se*, conduce a una disregulación de muchos aspectos de la respuesta inmune, incluyendo respuestas de anticuerpos y de células T defectuosas a nuevos antígenos, y disminuye las repuestas de células NK. Estos efectos pueden ser detectados aun cuando el número de células T CD4+ es relativamente normal. Pero a medida que este numero disminuye, los defectos son más marcados, conduciendo al estado de inmunodeficiencia y deja susceptible al huésped a una variedad de infecciones oportunistas y a cierto tipo de tumores. FIGURA 3.

**FIGURA 3. ESPECTRO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA**



CRS, Complejo relacionado a SIDA

### 1.9 ETIOPATOGENIA DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.

Los virus con parásitos intracelulares obligados. De esta manera, las características clínicas de la infección por el virus específico se determinan de acuerdo con las células que se infectan y según si el virus por sí solo origina enfermedad celular. Además de esto, para muchos virus la respuesta del huésped contra los antígenos virales induce lesiones adicionales denominadas efectos inmunopático, que son cualitativamente distintos de los viropáticos.

Similar a otras enfermedades virales, la infección por el VIH puede ser explicada como una lucha dinámica y largamente perdurable entre el virus y el sistema inmune del huésped. Sin embargo, durante los varios



años de esta lucha parece que algunos factores de defensa del huésped cambian de lado y podrían contribuir al éxito del intruso, el virus.

EL VIH y el SIV son miembros de una subgrupo de lentivirus los cuales pertenecen al grupo de retrovirus. Los lentivirus son lentos en inducir enfermedad y están asociados a enfermedades desarrolladas por mecanismos inmunopatogénicos autorreactivos; lo cual depende en parte, de los antecedentes genéticos del huésped<sup>386</sup>, y es posible que el VIH y el SIV empleen mecanismo patogénicos similares.

A pesar de los avances en el entendimiento de la patogenia de la infección por el VIH y en delinear su curso clínico, no hay acuerdo uniforme en la comunidad científica sobre los mecanismos primarios responsables de la infección por el VIH. El asunto que ha sido largamente debatido es si la enfermedad es causada directamente por efectos citopáticos del VIH<sup>387</sup>, o por mecanismos inmunopatogénicos.

La patogenia de VIH/SIDA puede dividirse en dos amplias categorías: 1) Directa o patogenia viral, la cual puede ocurrir por infección directa de las células T CD4+ o vía una APC y 2) Indirecta o inmunopatogenia. Los modelos sugeridos incluyen a) linfocitos T citotóxico CD8+ específicos al VIH<sup>388</sup>; b) reacciones autoinmunes, incluyendo anticuerpos autoinmunes que destruyen el sistema inmune<sup>305</sup>; c) supresión inmune inducida por proteínas del VIH como gp 120, Tat o Nef<sup>389</sup>; d) activación de APC y/o célula T, una característica de la enfermedad por VIH<sup>390,391</sup>; y e) muerte de células T por apoptosis (ATCD, por *apoptotic T cel death*)<sup>392</sup>.

Muchas características del VIH en humanos son consistentes con esto, particularmente la asociación de la tasa de progresión de enfermedad con el grado de activación inmune y anergia antígeno-específica, y el nivel de apoptosis. A la inversa, todas estas características están ausentes en chimpancés infectados por el VIH, los cuales pueden ser infectados por el VIH pero no presentan progresión a SIDA<sup>393</sup>. Aunque existen datos que revelan una CV alta tanto en nódulos linfáticos como bazo inmediatamente después de la infección por el VIH<sup>63</sup>, seguida por tasas altas de replicación viral y mutación durante la fase asintomática<sup>65,394</sup>, la susceptibilidad a la infección y progresión a enfermedad, no pueden ser explicadas solamente con base en la infectividad de las cepas del VIH.

Se han observado notables diferencias en la tasa de progresión de la enfermedad por VIH entre los individuos infectados por el virus; los mecanismos que se han propuesto para explicar estas diferencias incluyen aspectos genéticos, virológicos e inmunitarios<sup>55</sup>. Un fino balance entre estos mecanismos finalmente determina el curso de la enfermedad por el VIH.

Un evento crítico en el establecimiento inicial de la infección por el VIH es la localización del VIH en órganos linfoides que sirven como principales reservorios para el virus y como sitios primarios para la replicación viral y a partir de donde se disemina el virus<sup>62,63,65,66</sup>. La persistencia del virus en órganos linfoides causa una estimulación crónica del sistema inmune que es responsable directa o indirectamente de los mecanismos patogénicos que finalmente dirigen a la destrucción del tejido linfoide, profunda disfunción inmune y progresión de la enfermedad por el

VIH<sup>395,396,397</sup>. EL estallido inicial de la viremia en la infección primaria es la consecuencia de la diseminación sistémica del VIH a través del sistema linfoide y su liberación a la circulación<sup>306</sup>. La disminución de la viremia coincide con la aparición de una respuesta inmune vigorosa, la cual, en muchos individuos fracasa para eliminar completamente el VIH. Este fracaso es el resultado de mecanismos virológicos e inmunitarios mediante los cuales el virus escapa de una respuesta inmune específica contra el VIH que es completamente vigorosa.

Por lo tanto, aunque los parámetros virológicos son generalmente muy bajos después de la transición de infección primaria a la fase crónica de la enfermedad por el VIH, la replicación de virus es persistente en órganos linfoides.

#### **1.9.1 MECANISMOS INMUNOPATOGÉNICOS DE LA INFECCIÓN VIH/SIDA.**

Los mecanismos virológicos son predominantemente responsables de la propagación de la infección por el VIH; los mecanismos inmunitarios generan condiciones desfavorables que evitan esta respuesta inmune vigorosa para eliminar completamente el VIH.

Los mecanismos inmunopatogénicos del VIH/SIDA son complejos e involucran múltiples interacciones entre el virus y el huésped.

Desde el momento del descubrimiento del SIDA en 1981, se supo que una condición involucrada es la pérdida crítica de competencia inmune que se refleja en susceptibilidad a infecciones oportunistas vista previa y principalmente entre pacientes inmunocomprometidos primariamente. La combinación de tropismos, linfocítico y macrocítico, origina por una parte un daño inmunológico profundo y, por otra, alteraciones neurológicas profundas.

El déficit inmunitario que caracteriza la enfermedad por el VIH es más que la simple reducción en el número de células T CD4+. Es esta deplección progresiva la que da como resultado la profunda y amenazante inmunodeficiencia, que es el resultado final de la infección por el VIH. Inmunológicamente, sin embargo, esta descripción es una sobresimplificación de un proceso multifactorial que comienza en el momento de la infección e incluye activación y disfunción además de deplección<sup>398-400</sup>.

La infección por el VIH produce anormalidades inmunitarias importantes, los parámetros de laboratorio que describen este sistema inmune severamente debilitado incluye respuestas linfoproliferativas de células T a antígenos solubles, mitógenos y a antígenos específicos disminuidas así como respuestas de hipersensibilidad retarda débiles, así como una declinación inexorable del número de células T<sup>398-401</sup>.

#### **1.9.1.1 MECANISMOS DE DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4+.**

Estudios sobre la inmunopatogenia de la enfermedad por VIH han dado lugar a un gran número de hipótesis de cómo la infección con el VIH da un aumento en la destrucción de la inmunidad celular funcional. La interpretación lógica de las consecuencias inmunológicas del SIDA es que el VIH infecta y mata a las células T CD4+, resultando en la deplección de este subgrupo de células.

En los pacientes con infección por VIH, la inmunosupresión es debida a defectos tanto cuantitativos como funcionales de las células T CD4+. Los mecanismos potenciales de la disfunción de las células T CD4+ se muestran en la TABLA 14.

**EFFECTO CITOPÁTICO DIRECTO.-** Quizás representa la causa más importante de destrucción linfocitaria; se calcula, a través de modelos matemáticos, que alrededor de  $10^8$  linfocitos CD4 son destruidos diariamente por efecto citopático directo<sup>66</sup> debido a la replicación viral activa.

**APOPTOSIS.-** La muerte celular programada, o apoptosis es un mecanismo fisiológico normal mediante el cual la célula se “suicida” de forma controlada, originalmente descrito en el contexto de la respuesta de timocitos inmaduros a la activación celular<sup>402,403</sup>. Este tipo de mecanismos son naturales e incluso protectores contra el crecimiento celular incontrolado; son importantes en todos los sistemas de desarrollo. Se ha demostrado que el contacto de partículas virales como de proteína gp120, con los linfocitos T CD4 provoca apoptosis si las células son activadas posteriormente<sup>404,405</sup>. Además, la apoptosis podría representar un mecanismo de destrucción de células CD4 no infectadas, preactivados anormalmente por gp120 unida a sus receptores<sup>392</sup>.

#### **TABLA 14. MECANISMOS DE LA DISMINUCIÓN CUANTITATIVA Y FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS T CD4+ EN LA INFECCIÓN VIH/SIDA.**

---

- Efectos citopáticos directos mediado por el VIH
  - Respuestas inmunes específicas al VIH
    - Linfocitos T citotóxicos (CTL)
    - Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)
    - Células natural-killer (NK)
  - Mecanismos autoinmunes
    - Homología entre gp120 y moléculas HLA
  - Inducción de anergia linfocitaria
    - Inapropiada señalización celular por la interacción gp120-CD4
    - Interferencia con los mecanismos de presentación de antígeno
  - Perturbación de subgrupos de células T mediada por superantígenos
  - Apoptosis provocada por partículas y proteínas virales (gp120 y *Tat*)
- 

**CTL ESPECÍFICOS AL VIH.-** Recientemente se ha demostrado que la perfusión de linfocitos T CD8 activados contra el VIH origina *in vivo* una disminución del número de células CD4 infectadas<sup>321</sup>. En la fase de primoinfección existe una correlación entre la caída de CD4 y la expansión de clones CD8 antivirales<sup>106</sup>, lo que sugiere que este mecanismo puede así contribuir a la destrucción de las células CD4 y deterioro del sistema inmune.

**CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO (ADCC).-** Este mecanismo ha sido bien documentado *in vitro* pero *in vivo* no hay evidencias claras; la muerte de las células CD4 que expresan proteínas de

la envuelta del virus (gp120) serían destruidos por el sistema inmunitario mediante ADCC<sup>406</sup>.

**MECANISMOS AUTOINMUNES.-** Determinantes no polimórficos de MHC-II, particularmente HLA-DR y HLA-DQ, presentan algún grado de homología con proteínas del VIH (gp120 y gp41)<sup>407</sup>; y anticuerpos a estas proteínas virales, que han sido demostrado en suero de pacientes con infección por el VIH, podrían reaccionar de manera cruzada con las MHC-II, previniendo la interacción entre CD4 y las moléculas HLA clase II expresadas en las APC; interacción celular requerida para una eficiente presentación antigénica<sup>408,409</sup>.

**ANERGIA.-** La anergia se define como la falta de activación linfocitaria en respuesta a estímulos. Se ha descrito en diversos modelos *in vitro* que componentes víricos como gp120 y la proteína *Tat*, inducen anergia<sup>410,411</sup>.

**DESEQUILIBRIO ENTRE DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T CD4+.-** Se ha postulado la existencia de una heterogeneidad dentro de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ a distintos niveles: por una parte existirían células vírgenes y células memoria; por otra parte, se ha descrito la existencia de una dicotomía de dos tipos de células CD4+, Th1 y Th2.

Aunque la infección con el VIH es responsable del desarrollo de SIDA, es importante conocer hasta que punto la patogenia es el resultado de mecanismos inmuno-mediados, o se debe a una muerte directa de las células T CD4+ por infección.

Está claro que hay una fuerte respuesta inmune inicial contra el VIH, similar o posiblemente tan fuerte como contra otras infecciones virales, Aunque el VIH es citopático infectando a las células T CD4+ *in vitro*<sup>23</sup>.

Puede cuestionarse si el porcentaje de células T infectadas, detectadas en cualquier momento de la infección, puede explicar la extensa deplección de células CD4 observada en pacientes con SIDA, la pérdida de la función de las células Th se presenta muy pronto, aún antes de que las células T disminuyan.

El curso clínico de la infección por el VIH refleja una compleja interacción entre los efectos del virus sobre la función de las células inmunocompetentes y la respuesta inmune del huésped al virus. La patogenia de la infección por el VIH involucra infección de y replicación en las células CD4 del huésped, incluyendo células T CD4+ y en menor grado macrófagos y DCs.

Los efectos de la infección por el VIH sobre el sistema inmune son mayormente debidos al tropismo específico de la gp120 del VIH a la molécula CD4. El CD4 es expresado sobre las células T helper, y estas células juegan un papel central en la inducción de muchas respuestas inmunes. La infección por el VIH puede dirigir a lisis de células T CD4+ o inactivación funcional de ellas sin citolisis. En cualquier caso, la funcionalidad disminuida de las células Th da como resultado un deterioro de todas los tipos de respuestas inmunes.

Los efectos citopáticos del VIH sobre las células T CD4+ está reflejado en la marcada disminución de estas células en los pacientes con SIDA. El cociente de células T CD4+/Células T CD8+ en sangre periférica es aproximadamente 2:1 en individuos normales pero está frecuentemente disminuido (0.5) en pacientes con SIDA. Las células CD4+ están también disminuidas en tejidos linfoides y en sitios de inflamación. Esta profunda



deplección de células Th ocurre a pesar del hecho que en estos pacientes probablemente menos del 1% de las células T están infectadas con el VIH y más del 99% de estas células infectadas lo están de forma latente.

Las dianas principales para la infección inicial por el VIH son aquellas células T CD4+ que expresen un co-receptor apropiado y estén activadas, por ejemplo las células memoria que expresan CCR5. Los individuos infectados con VIH presentan activación persistente de células T CD4+ y CD8+, lo que provee un ambiente óptimo para la replicación viral continua<sup>391,412-414</sup>.

Concomitantemente, hay activación inmune crónica evidenciada por un aumento en el número de células CD4+ y CD8+ que expresan los antígenos de superficie CD38 y HLA-DR (HLA-II). La disregulación de citocinas en una producción aumentada de citocinas inflamatorias como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 e IL-6 y producción disminuida de citocinas tipo Th1 como IL-2, IL-12 e interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Las perturbaciones en los repertorios de células T CD4+ y CD8+ sugieren que la delección clonal de varias células antígeno específicas también ocurre en el tiempo.

## 1.10 RESISTENCIA A LA INFECCIÓN Y/O PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD POR EL VIH.

Complejas interacciones entre factores del virus y del huésped, muchas de las cuales están comenzando a ser entendidas, determina el curso de la infección por el VIH.

Aunque los grupos de PR y de LNTP sólo son una proporción relativamente pequeña de la población total de individuos infectados por el VIH-1, representan una herramienta invaluable con la cual determinar los mecanismos patogénicos asociados con progresión *versus* no progresión de la enfermedad por el VIH.

Los LNTP han sido identificados entre individuos infectados por el VIH cuyos factores de riesgo incluyen exposición sexual, uso de drogas intravenosas, y transfusiones<sup>60,82,85,87,89,99,122,415,416</sup>. Además, se han reportado varios grupos de individuos que están en riesgo de infectarse por estar altamente expuestos al VIH y que sin embargo no se han infectado esto es, permanecen persistentemente seronegativos, sin manifestaciones clínicas y sin VIH detectable ni por cultivo, ni mediante detección de VIH RNA plasmático o VIH DNA en PBMC<sup>417-420</sup>. Los individuos ENI han sido identificados entre parejas discordantes quienes tienen relaciones sexuales sin protección<sup>418,421-426</sup> ADVP<sup>416</sup>, prostitutas<sup>427-430</sup>, personal sanitario, que sufrieron daño probado con agujas contaminadas con sangre VIH-positiva<sup>424,431,432</sup> e hijos de madres seropositivas<sup>416,433,434</sup>.

La identificación de LNTP, PR e individuos ENI, ha permitido la comparación de individuos con diferentes tasas de progresión para tratar de aclarar las complejas interacciones entre factores del huésped y el virus

que podrían determinar no sólo un riesgo individual para progresión de enfermedad sino también el riesgo para la adquisición inicial de infección por el VIH. Con la identificación de los LTNP y ENI, se sugieren que tanto la inmunidad natural y como la adquirida contra el VIH existe, y que son los principales determinantes del desenlace clínico<sup>264</sup>.

Estudios inmunológicos y genéticos en LTNP y en individuos ENI, así como datos de estudios en infección primaria por el VIH, han ayudado a aclarar los mecanismos por los cuales algunas personas están protegidas para adquirir la infección y la progresión de la enfermedad por el VIH. TABLA 15.

**TABLA 15. FACTORES DEL HUÉSPED ASOCIADOS A RESISTENCIA Y/O PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH<sup>435,436</sup>**

Efectos sobre transmisión y progresión de enfermedad.	
<b>Inmunidad Celular</b>	
-Células T citotóxicas prominente en el control inicial de la	Elimina viriones y células infectadas, papel de la viremia, retraso de progresión de enfermedad y, quizás prevención de enfermedad.
-Factores solubles derivados de Células T CD8+	MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, SDF-1, IL-16; inhiben la replicación del VIH de una manera no citotóxica
- Respuesta T- <i>helper</i>	La preservación de esta respuesta podría ser vital para la preservación de la respuesta CTL.
<b>Inmunidad Humoral</b>	
	Prevención y control de progresión de enfermedad
<b>Factores locales</b>	
- ETS y citocinas	Podrían <i>up-regular</i> la replicación del VIH
- CTL y anticuerpos	Prevención de transmisión y progresión de enfermedad
- Células dendríticas	Facilitan la infección de células T por captura y transporte de VIH a nódulos linfáticos y células T activadas
<b>Receptores de quimiocinas</b>	
- Delección CCR5- $\Delta$ 32	Homocigosis asociada con susceptibilidad disminuida a infección por cepas R5. Heterocigosis con progresión de enfermedad retardada
- Mutación CCR2-V641	Heterocigosis asociada con progresión de enfermedad retardada
- Polimorfismos del promotor de CCR5	Homocigosis en el polimorfismo 59029-G se asocia con progresión más lenta y la homocigosis 59356-T a transmisión perinatal aumentada
<b>Quimiocinas</b>	
- SDF1-3'A	Homocigosis, podría estar asociada con progresión retardada a enfermedad
<b>Otros factores genéticos</b>	
- Alelos HLA	Ciertos alelos están asociados con diferentes susceptibilidad a infección y progresión de enfermedad
- IL-10 5'A	Acelera la progresión a SIDA <sup>437</sup>

SDF-1.-Stromal-cell-derived factor-1

### **1.10.1 CÉLULAS T CD8+ CITOTÓXICAS.**

Las respuestas de células Th y de CTL específicos contra el VIH parecen ser cruciales en contener la replicación viral. Aunque algunos individuos con infección no progresora a largo plazo y otros tratados durante la infección aguda por VIH generan respuestas celulares Th virus-específicas, la vasta mayoría de individuos infectados crónicos no lo hacen<sup>438</sup>. Sin embargo, la correlación temporal entre respuestas CTL fuertes y control inicial de la replicación del VIH durante la infección primaria, la presencia desproporcionada de respuestas CTL activas en LTNP comparada con progresores, y la evidencia de respuestas CTL en individuos ENI, sugiere un papel potencialmente protector de los CTL en la prevención y control de la infección por el VIH.

### **1.10.2 CÉLULAS T CD8+ NO-CITOTÓXICA.**

Las respuestas no-citotóxicas parecen ser un mejor mecanismo para controlar la infección por el VIH<sup>294</sup>. Se ha observado una correlación consistente entre estado clínico saludable y una fuerte respuesta no-citotóxica<sup>294,295,439</sup> en individuos con infección por el VIH. En algún punto el control de la viremia se viene abajo, y el cambio en el estado clínico y virológico correlaciona con la disminución de la respuesta antiviral no-citotóxica de las células CD8+.

Esta función no-citotóxica de las células T CD8+ es clínicamente relevante porque está asociada con un estado asintomático a largo plazo y la respuesta disminuye concomitantemente con el desarrollo de enfermedad<sup>291,440,441</sup>. Un tipo similar de respuesta no-citotóxica antiviral ha sido descrita en infecciones por lentivirus en primates no-humanos y gatos<sup>291,442-444</sup>

### 1.10.3 CÉLULAS T HELPER

Varios estudios han revelado que en algunos LTNP que aparentemente controlan de forma espontánea su CV, las respuestas Th CD4+ específicas al VIH, no solo están presentes sino también pueden ser de enorme magnitud y además con respuestas CTL persistentes<sup>107,371</sup>. La persistencia de estas células efectoras activadas por el virus indica replicación viral y estímulo antigénico continuos.

También, estudios en individuos ENI han mostrado actividad CD4+ específica contra el VIH, sugiriendo un papel protector de las respuestas T-helper específicas contra el VIH. Este tipo de respuestas han sido demostradas en personas ENI que tienen relaciones sexuales con personas seropositivas<sup>418,445,446</sup>, personal de salud expuesto por lesiones por jeringuillas contaminadas por VIH<sup>419,431,432</sup>, prostitutas<sup>140,428,447</sup>, e hijos de madres infectadas por el VIH<sup>162,448</sup>.

### 1.10.4 ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES.

Algunos estudios<sup>287</sup>, aunque no todos<sup>60,449,450</sup> han encontrado títulos significativamente más altos de anticuerpos neutralizantes en no progresores que en progresores rápidos.

### 1.10.5 FACTORES LOCALES

El papel de los factores locales en la defensa del huésped contra la infección por el VIH no está del todo claro. Los CTL pueden contribuir al control de la CV en el tracto genital. Musey *et al*<sup>451</sup>, mostraron que células CD4+ y CTL están presentes en secreciones cervicales del 63% de mujer seropositivas y que la actividad CTL fue más frecuentemente observada en pacientes con cuenta de células CD4+ superiores a  $0.500 \times 10^9$  cel/l.

En ausencia de anticuerpos séricos, los anticuerpos a nivel de mucosa pueden jugar un papel protector. Un estudio reciente en prostitutas ENI de Kenya reportó que el 76% de ellas tuvieron anticuerpos IgA específicos contra el VIH en su tracto genital *versus* el 26% de las seropositivas, anticuerpos que solo se hallaron en el 11% de las mujeres con riesgo bajo; sugiriendo un papel protector de la IgA de mucosa en la resistencia a la infección por el HIV<sup>447</sup>. En un estudio de parejas discordantes se reportó que el 82% de personas ENI expresaron IgA específica al VH en lavado vaginal. Sin embargo, el papel de los anticuerpos a nivel de mucosas no está claro ya que la presencia de anticuerpos IgA en fluido cérvico-vaginal no correlaciona con eliminación del VIH o transmisión vertical disminuida en mujeres embarazadas, sugiriendo que estos anticuerpos pueden no neutralizar al virus<sup>452</sup>. Además, la evaluación de IgA e IgG específicas al VIH en varios sitios de la mucosa no revela una correlación entre respuesta inmune a nivel de mucosa y estado clínico en mujeres infectadas por el VIH.

#### **1.10. 6 REPERTORIO DEL RECEPTOR DE CÉLULA T.**

Durante su maduración en el timo, las células T se preparan para expresar un único receptor sobre su membrana para unirse al antígeno, llamado receptor de célula T (TCR, por *T cell receptor*). Se trata de un heterodímero expresado en la superficie de las células Th CD4+ y de las células T CD8+ citotóxicas; está compuesto de dos cadenas de proteínas alfa y beta ( $\alpha\beta$ ) o gama y delta ( $\gamma\delta$ ) unidas por puentes disulfuro; con el 90% de las células T circulantes, en el adulto expresando  $\alpha\beta$ . Los TCR pueden reconocer el antígeno únicamente en asociación con proteínas de la membrana celular

conocidas como moléculas MHC. El TCR interactúa con antígenos extraños en forma de pequeños péptidos presentados por MHC- II o MHC-I (a la célula Th CD4+ o a la célula T CD8+ respectivamente), en la superficie de células infectadas.

EL TCR pertenece a la superfamilia de los genes de las inmunoglobulinas, comprende segmentos con regiones constantes y variables que re-arreglan aleatoriamente durante el desarrollo fetal<sup>453</sup>. Como tal, el TCR representa un elemento clave en la respuesta inmune al desafío patogénico.

Varios estudios han demostrado que antecedentes HLA y factores ambientales pueden influir en la formación del repertorio maduro de TCRs en los humanos<sup>454,455</sup> permitiendo la posibilidad que el repertorio de TCR pueda contribuir a la susceptibilidad/resistencia al VIH.

El análisis de TCR se ha usado para estudiar la frecuencia y longevidad de clonas CTL en individuos infectados por el VIH<sup>456</sup> y para determinar el repertorio de células Th CD4+ *naïve* para antígenos del VIH, por estimulación repetida *in vitro* de PBMC de individuos seronegativos al VIH<sup>457,458</sup>; estudios que tienen implicaciones en diseñar estrategias de vacunación basadas en péptidos pues las respuestas de células efectivas de las células Th median tanto la inmunidad humoral como la celular contra patógenos. Así, el examen del repertorio TCR durante la fase aguda de la viremia de la infección por el VIH ha revelado un repertorio TCR activado pero intacto<sup>459,460</sup>.



### 1.10.7 MOLÉCULAS HLA.

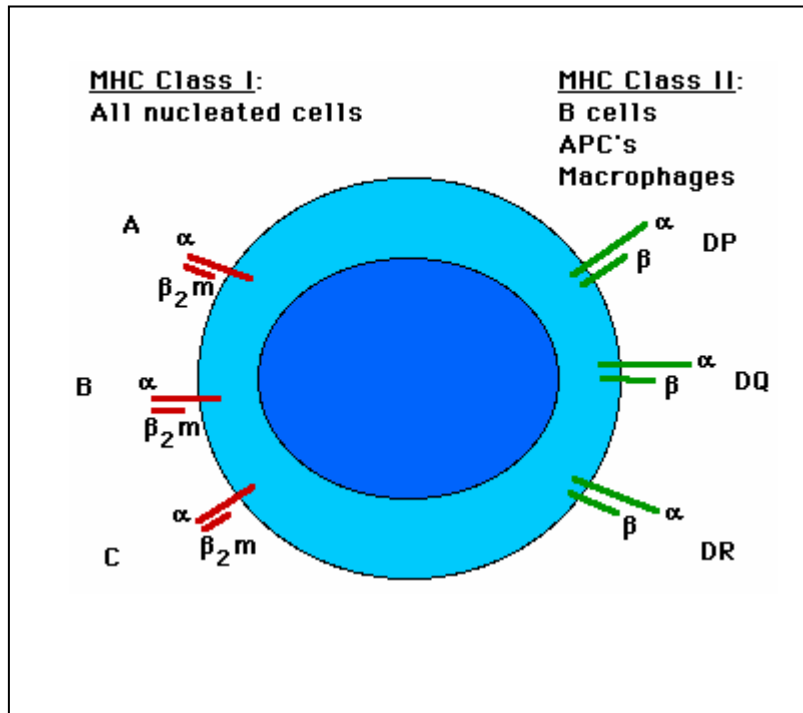
El MHC es un gran complejo genético cuyos productos están asociados con reconocimiento intercelular y con discriminación de lo propio y lo no propio. Es una región con múltiples loci, los cuales codifican dos clases principales de moléculas de membrana: moléculas MHC-I y MHC-II

FIGURA 4. Las moléculas MHC juegan un papel crítico en el reconocimiento del antígeno por las células T. Así, las células Th generalmente reconocen un antígeno asociado con moléculas MHC-II, mientras que las células Tc lo hacen en el contexto de moléculas clase I.

Las moléculas MHC-I son glicoproteínas expresadas sobre la membrana de casi todas las células nucleadas unidas a una pequeña proteína llamada  $\beta_2$ -microglobulina. En el humano existen tres loci clase I; A, B y C. Cada loci MHC-I tiene un gran número de alelos diferentes, hay formas diferentes del mismo gen. Así, una persona hereda un alelo de cada padre por cada locus y entonces expresan dos moléculas clase I, por cada locus, en cada una de sus células nucleadas.

Las moléculas MHC-II son glicoproteínas expresadas por varias células especializadas que funcionan como APC. Hay tres loci clase II en el humano; DR, DP y DQ. Cada locus clase II tiene dos genes  $\alpha$  y  $\beta$  los cuales codifican respectivamente las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de cada molécula MHC-II. Cada persona hereda un alelo de cada padre por cada locus por lo tanto las APC tienen dos moléculas MHC-II por locus.

**FIGURA 4. ESQUEMA DE LAS MOLÉCULAS CLASE I Y II DEL MHC.**



Debido a que las moléculas MHC funcionan como estructuras presentadoras de antígeno, el conjunto particular de moléculas MHC expresado por un individuo influye en el repertorio de antígenos a los cuales las células Th y Tc de él puedan responder. Por esta razón, el MHC determina parcialmente la respuesta de un individuo a antígenos de organismos infecciosos y por esto mismo, el MHC ha sido implicado en la susceptibilidad a una enfermedad y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes.

Varios estudios sugieren que alelos específicos de los loci HLA se asocian con diferentes tasas de progresión<sup>461-464</sup> y susceptibilidad variable a la infección por el VIH<sup>346,362,428,447,465,466</sup>.

La resistencia a la infección por el VIH de mujeres prostitutas en Nairobi está asociada a HLA-A2 y a HLA-DR13<sup>394</sup>. En contraste, el

haplotipo HLA-A1/B8/DR3 está asociado con progresión rápida, también como con susceptibilidad aumentada a la infección<sup>467-470</sup>. Otras clases de alelos MHC-I asociados a progresión de enfermedad incluye HLA-B35, Cw4 y A-24<sup>471-475</sup>.

Muchos otros genes HLA clase I han sido mostrados como “protectivos” en LTNP como HLA-A25, A32, B18, B27<sup>461,461,476-478</sup>, algunos de cuales son raros en muchas poblaciones humanas y la significancia no es clara. Una asociación más fuerte con LTNP fue encontrada en B14 y C8<sup>479</sup>.

Además, heterocigocia en todos los loci HLA clase I parecen ser protectora<sup>461,462,480</sup>. En una cohorte de LTNP, de 28 a 40% presentaron heterocigocia en todos los loci HLA clase I y ausencia de alelos B35 y Cw4 ó ambos<sup>481</sup>.

Los alelos MHC-II asociados con progresión rápida incluyen HLA-DR2 y HLA-DR5<sup>482,483</sup>. Sin embargo, en otro estudio, las especificidades codificadas en el MHC-II DR5 y DR6 correlacionaron con una progresión lenta a enfermedad<sup>461,463</sup>. También se han realizado estudios para una posible asociación HLA con sobrevivientes a largo plazo. Estudios previos asociaron HLA-Bw4 y HLA-DRB1\*0702/DQA1\*0201 con infección por el VIH asintomática<sup>484-486</sup>. Los genes HLA que han sido asociados con el VIH se resumen en la TABLA 16<sup>487</sup>.

Son varias las teorías que ha sido propuestas para explicar las asociaciones entre haplotipo y susceptibilidad a la infección por el HIV y enfermedad. La amplitud de las respuestas protectoras mediadas por células en individuos infectados por el VIH puede depender de cómo

muchos diferentes péptidos derivados de antígenos virales clave (Gag, Pol, Env y Nef) son presentados a sus moléculas HLA<sup>488</sup>. Por otro lado, los genes HLA podrían ser simplemente marcadores para genes que codifican los determinantes clave que confieren protección o susceptibilidad<sup>487</sup>. Alternativamente, los productos proteicos virales conteniendo motivos estructurales/secuencia similares a la molécula HLA podrían lograr una respuesta alotípica capaz de agotar las células T CD4+ no infectadas; la fuerza de la respuesta sería determinada por la capacidad de las moléculas HLA del individuo para procesar y presentar los epitopos virales aloreactivos<sup>487</sup>.

Otra teoría es que los alelos HLA “protectivos” presenten péptidos virales inmunodominantes que generen una fuerte respuesta CTL capaz de neutralizar el virus en el momento de la exposición previniendo así el establecimiento de la infección y la seroconversión. Este mecanismo ha sido propuesto para mujeres ENI de Gambia y descrito para resistencia a la malaria severa asociada a B53<sup>427,489</sup>; por otro lado existe la observación que moléculas de la superficie de células del huésped, incluyendo HLA, son incorporadas a la envuelta del virion<sup>490</sup> por lo tanto, es posible en el caso de las prostitutas de Nairobi, que respuestas inmunes aloespecíficas, incrementadas y mantenidas por el contacto sexual regular, protejan a la mujer por el reconocimiento como antígeno extraño las moléculas HLA que son incorporadas en la envuelta de las partículas virales. Este argumento es apoyado por el hallazgo que la protección correlaciona con el número de contactos sexuales, también como por el hecho que el haplotipo de

mujeres protegidas es raro para la población de Nairobi (muchos contactos sexuales representarían una forma de alo-inmunización).

Es importante entender la naturaleza de la protección asociada a HLA de la infección por el VIH para el diseño de estrategias de vacunación efectivas.

**TABLA 16. ASOCIACIÓN DE HLA CON RESISTENCIA Y/O PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD POR EL VIH<sup>487</sup>.**

---

Progresores rápidos:

A1, A9 A11, A23, A24, A28+ TAP2.3, A29+TAP2.1,  
B8+DR3, B35+Cw4, DR2, DR5

Progresores lentos y LTNP

A9, A25+TAP2.3, A26, A32, B5, B14, B18, B27, B57,  
Bw4, DR5, DR6, DR7, DRB1\*0702+DQA1\*0201, DR13

ENI

A2, A28, DR13

---

#### 1-10.8 INMUNIDAD INNATA

Componentes de la inmunidad innata como la respuesta antiviral no-citotóxica, también parece proteger a los individuos ENI de la infección<sup>426</sup>.

Quizás la ausencia de enfermedad en primates infectados de forma natural y la protección de infección o enfermedad en animales infectados experimentalmente con SIV<sup>491</sup>, resulte de respuestas de inmunidad innata.

La importancia de la inmunidad innata está también reflejada en supervivientes a largo plazo o quienes muestran una respuesta antiviral no-citotóxica persistente<sup>440</sup> y un número alto de IPCs<sup>284</sup>. Las IPCs podrían también tener un importante papel protector en individuos infectados no tratados con número muy bajo de células T CD4+ sin evidencia de infección oportunista o cáncer<sup>284</sup>.

## **1.11 QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES EN LA INFECCIÓN VIH/SIDA.**

### **1.11.1 QUIMIOCINAS .**

La migración celular tiene un papel fundamental en una amplia variedad de fenómenos biológicos. Es de particular importancia para la función de los leucocitos, la respuesta inflamatoria y la respuesta del huésped a la infección. Las quimiocinas son los principales factores quimiotácticos implicados en la regulación del tráfico leucocitario, también en el establecimiento de la arquitectura del órgano linfoide; regulan que el precursor del linfocito entre en los órganos linfoides primarios y la migración de linfocitos maduros a órganos linfoides secundarios, donde sufren activación y son responsables de inducir respuestas inmunes funcionales<sup>492,493</sup>.

A la fecha han sido identificadas más de 40 quimiocinas en humanos; actúan principalmente sobre neutrófilos monocitos, linfocitos, y eosinófilos y juegan un papel fundamental en los mecanismo de defensa del huésped. Cuando inicialmente fueron identificadas, se desconocía su actividad biológica pero fueron asociadas con enfermedades inflamatorias<sup>494,495</sup>. Fue después de la identificación de IL-8 (interleucina-8)<sup>496</sup>, MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein 1*)<sup>496,497</sup> y MIP-1 $\alpha$  y

MIP-1 $\beta$ <sup>498</sup>, como factores quimiotácticos para los leucocitos que quedó claro que estas proteínas tienen características estructurales importantes y capacidad para atraer leucocitos<sup>499</sup>.

Se trata de un grupo de pequeñas moléculas solubles (aproximadamente 8-14 kDa), con una 20-70% de homología en su secuencia de aminoácidos; subdividido en familias con base en la posición relativa de sus residuos de cisteína en la proteína madura<sup>500,501</sup>.

Sólo dos, de las cuatro, familias han sido extensamente caracterizadas;  $\alpha$  y  $\beta$  quimiocinas, las cuales contienen cuatro cisteínas y parecen ser las familias más grandes. En las  $\alpha$ -quimiocinas, los primeros dos residuos de cisteínas están separados por un solo aminoácido (cisteína-aminoácido-cisteína ó CXC), mientras que en las  $\beta$ -quimiocinas, los primeros dos residuos de cisteína están adyacentes (cisteína-cisteína ó CC). Después tenemos dos familias menores; una, que ha perdido la primera y tercer cisteína, está representada por linfotactina y se conoce como C ó  $\gamma$ -quimiocina y, finalmente la familia CX<sub>3</sub>C o  $\delta$ -quimiocina, tiene tres aminoácidos entre la primera y segundas cisteínas y está representada por la fractalcina ó neurotactina<sup>502-504</sup>. Los efectos biológicos de las quimiocinas están mediados por interacciones con receptores de tipo siete dominios transmembrana (7M)<sup>28,29,29,505-509</sup>.

Las relaciones entre las quimiocinas inicialmente no se apreciaron, lo que condujo a una nomenclatura idiosincrásica consistente de muchos acrónimos. Un nuevo sistema de clasificación de quimiocinas recientemente. TABLA 17<sup>510</sup>, presentado en el *Keystone Chemokine Symposium*, está basado en la nomenclatura en uso reciente, de los

receptores de quimiocinas; la cual usa CC, CXC, XC o CX<sub>3</sub>C seguida de R (receptor), y enseguida un número. Así tenemos CCR1-10, CXCR1-5, XCR1 y CX<sub>3</sub>CR. Básicamente, la nueva nomenclatura reemplaza la R por L (ligando) (TABLA17). Dado que los genes para estas moléculas se designan con las siglas SCY (*small secreted cytokine*); cada familia de quimiocinas puede nombrarse como CC ó SCYa; CXC ó SCYb; C o SCYc; y CX<sub>3</sub>C o SCYd- quimiocinas. Esta nueva nomenclatura elimina ambigüedades ya que directamente indica la clase a la cual pertenece cada quimiocina.

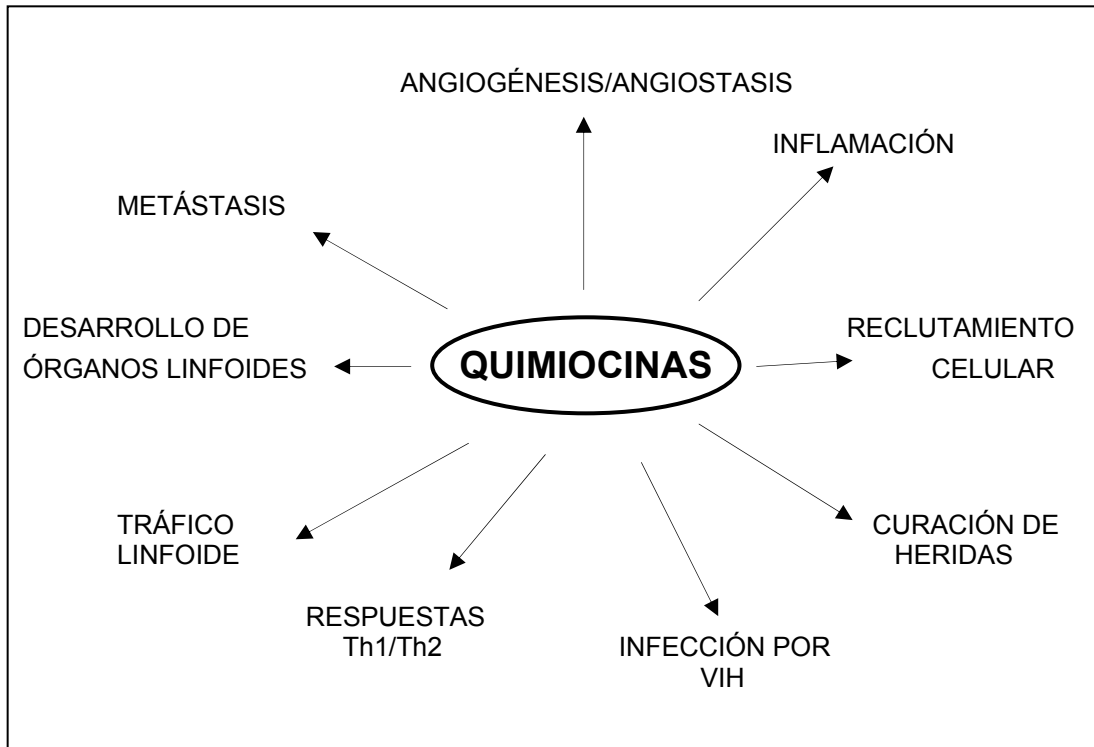
La TABLA 17 también muestra la redundancia y promiscuidad de unión entre muchos ligandos y receptores<sup>511</sup>. Esa promiscuidad es real porque se involucran interacciones de alta afinidad. Así, una sola quimiocina puede unirse a varios receptores, mientras que un solo receptor transduce señales para varias quimiocinas. Ésta es una de las características más interesantes de la superfamilia de quimiocinas y puede reflejarse en su capacidad para regular diferentes subpoblaciones de leucocitos, especialmente en microambientes complejos como respuestas inflamatorias agudas o crónica<sup>510</sup>. Sin embargo, la redundancia funcional parece no ser la regla, muchas de ellas presentan alta especificidad; otras, tienen un papel fundamental en la homeostasia y también en respuestas inflamatorias que no pueden ser reemplazadas por otras.

Avances significativos se han hecho en el entendimiento del papel de las quimiocinas en enfermedades inflamatorias. (FIGURA 5)<sup>512,513</sup>, hematopoyesis, angiogénesis, metástasis<sup>514</sup>, respuestas Th1/Th2<sup>278,515-517</sup>



e infección por el VIH; para tratar de entender, en este caso particular, los mecanismos de acción de las quimiocinas<sup>41,518,519</sup>.

**FIGURA 5. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LAS QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES<sup>513</sup>.**



### 1.11.2 MECANISMOS DE INHIBICIÓN DEL VIH MEDIADOS POR QUIMIOCINAS.

Se ha postulado varios mecanismos mediante los cuales las quimiocinas inhiben la infección por VIH<sup>520-525</sup>.

Un modelo es el llamado estérico, sostiene, con base en resultados de ensayos funcionales como quimiotaxis, en donde se emplean quimiocinas modificadas, que la unión de la quimiocina a su receptor, bloquea la interacción del complejo env-VIH/CD4 con el receptor<sup>20,522,523</sup>.

Otro modelo sugiere que las quimiocinas inducen desensibilización y/o internalización del receptor, previniendo la interacción del virus con la

células diana y la infección de la misma<sup>520,521,524,525</sup>. Este modelo permitió la generación de agonistas potentes de quimiocinas que inducen internalización del receptor y de esta forma se previene la infección por el VIH; El tratamiento con AOP-RANTES (aminooxypentane-RANTES) dio como resultado una rápida disminución de la expresión de CCR5 en la superficie de monocitos y linfocitos<sup>523,526</sup>, siendo un potente inhibidor de infección por variantes R5 del VIH.

Una tercera posibilidad es que el receptor sufra un cambio conformacional después de la unión a la quimiocina dando lugar a una estructura no reconocida por el virus. Vila-Coro *et al*<sup>527</sup>, proponen una dimerización, lo cual podría impedir la interacción entre la gp120 del VIH y el receptor de quimiocina.

Ha sido propuesto que la resistencia a la infección por VIH puede producirse de una combinación de niveles altos de quimiocinas inhibitorias y nivel de expresión de CCR5 disminuido<sup>528</sup>.

### 1.11.3 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.

Los organismos patógenos se unen a receptores celulares para tener acceso al citoplasma o núcleo de las células; por ejemplo, el EBV se une al receptor 3 del complemento y los rinovirus se unen a ICAM-1 (molécula intracelular de adhesión-1). En este sentido, los receptores quimioattractantes han sido identificados como vehículos de invasión celular para importantes patógenos humanos; como ejemplo tenemos el antígeno de grupo sanguíneo Duffy (DARC), un promiscuo receptor de quimiocina en eritrocitos humanos<sup>529</sup>, el cual sirve como una proteína de unión para *Plasmodium vivax*; la molécula PAFR (*platelet-activating-factor receptor*), que sirve de entrada para *Streptococcus pneumoniae*<sup>530</sup>. A este

grupo de patógenos que usan receptores celulares involucrados en la defensa del huésped debemos ahora, agregar al VIH<sup>33-35</sup>, que se unen principalmente a CXCR4 y CCR5. Por facilitar la entrada a células diana, estos receptores determinan el tropismo viral<sup>28,29,506-509,531</sup>.

Los receptores de quimiocinas pertenecen a la superfamilia de receptores con siete dominios transmembrana (7M)<sup>504,511</sup> que representan un subgrupo de receptores unidos a proteínas G (GPR, por *G protein-coupled receptor*)<sup>529,532,533</sup>, median una variedad de funciones de leucocitos, particularmente migración celular<sup>504,534-536</sup>. La señalización de quimiocinas a través de estos receptores es importante para el posicionamiento de las células a un tejido, y posiblemente también para la activación durante el proceso de extravasación de leucocitos<sup>493,537</sup>. A la fecha se conocen 17 receptores de quimiocinas (CCR1-10, CXCR1-5, XCR1 y CX<sub>3</sub>CR1) TABLA 17; incluyendo CCR10, recientemente identificado por Homey *et al*<sup>538</sup>.

Los receptores de quimiocinas son expresados en diferentes tipos de leucocitos; algunos de ellos se restringen a ciertas células, por ejemplo, CXCR1 está predominantemente restringido a neutrófilos; mientras que otros son más ampliamente expresados como es el caso del CCR2 que se encuentra en monocitos, células T, células NK, células dendríticas y basófilos. Además, los receptores de quimiocinas están constitutivamente expresados en algunas células, mientras que otros son inducibles. CCR1 y CCR2 están constitutivamente expresados en monocitos y se expresan en linfocitos sólo después de estimulación con IL-2<sup>539</sup>. Ciertos factores pueden disminuir la expresión de algunos receptores de quimiocinas; los

lipopolisacáridos pueden disminuir la expresión de CCR2, haciendo que las células no respondan a MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), la cual activa sólo este receptor; la célula conserva su capacidad para responder a MIP-1 $\alpha$ , que también activa a CCR1 y CCR5<sup>540</sup>.

Por el contrario, la expresión de otros receptores está restringida a células en estado de activación y diferenciación; por ejemplo, CXCR3 está expresado en células Th1 activadas, mientras que CCR3, además de estar en eosinófilos y basófilos, está preferentemente expresado sobre células Th2<sup>541</sup>. Así, el aumento transitorio de receptores de quimiocinas en los leucocitos permite la amplificación selectiva de respuestas inmunes celulares mediadas por células Th1 o una respuesta alérgica (tipo Th2). Células no hematopoyéticas como neuronas, astrocitos, células epiteliales y endoteliales, también expresan receptores de quimiocinas; sugiriendo que el sistema de quimiocinas tiene otros papeles además de la quimiotaxis leucocitaria.

Aunque *in vitro* muchos receptores se unen a más de una quimiocina y viceversa<sup>511</sup>, los receptores CC se unen sólo a quimiocinas CC y los receptores CXC sólo a quimiocinas CXC. Esta restricción ligando-receptor puede estar relacionada a diferencias estructurales entre las quimiocinas CC y CXC, las cuales tienen estructuras primarias, secundarias y terciarias muy similares pero presentan diferencias en la cuaternaria<sup>542</sup>. Como resultado de las interacciones normales receptor-ligando efectivamente los co-receptores se vuelven “no disponibles” para el VIH.

Poco tiempo después del descubrimiento que ciertas quimiocinas presentan propiedades antivirales<sup>296</sup>. Feng *et al*<sup>506</sup>, demostraron que un

receptor huérfano, entonces conocido como LESTR y ahora llamado CXCR4, es capaz de actuar como co-receptor de entrada de cepas VIH X4 pero no R5; que su ligando natural SDF-1, bloquea la entrada de cepas X4 del VIH<sup>543,544</sup>. El descubrimiento de que el receptor de quimiocinas, CCR5, específico para las quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ <sup>545</sup>, es otro de los principales co-receptores del VIH<sup>33-35</sup>, completaron el círculo.

La proteína *env* media la unión del virus a la superficie de la célula del huésped a través de una interacción de alta afinidad con CD4, el principal receptor del virus. Sin embargo, es la subsecuente interacción con el receptor de quimiocina apropiado que se producen los cambios conformacionales finales en *env*, conduciendo a la fusión de las membranas virales y celulares y por ende, la infección. La unión de formas solubles de *env* a los co-receptores es dependiente de CD4, sugiriendo que la unión de CD4 es pre-requisito para interacciones eficientes del co-receptor<sup>33-35,546-548</sup>.

#### **1.11.3.1 CCR5.**

Igual que otros receptores de quimiocinas, CCR5 es una proteína con siete dominios transmembrana, cuatro de ellos extracelulares: un amino-terminal y tres *loops* extracelulares<sup>533</sup>. A la fecha, CCR5 es el único receptor conocido para MIP-1 $\beta$ <sup>545,549-551</sup>. Los niveles de expresión de CCR5 en células T varía dramáticamente de individuo a individuo<sup>552</sup>.

La importancia de CCR5 para la transmisión del VIH fue resaltada por la observación que ciertos individuos, quienes han estado repetidamente expuestos al VIH sin infectarse, tienen un defecto en la expresión de CCR5<sup>100,553-555</sup> (polimorfismo CCR5- $\Delta$ 32). Similarmente,

individuos VIH+ con expresión reducida de CCR5 generalmente presentan mejores perfiles clínicos<sup>100,116,553-556</sup>.

Algunas de las características de CCR5 fueron identificadas mediante anticuerpos monoclonales (mAb) a CCR5: 1) CCR5 es expresado por diferentes subpoblaciones de células T como célula efectora/memoria CD26<sup>hi</sup>; células T memoria CD45RO+; células T activadas *in vitro*; linfoblastos en nódulos linfáticos y macrófagos. 2) individuos heterocigotos para el alelo CCR5-Δ32 expresan niveles marcadamente reducidos de CCR5 en la superficie de las células T. 3) existe considerable variación en la expresión de CCR5 de individuo a individuo en la población CCR5+/+ (ó, *wild type*), y los niveles de expresión correlacionan con susceptibilidad de las células a la infección *in vitro*. Finalmente, un mAb anti-CCR5 fue capaz de bloquear, *in vitro*, la infección de PBMC por cepas R5, demostrando la viabilidad de inhibición de este receptor mediante un mAb<sup>552</sup>.

Se han identificado diferentes regiones de CCR5 capaces de unirse a diferentes cepas virales, existe concordancia en algunos puntos: 1) Las interacciones *env*-CCR5 son conformacionalmente complejas, involucran residuos de los 4 dominios extracelulares<sup>35</sup>; 2) el dominio N-terminal de CCR5 es particularmente importante, siendo capaz de conferir función de co-receptor a otros receptores de quimiocinas<sup>557</sup>. Así, hay dos sitios de unión funcionalmente redundantes para *env* en CCR5, uno en el dominio N-terminal y otro en los *loops*; 3) Los virus particularmente bien adaptados para CCR5 pueden frecuentemente tolerar alteraciones significativas en uno de estos sitios. Es interesante que, los virus dualmente trópicos, que también usan CXCR4 son mucho menos tolerantes a cambios en CCR5<sup>35</sup>.

Aunque relativamente pocos virus de este tipo han sido estudiados, ellos parecen en general, ser muy sensibles a alteraciones en el dominio N-terminal y son menos capaces de utilizar *loops* extracelulares de CCR5<sup>558</sup>.

Zhu Y *et al*<sup>559</sup> mostraron, mediante ratones *Knock-out* para CCR5 que la ausencia de una  $\beta$ -quimiocina o de CCR5 es bien tolerado, posiblemente debido al alto grado de redundancia en esta familia de quimiocinas, ya que la función de CCR5 podría ser compensada por otros receptores.

#### 1.11.3.2 CXCR4.

El receptor CXCR está expresado tanto en las células T CD4+ como en el sistema monocito/macrófago, principales células diana del VIH. Se ha visto que los patrones de expresión de los co-receptores está regulado por una variedad de factores como lipopolisacáridos; quimiocinas; citocinas, IL-2 aumenta la expresión de CCR1 y CCR2 en las células CD45RO+<sup>539</sup>; el INF- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) induce una rápida disminución de mRNA para CXCR4 que correlaciona con un efecto de la citocina en atenuar la respuesta quimiotáctica de los receptores CXCR4 a SDF-1<sup>560</sup>. Otros estudios han mostrado que la expresión de CXCR4, en la superficie celular, puede ser modulada por tanto por su ligando natural (SDF-1) como por otros agentes como esteres de forbol; hormonas, como la progesterona<sup>561</sup>.

Aunque hay considerable variabilidad en cómo las cepas del VIH interactúan con CCR5, hay menos variabilidad en cómo es usado el co-receptor CXCR4. Contrario a lo que sucede con CCR5, el dominio amino terminal de CXCR4 es considerablemente menos importante para la función de co-receptor. El primero y segundo *loops* extracelulares de

CXCR4, especialmente el segundo, son determinantes cruciales para todas las cepas virales a la fecha estudiadas<sup>45,562</sup>. Estos mismos dominios están involucrados en la unión con SDF-1, lo cual podría ayudar a la capacidad de esta quimiocina para bloquear la infección viral dependiente de CXCR4.

Debido a sus funciones naturales, CCR5 y CXCR4 pueden potencialmente influir en la infección viral por modificación del sitio en el cual ocurre la fusión de membranas (mediante de endocitosis mediada por receptor) o alterando el ambiente intracelular mediante señalización por el receptor<sup>563-565</sup>.

En contraste a lo que ocurre con el receptor CCR5, ratones deficientes en la quimiocina SDF-1<sup>566</sup> o el receptor CXCR4<sup>567</sup> presentan severas alteraciones en su desarrollo.

Algunos estudios<sup>552,568</sup> han demostrado una relación relativamente recíproca entre la expresión de CCR5 y CXCR4 en PBMC de individuos normales. El CXCR4 se expresa predominantemente en células T CD26<sup>low</sup>, CD45RA+, CD45RO-, indicando un fenotipo *naive* inactivado; y CCR5 es expresado en células T CD26<sup>high</sup>, CD45RA-, CD45RO+, CD25-, CD95+, un fenotipo consistente con células memoria previamente activadas. La activación celular es crítica para la infección productiva tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>569-572</sup>. Apoyando estos hallazgos, Ostrowski *et al*<sup>44</sup> mostraron que el estado elevado de activación celular en individuos infectados por el HIV-1 está asociado con sobreexpresión de CCR5 en las células T CD4+ (30-40%) y CD8+ (70-80%) y una disminución de CXCR4 en las células T CD4+ (10%) y CD8+ (0.3-1.0%), comparado con individuos VIH negativos;



sugiriendo que este ambiente favorece la propagación de variantes R5 del VIH.

Los ligandos naturales del huésped para estos co-receptores son relevantes porque ellos pueden interferir con la entrada del VIH en las células diana TABLA 18. Por ejemplo, CCR5 se une a RANTES MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , miembros de la familia de las  $\beta$ -quimiocinas, y CXCR4 se une a un miembro de las  $\alpha$ -quimiocinas, SDF-1. Estas moléculas pueden bloquear la entrada del VIH por interferir la unión del virus al receptor o por disminución del mismo<sup>520</sup>.

**TABLA 17. FAMILIAS DE QUIMIOCINAS-RECEPTOR. NUEVA CLASIFICACIÓN<sup>510</sup>.**

NOMBRE SISTEMÁTICO	LIGANDO	RECEPTOR
CXCL1	Gro $\alpha$ /MGSA- $\alpha$	CXCR2 > CXCR1
CXCL2	Gro $\beta$ /MGSA- $\beta$	CXCR2
CXCL3	Gro $\gamma$ /MGSA- $\gamma$	CXCR2
CXCL4	PF4	DESCONOCIDO
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	CXCR2
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	CXCR3
CXCL12	SDF-1/PBSF	CXCR4
CXCL13	BLC-1/PBSF	CXCR5
CXCL14	BRAK/Bolecine	DESCONOCIDO
CXCL15	Lungcine	DESCONOCIDO
CCL1	1-309	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR, CCR5
CCL4	MIP-1 $\beta$	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR2, CCR5
(CCL6)		
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3
CCL8	MCP-2	CCR3
(CCL9/10)		
CCL11	Eotaxin	CCR3
(CCL12)		CCR2
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1/HCC-3	CCR1
CCL15	HCC-2/LEUCOTACTIN	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4/LEC	CCR1
CCL17	TARC	CCR4
CCL18	DC-CK1/PARC/AMAC-1	
CCL19	MIP-3 $\beta$ /ELC/exodus_3	CCR7
CCL20	Mip-3 $\alpha$ /LARC/exodus-1	CCR6
CCL21	6Ckines/SLC/EXODUS-2	CCR7
CCL22	MDC/STCP-1/ABCD-1	CCR4
CCL23	MPIF-1	CCR1
CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	CCR3
CCL25	TECK	CCR9
CCL26	SCYA26/Eotaxin-3	CCR3
CCL27	(MCC)/ALP/CTACX/Eskine	CCR10
CCL28*		CCR10
XCL1	linfotactina/SCM-1 $\alpha$ /ATAC	XCR1
XCL2	SCM-1 $\beta$	XCR1
CX <sub>3</sub> CL1	Fractalcina/neurotactina	CX <sub>3</sub> CR1

\* Wang et al<sup>573</sup>, recientemente identificaron la quimiocina CCL28.

**TABLA 18. RECEPORES DE QUIMIOCINAS Y SUS LIGANDOS<sup>492</sup>.**

---

Co-receptor	Ligando
CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$
CXCR4	SDF-1
CCR3	MCP-1, MCP-2, MCP-, MCP-4, MCP
CCR2b	

---

**MCP-1.- monocyte chemotactic protein-1**

**1.12. QUIMIOCINAS E INFECCIÓN VIH/SIDA.**

Está claro que existen mecanismos naturales efectivos para evitar la infección por el VIH; uno de los cuales puede ser la sobreproducción de quimiocinas supresoras del VIH.

El interés en las quimiocinas en la infección por el VIH comienza en 1995 cuando se caracterizan RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  como los principales componentes de factores solubles supresores del VIH producidos por células T CD8+ primarias<sup>296</sup>. Antes de este descubrimiento, altos niveles de factores solubles supresores del VIH fueron asociados con infección por el VIH asintomática<sup>439</sup>. Esta asociación, considerada junto con los mecanismos antivirales conocidos de estas quimiocinas, lógicamente condujo a la hipótesis que la liberación de altos niveles de RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  podrían estar asociados con resistencia a infección primaria y/o progresión de la enfermedad. En concordancia con esta idea, la sobreproducción de estas moléculas ha sido asociada con resistencia a infección primaria por el VIH en individuos ENI<sup>528,574-579</sup>, baja

transmisión maternal del virus<sup>580</sup>, y a un mejor estado clínico en individuos infectados por el VIH con o sin terapia anti-retroviral<sup>107,574,578,581-585</sup>.

Así, Garzino-Demo *et al*<sup>576</sup>, mostraron que PBMC de sujetos VIH + asintomáticos de la cohorte MACS, producen altos niveles de MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  cuando son estimuladas por antígenos del VIH, en donde los niveles de estas dos quimiocinas fueron significativamente más altos en sujetos VIH+ asintomáticos que en controles no infectados y en sujetos con SIDA. Sin embargo, es particularmente significativo que la sobreproducción de estas quimiocinas también ocurra en respuesta a antígenos diferentes al VIH; lo cual podría significar que algunos individuos tienen una capacidad innata para producir altos niveles de ciertas quimiocinas en respuesta a un estímulo general.

Otros estudios han mostrado sobreproducción no sólo de MIP-1 $\beta$  sino también de RANTES y MIP-1 $\alpha$  en asociación con resistencia natural a la infección primaria por VIH<sup>528,577</sup>. Un estudio reciente reportó que los altos niveles de RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  secretadas por linfocitos CD8+, correlaciona inversamente con las mediciones de CV de individuos infectados por VIH<sup>586</sup>.

Zagury *et al*<sup>574</sup>, siguieron una cohorte de individuos hemofílicos; en esta cohorte, algunos de ellos permanecen sin infección a pesar de tener una historia bien documentada de haber sido transfundidos con sangre contaminada con VIH, (cuando aún no se disponía de las pruebas sanguíneas para el SIDA), y sin alelos CCR5 mutados. Las células activadas de estos individuos ENI liberaron niveles anormalmente altos de

$\beta$ -quimiocinas en respuesta a PHA (*phytohemagglutinin*) en comparación a controles.

Estudios realizados en macacos inmunizados con inmunógenos del SIV mostraron que niveles altos de  $\beta$ -quimiocinas producidas por células CD8+, correlacionan con protección junto con otros parámetros inmunitarios<sup>587,588-591</sup>.

Está claro que ciertos individuos tienen una capacidad innata para producir altos niveles de quimiocinas en respuesta a estímulos específicos y no específicos, lo cual podría ser sólo un marcador de que la respuesta inmune es vigorosa y capaz de controlar la infección, y también explicaría la presencia de altos niveles de quimiocinas reportados en individuos VIH+ asintomáticos y en los macacos inmunizados. Además el estado clínico debería correlacionar con la expresión de una amplia variedad, más allá de RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ . Este claramente no es el caso, ya que solo MIP-1 $\beta$  correlaciona con mejores perfiles clínicos en estudios transversales; mientras que otras quimiocinas como MCP-1 no están consistentemente correlacionadas<sup>591-593</sup>. En este sentido, es particularmente notable que MIP-1 $\beta$  es la única  $\beta$ -quimiocina que sólo se une a CCR5 y entonces no puede unirse al receptor sin bloquear la infección por el VIH.

Entonces, el patrón de quimiocinas supresoras del VIH parece reflejar un fenómeno inmune particular en donde los individuos con capacidad innata de hacer altos niveles de quimiocinas pueden montar una respuesta inmune innata capaz de bloquear la infección por el VH. Además, es posible que la expresión de quimiocinas, en el lugar apropiado

y momento correcto, pueda proveer una forma nueva de inmunidad innata vía reducción del co-receptor inducida por el ligando.

En resumen, varios estudios subrayan la capacidad de las quimiocinas y sus receptores de afectar la replicación del VIH; baja expresión del co-receptor sobre las célula diana y niveles de quimiocinas elevados favorecen la reducción de la replicación del virus o aún protección contra la infección<sup>574,582,594</sup>. Sin embargo, algunos reportes indican que niveles altos de  $\beta$ -quimiocinas realzan la infectividad *in vitro* del virus o están asociados con una progresión más rápida de la enfermedad<sup>595,596</sup>.

Otra de las quimiocinas asociada con la infección VIH/SIDA es el SDF-1, se trata de un miembro de la familia de las  $\alpha$ -quimiocinas, tiene una potente actividad quimioattractante sobre células T, monocitos y células hematopoyéticas progenitoras<sup>597,598</sup>. El SDF-1 es una quimiocina potente producida por células estromales, mesoteliales y endoteliales El SDF-1 es el principal ligando para el receptor CXCR4 y bloquea la infección con cepas VIH X4<sup>543,544</sup>. La aparición de esta variante del VIH generalmente precede a la caída precipitosa de las células T CD4+, lo cual sugiere que estos virus podrían contribuir a la deplección de células T<sup>599,600</sup>.

Varios estudios han mostrado que el SDF-1 es capaz de disminuir la expresión de CXCR4 en las células por inducción de endocitosis, bloqueando efectivamente la infección por cepas X4 pero no R5 del VIH<sup>506,520,543,544,600</sup>.

### 1.13. VARIANTES GENÉTICAS EN LAS QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES.

El hallazgo que dos receptores de quimiocinas (CXCR4 y CCR5), son usados junto con la molécula de CD4, por el VIH como principales co-receptores de entrada a la célula diana<sup>28,29,506,509</sup>, condujo al descubrimiento que polimorfismos genéticos en esos genes del huésped podrían afectar la susceptibilidad a la infección por el VIH o a la tasa de progresión a enfermedad una vez establecida la infección.

Afortunadamente varias cohortes relativamente grandes, bien caracterizadas y bien manejadas, de seroconvertidores fueron seguidas desde los primeros años de la epidemia por el VIH, ésto ha permitido identificar y correlacionar los polimorfismos genéticos de las quimiocinas y sus receptores con tasas retardadas de progresión de enfermedad. Cuatro variantes funcionales, CCR5- $\Delta$ 32, CCR5-P1, CCR2-V64I y SDF1-3'A, han mostrado tener un papel regulador en la infección por el VIH, en tasa de progresión a SIDA o en ambas. TABLA. 19.

**TABLA 19. GENES DE QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES Y SIDA**<sup>436,466,601</sup>.

Gen	Alelo	Modo	Efecto
1) CCR5	$\Delta$ 32	Recesivo	Previene infección
CCR5	$\Delta$ 32	Dominante	Previene linfoma
CCR5	$\Delta$ 32	Dominante	Retarda SIDA
2) CCR5P	P1	Recesivo	Acelera SIDA
3) CCR2	64	Dominate	Retarda SIDA
4) SDF-1	3'A	Recesivo	Retarda SIDA

### 1.13.1 ALELO CCR5-Δ32 .

La comprensión que CCR5 es el factor molecular que media la entrada de las variantes principalmente transmitidas, R5; condujo a enfocar la investigación en este co-receptor como posible determinante de transmisión. La evidencia definitiva llega del descubrimiento de un alelo mutado de CCR5 llamado CCR5-Δ32 y su asociación con resistencia a infección por el VIH.

El polimorfismo CCR5-Δ32 es el mejor caracterizado y fue descubierto independientemente por varios grupos usando diferentes métodos<sup>100,553,554,602</sup>. Se trata de la delección de 32 pares de bases (bp) en la región codificante del gen estructural CCR5 y que resulta en una proteína más corta, el producto proteico no es expresado en la superficie celular en individuos homocigotos (CCR5-Δ32/Δ32) para la delección<sup>553,554,603</sup>.

Los individuos con la variante heterocigota CCR5+/Δ32, tienen niveles reducidos del receptor CCR5 en la superficie de sus células, notablemente superiores a la reducción del 50% esperada por el efecto dosis-gen<sup>552,603,604</sup>. La reducción media en heterocigotos a 20-30% del nivel normal es debido, quizás, a que los polipépticos CCR5-Δ32 nacientes dimerizan en el retículo endoplásmico con su contraparte normal, retardando el transporte de CCR5 a la superficie celular<sup>603</sup>.

#### 1.13.1.1 HOMOCIGOCIA CCR5-Δ32 Y RESISTENCIA AL VIH.

El primer reporte de la delección CCR5-Δ32 describe la mutación en forma homocigota en dos hombres homosexuales ENI<sup>553</sup>. Así, genotipo el CCR5-Δ32/Δ32 se encontró significativamente más alto en varias cohortes de



individuos ENI y muchos de ellos con susceptibilidad disminuida a la infección por cepas R5 del VIH-1, aunque pueden ser infectados por cepas X4<sup>100,553,554,602,605</sup>, probablemente porque el virus supera el requerimiento de CCR5 y utiliza CXCR4 para entrar a la célula<sup>42,606,607</sup>. Mientras que en varios miles de individuos VIH-positivos no se encontraron homocigotos para esta delección. Sin embargo, existen reportes, aunque raros, de individuos infectados por el VIH con homocigocia para CCR5-Δ32<sup>42,606-608</sup>. Liu *et al*<sup>553</sup> encontraron que PBMC de individuos ENI homocigotos para el alelo Δ32, replican menos eficientemente el virus. Paxton *et al*<sup>528</sup>, mostraron que las células CD4+ de individuos ENI presentan niveles bajos de replicación de cepas R5 del VIH, son más sensibles a los efectos inhibitorios de β-quimiocinas recombinantes *in vitro*, secretan niveles más elevados de RANTES y expresan niveles reducidos de CCR5 en la superficie celular.

#### 1.13.1.2 HETEROCIGOCIA CCR5-Δ32 Y RESISTENCIA A VIH.

A pesar del papel inequívoco del efecto protector de CCR5-Δ32 en homocigotos, con pocas excepciones<sup>554,609</sup>, estudios de transmisión del VIH en homosexuales, heterosexuales, madre-hijo, receptores de sangre o productos contaminados<sup>100,261,555,556,602,610,611</sup>, han mostrado que personas con genotipo CCR5+/Δ32, no son menos susceptibles a la infección por el VIH<sup>528</sup>.

### 1.13.1.3 HETEROCIGOCIA CCR5-Δ32 Y PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD POR VIH.

Pocos homocigotos Δ32 han sido encontrados entre individuos infectados por el VIH para poder analizar el efecto de este genotipo sobre la progresión de enfermedad.

Datos contradictorios sugieren que; los individuos heterocigotos para esta delección tienen alguna ventaja sobre los homocigotos o normales, presentando una progresión retardada de enfermedad o de muerte que individuos sin alelo(s) CCR5-Δ32<sup>101,602,612-616</sup>; sugiriendo que la expresión de CCR5 puede estar alterada en ellos, y que ésto afecta la replicación *in vivo*. Los heterocigotos tienen cargas virales más bajas, tienen tasas más bajas de disminución de células CD4 tienen un periodo de vida mas prolongado que los individuos CCR5+/+<sup>100,555,602</sup>.

Mientras que por otro lado, existen estudios que muestran que individuos con heterocigocia presentan progresión acelerada a SIDA y/o muerte, una vez que se presentaron los criterios definitorios de SIDA, sugiriendo un efecto dual del alelo CCR5-Δ32<sup>617</sup>.

En algunas cohortes de LNTP se ha reportado un aumento del 50% en la frecuencia relativa del genotipo CCR5+/Δ32 en comparación con otras poblaciones de individuos infectados por el VIH y normales. En el estudio de Dean *et al*<sup>100</sup>, la frecuencia de heterocigocia fue significativamente más grande en LNTP que en progresores y PR. Aunque existe una débil correlación entre el genotipo heterocigoto y progresión retardada a enfermedad, no necesariamente todos los individuos CCR5+/Δ32 serán LNTP<sup>115</sup>.

Estos hallazgos genéticos epidemiológicos son bastante importantes porque reafirman la noción que la entrada del VIH a través de CCR5 puede ser limitada también en pacientes con una sola copia del gen normal.

Dado que los niveles de CCR5 entre individuos CCR5+/ $\Delta$ 32 y CCR5+/+ son muy similares, podría suceder que otros mecanismos aparte del estado  $\Delta$ 32, son responsables de su expresión; los niveles de expresión de CCR5 pueden limitar la replicación de cepas R5 *in vitro*, sugiriendo que aquellos individuos con un fenotipo de baja expresión de CCR5 mantendrán cuentas de células T CD4+ más estables y un mejor estado clínico que aquellos con un fenotipo de alta expresión<sup>115</sup>.

Se han identificado otros polimorfismo en el gen CCR5<sup>618</sup>; se trata de una sustitución puntual (T  $\rightarrow$  A) en la posición m303 (CCR5 m303), que codifica una proteína truncada y que cuando se encuentra junto con la delección CCR5- $\Delta$ 32, produce un fenotipo de resistencia a cepas VIH primarias *in vitro*<sup>619,620</sup>.

#### **1.13.2 ALELOS DEL PROMOTOR DE CCR5.**

También se han identificado polimorfismos en la región promotora o reguladora de CCR5 que podrían afectar la transmisión del VIH o la progresión de enfermedad; posiblemente a través de efectos sobre los niveles de expresión de CCR5<sup>621,622</sup>.

#### **1.13.2 POLIMORFISMO CCR5 59029 G/A.**

Se trata de un cambio (G vs A) en el par de bases 59029 en el promotor de CCR5. Ningún alelo puede ser considerado normal ya que ambos son muy comunes en todos los grupos raciales; el alelo G se encuentra, dependiendo de la raza, entre 43 y 68%<sup>623</sup>. También se sabe que todos los

cromosomas que tengan el alelo CCR5-Δ32 o CCR2V64I también tienen 59029-A, aunque muchos cromosomas lleven 59029-A carecen tanto del alelo CCR5-Δ32 o CCR2V64I.

Las personas infectadas por el VIH, seleccionadas por ausencia de CCR5-Δ-32 y CCR2V64I, con homocigocia para el alelo 59029-G (G/G), en la región promotora de CCR5 podrían progresar a SIDA más lentamente que aquellas que son homocigotas para el alelo 59029-A (A/A)<sup>623</sup>; sugiriéndose que los individuos 59029g/G podrían tener transcripción disminuida del gen CCR5 y por lo tanto niveles disminuidos de la expresión de CCR5, aunque esto no ha sido demostrado directamente<sup>621</sup>.

#### **1.13.2.1 POLIMORFISMO CCR5-59356-T.**

Muchos otros polimorfismos del promotor de CCR5 han sido encontrados, como la homocigocia para CCR5-59356-T, que ha sido asociada con tasas aumentadas de transmisión perinatal de VIH<sup>624</sup>.

#### **1.13.3 ALELO CCR2V64I.**

El polimorfismo CCR2-641<sup>101</sup>, causa un cambio de aminoácido, valina a isoleucina, en la posición 64 en el primer dominio transmembrana de CCR2, una región con secuencia de aminoácidos idéntica a CCR5. La frecuencia del alelo CCR2V64I es de 10-25% de personas blancas y negras y en otros grupos étnicos estudiados.

Aunque CCR2V64I resulta en niveles normales de expresión del receptor CCR2, no está asociada con disfuncionalidad del mismo; parece no tener efecto sobre la susceptibilidad y/o transmisión de la infección<sup>625</sup>; pero resultados de varios estudios muestran que afecta la progresión de enfermedad por el VIH. Individuos infectados por el VIH que portan el alelo CCR2V64I (homocigocia o heterocigocia), parecen progresar a SIDA o a

muerte más lentamente<sup>261,613,615,626-629</sup>, que los seroconvertidores con genotipo normal; el efecto protector podría involucrar regulación cruzada con otros co-receptores<sup>630,631</sup>. Sin embargo, otros estudios no han confirmado este efecto sobre la progresión de enfermedad<sup>556,632,633</sup>.

Estudios realizados en la cohorte de prostitutas de Kenya mostraron que el 21 - 46% de progresoras lentas presentan el alelo CCRV64I<sup>626</sup>.

Probablemente los alelos CCR5-Δ32 y CCR2V64I estén aumentados en LTNP y reducidos en PR<sup>101,623,628</sup>. Además, los dos alelos parecen ejercer un efecto protector adicional sobre la tasa de progresión en individuos que presentan ambos<sup>101,623</sup>.

#### **1.13.4 ALELO SDF1-3'A.**

Varios estudios genéticos han mostrado que un polimorfismo en el gen SDF-1, podría afectar la progresión a SIDA. Este polimorfismo, llamado SDF1-3'A es un SNP (*single nucleotide polymorphism*) e involucra una mutación G → A en el par de bases 809 en la región no traducida (3'-UTR) del gen y sólo afecta a la molécula SDF-1β. El segundo ligando para CXCR4, llamado SDF-1α, producido por empalme alternativo de un gen SDF-1 común, no contiene este polimorfismo. El alelo SDF1-3'A se encuentra en casi todos los grupos étnicos. TABLA 20<sup>102</sup>. El gen mutado podría aumentar la síntesis de SDF-1; así, por competición, inhibiría las cepas X4<sup>520,543</sup>.

#### **1.13.4.1 HOMOCIGOCIA SDF1-3'A/3'A Y PROGRESIÓN DE ENFERMEDAD POR VIH.**

Los resultados de estudios sobre esta mutación son contradictorios; por un lado la homocigocia (3'A/3'A) para esta mutación se ha asociado con progresión retardada a SIDA<sup>102</sup>, pero no a susceptibilidad disminuida a la infección por el VIH<sup>615,629</sup>, mientras que otros estudios la relacionan con progresión acelerada de la enfermedad y a muerte<sup>261,262,634-636</sup>, replicación viral incrementada<sup>262</sup>, decremento de células T CD4+ en infección avanzada por el VIH<sup>636</sup> o no afectar la progresión a enfermedad<sup>615</sup>. Ningún estudio encontró una tasa alterada de progresión de enfermedad en heterocigotos (SDF1+/3'A).

#### **1.13.4.2 HETEROCIGOCIA SDF1-3'A Y RESISTENCIA A INFECCIÓN POR VIH**

Sólo un estudio reportó un incremento significativo de la variante SDF+/3'A en un grupo de individuos ENI de la cohorte MACS<sup>102</sup>, sugiriendo un efecto protector de infección inicial; aunque la frecuencia de 3'A/3'A en este grupo no fue reportada.

Hallazgos recientes<sup>637</sup> sugieren que el riesgo para la infección por el VIH y progresión a SIDA también pueden estar influenciados por polimorfismo en el promotor de la quimiocina RANTES; este reporte ha mostrado que una mutación en un solo nucleótido en posición 403 del gen promotor, conocida como -403A, duplica la susceptibilidad a la infección por el VIH.

**TABLA 20. FRECUENCIAS DE LOS ALELOS DE QUIMIOCINAS Y SUS RECEPTORES**<sup>102,626,638-640</sup>

GEN/ALELO		CAUCÁSICOS EUROPEOS	ASIÁTICOS	AFRICANOS
CCR5	+	0.86 – 0.96	1.0	1.0
	Δ32	0.044 – 0.14	0.0	0.0
CCR5P	P1	0.56	0.44	
	P2	0.09	0.23	
	P3	0.14	0.15	
	P4	0.35		
CCR2	+	0.90	0.75	0.77
	641	0.10	0.25	0.23
SDF-1	+	0.79	0.74	0.98
	3'A	0.21	0.23	0.02

## 2. HIPÓTESIS



## **2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

La importancia de estudiar los factores protectivos del huésped como una posible vía para descubrir nuevas estrategias terapéuticas, viene enfatizada por el hecho de que contrariamente a las grandes expectativas generadas en 1996 cuando fue disponible, ahora está claro que la terapia anti-retroviral potente, a pesar de su gran eficacia para suprimir la replicación vírica y mejorar el estado inmunitario de los pacientes, es incapaz de erradicar la infección por el VIH y de permitir la generación y/o reforzamiento de una respuesta protectora de células T anti-VIH, que luego pueda controlar la infección una vez suspendida dicha terapia, tal como ocurre en otras infecciones crónicas por patógenos intracelulares como por ejemplo la tuberculosis o la infección por citomegalovirus. Por tanto, actualmente se cree esencial investigar nuevas estrategias terapéuticas encaminadas a conseguir una “remisión” o control de la replicación vírica tal como se cree ocurre en los LTNP, lo que podría conseguirse combinando la terapia antirretroviral con: a) intervenciones encaminadas a inducir/potenciar la inmunidad anti-VIH protectora capaz de mantener bajo control la replicación vírica como se cree que ocurre en los LTNP que controlan la viremia espontáneamente; b) nuevas formas de medicamentos que actúen inhibiendo la infección y replicación vírica basadas en explotar los productos que fisiológicamente lo consiguen como sería el caso de quimiocinas farmacológicamente modificadas para bloquear la infección/transcripción pero desprovistas de otros efectos indeseables, o anticuerpos monoclonales humanos neutralizantes. Para el desarrollo de

tales estrategias es esencial conocer los factores del huésped que conceden resistencia a la infección y a la progresión de la misma.

Hay factores del huésped capaces de conferir protección contra la infección por el VIH-1 y contra la progresión de la misma. Los individuos “expuestos no infectados” (ENI) y los infectados “no progresores de larga duración” (LTNP) son modelos excelentes para el estudio de dichos factores, una línea de investigación que se considera prioritaria porque puede desvelar claves esenciales para comprender la patogenia de la infección, y, por tanto, para desarrollar nuevas estrategias preventivas (vacuna) y terapéuticas. Dichos factores pueden ser de dos grandes tipos:

- 1) relativos a la expresión de receptores de quimiocinas que el VIH utiliza como co-receptores y a la producción de quimiocinas que se unen a dichos receptores y que inhiben la infección y
- 2) relacionados con la eficacia de la respuesta inmune anti-VIH tanto la mediada por células T, como la de anticuerpos anti-VIH neutralizantes.

En este contexto, el estudio concreto a realizar estuvo dirigido por la hipótesis de trabajo que se resume en los siguientes postulados:

- a) Existen factores genéticos tanto en LTNP como en ENI, que determinarían una alta secreción de quimiocinas inhibitoras de las cepas R5, así como una baja expresión de su co-receptor CCR5, lo que actuaría impidiendo la infección y su progresión.
- b) Dado que la progresión hacia SIDA probablemente viene determinada por el cambio de fenotipo R5 a X4, la no progresión sostenida implica también la existencia, en los LTNP, de mecanismos para controlar o frenar

la aparición de cepas X4, lo que podría consistir en una baja expresión de CXCR4 y/o alta producción de SDF-1.

## **3. OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL.**

Analizar los factores inmunitarios y/o genéticos del huésped implicados en conceder resistencia a la infección por el VIH-1 y a la no progresión de la misma hacia SIDA en: A) individuos expuestos no infectados (ENI), así como en B) pacientes con infección crónica por VIH, con criterios de no progresión a largo plazo (LTNP).

#### **3. 2 OBJETIVOS CONCRETOS.**

Dentro de este contexto, y de acuerdo con la hipótesis de trabajo enunciada, los objetivos concretos del proyecto son:

##### **3.2.1 ANALIZAR LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A LA INFECCIÓN POR VIH.**

- a) Expresión fenotípica en linfocitos T, del receptor de quimiocinas CCR5, utilizado como co-receptor de entrada a las células diana, por cepas VIH-R5.
- b) Polimorfismo CCR5- $\Delta$ 32, que podría determinar el grado de expresión de CCR5 en las células T.
- c) Niveles plasmáticos de las quimiocinas que se unen a CCR5 (MIP-1 $\alpha$ , RANTES y MIP-1 $\beta$ ), y que actúan bloqueando la infección por las cepas R5.

##### **3.2.2 ANALIZAR LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA NO PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH HACIA SIDA.**

- a) Expresión del receptor de quimiocinas CXCR4 en linfocitos T, utilizado como co-receptor de entrada a la células diana por variantes X4 del VIH-1.
- b) Mutación SDF1-3'A, la cual podría estar relacionada con una mayor producción de la quimiocina.

c) Niveles plasmáticos de la quimiocina SDF-1, la cual se une a CXCR4, controlando de esta forma la emergencia de cepas X4 del VIH.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **4.1 PACIENTES.**

Para su estudio, la cohorte de 309 sujetos se dividió en tres grupos:

**A) GRUPO CONTROL (GC).**- Formado por 90 donantes voluntarios sanos, del Banco de Sangre de Hospital Clínic i Universitari de Barcelona.

**B) ENI.**- En el que se incluyeron 65 individuos expuestos al VIH-1, no infectados. Este grupo fue dividido, con base en la vía de exposición al virus en:

1) ENI<sub>SEX</sub>.- Subgrupo constituido por 34 personas con antecedentes de prácticas sexuales de alto riesgo para la infección por el VIH-1 y que permanecen seronegativos; individuos que provienen de la cohorte de no infectados de la Unidad de SIDA del Hospital Clínic i Universitari de Barcelona, y del Centro Médico Sandoval de Madrid, Esp, éste último especializado en enfermedades de transmisión sexual.

2) ENI<sub>HM</sub>.- En este subgrupo se incluyeron 31 pacientes hemofílicos expuestos, entre 1980 y 1985, a hemoderivados provenientes de sangre contaminada con el VIH. Este grupo de pacientes pertenece a la cohorte de hemofílicos de la Unidad de Coagulopatías del Servicio de Hematología del Hospital La Fe de Valencia, Esp.

**C) VIH+.**- 154 pacientes con infección crónica por VIH, el cual también fue dividido en dos subgrupos:

1) LTNP.- Se trata de individuos quienes cumplen criterios de no progresores a largo plazo; permanecen asintomáticos y con cifras estables de células T CD4+ ( $\geq 500/\text{mm}^3$ ) desde hace más de 8-10 años y sin



tratamiento anti-retroviral. Son de pacientes tanto del Hospital Clínic de Barcelona como del Centro Médico Sandoval de Madrid.

2) NP.- En este otro subgrupo de pacientes VIH+, se incluyeron 75 normo-progresores, cuyas células CD4 han descendido a menos de 200/mm<sup>3</sup> a los dos años de la primoinfección. Se trata de pacientes tanto del Hospital La Fe (Valencia) como del Hospital Clínic de Barcelona.

## **4.2 MÉTODOS.**

### **4.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PLASMA DE SANGRE TOTAL.**

Las muestras de los pacientes fueron colectadas bajo consentimiento informado. La sangre se recolectó en tubos Vacutainer de 4.5 ml con EDTA (ethylenediamine tetra-acetic acid) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). El plasma libre de células fue aislado por centrifugación a 1500 rpm por 10 min. Las muestras de plasma fueron divididas en alicuotas de 1,5 ml y almacenadas a -70°C hasta su procesamiento. Antes de su análisis las muestras de plasma fueron descongeladas a temperatura ambiente.

### **4.2.2 OBTENCIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA.**

Para la obtención de PBMC, la muestra fue procesada mediante centrifugación en gradiente de densidad con ficoll-hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden), lavadas dos veces con medio RPMI-1640 y criopreservadas con 90% FCS (*fetal calf serum*) más 10% de DMSO (dimetilsulfóxido) y mantenidas, primero a -70°C y después en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

Para el estudio de las subpoblaciones de células T, las PBMC fueron descongeladas con medio RPMI-1640 y 20% de FCS.

#### 4.2.3 DETERMINACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T.

El inmunofenotipado se realizó mediante citometría de flujo usando tres fluorocromos. El marcaje se hizo con anticuerpos monoclonales (Becton-Dickinson, Mountain View, California, USA), conjugados con *peridinyl chlorophyll-A protein* (PerCP), *phycoerythrin* (PE) ó *fluorescein isothiocyanate* (FITC), en alícuotas que contenían 100 000 células; los anticuerpos monoclonales empleados fueron: CD3-PerCP, CD4-PE, CD8-FITC, CD4-PerCP, CD8-PerCP, C38-PE, CD28-PE, CD45RA-FITC, CD45RO-PE. Como control negativo se utilizó inmunoglobulina de ratón conjugada con PE, FITC y PerCP. Se analizaron un mínimo de 5000 células usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San José, California, USA), con *software* LYSYS.

Las células T activadas tanto CD4+ como CD8+ se cuantificaron mediante la expresión del marcador CD38.

#### 4.2.4 EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOKINAS.

La expresión de CCR5 y CXCR4 en células T CD4+ y CD8+ fue estudiada por análisis por citometría de flujo. Los anticuerpos monoclonales usados fueron anti-CD3 PerCP, anti-CD4 PerCP, anti-CD8 PerCP, anti-CXCR4 PE y anti-CCR5 FITC (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Para cada muestra, se analizaron 10,000 eventos en un citómetro de flujo (FACScalibur, Becton Dickinson). Para el estudio de estos co-receptores de entrada del VIH la cohorte estuvo constituida por 249 individuos. El GC tuvo 41 integrantes; el grupo ENI 63, de los cuales 32 fueron ENI<sub>SX</sub> y 31 ENI<sub>HM</sub> y el grupo VIH+ tuvo 81 LTNP y 64 en el grupo NP.

#### 4.2.5 DETECCIÓN DEL ALELO $\Delta 32$ EN EL GEN CCR5.

La PCR para la detección de la delección  $\Delta 32$  del gen CCR5 se realizó a partir de 100 ng de DNA genómico, extraído de  $2 \times 10^6$  PBMC siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAamp, Qiagen, Hilden, Germany), y almacenado a  $-20^\circ\text{C}$ . Se amplificó con 0.5 unidades de Taq Polimerasa (Expand <sup>tm</sup> High Fidelity PCR system, Boehringer Mannheim, Ottweiler, Alemania), utilizando los siguientes “primers”: CCR5 Back (5' a 3'): GAA GTT CCT CAT TAC ACC TGC AGC TCT C, y CCR5 Forward (5' a 3'): CTT CTT CTC ATT TCG ACA CCG AAG CAG AG. Las condiciones de la PCR son;  $95^\circ\text{C}$ , 5 min;  $94^\circ\text{C}$ , 45 seg;  $55^\circ\text{C}$ , 45 seg;  $72^\circ\text{C}$ , 45 seg por 5 ciclos;  $94^\circ\text{C}$  45 seg;  $62^\circ\text{C}$ , 45 seg,  $72^\circ\text{C}$ , 30 seg por 35 ciclos. El producto se analiza en un gel de agarosa al 2%, y el DNA se tiñó con bromuro de etidio. Los patrones electroforéticos son: el tipo salvaje (CCR5+/+), caracterizado por una banda de 189 pb; el heterocigoto (CCR5+/ $\Delta 32$ ), con dos bandas una de 189 pb y la segunda de 157 pb (FIGURA 6), y por último, el homocigoto deleccionado (CCR5 $\Delta 32$ / $\Delta 32$ ) con una banda de 157 pb<sup>552</sup>.

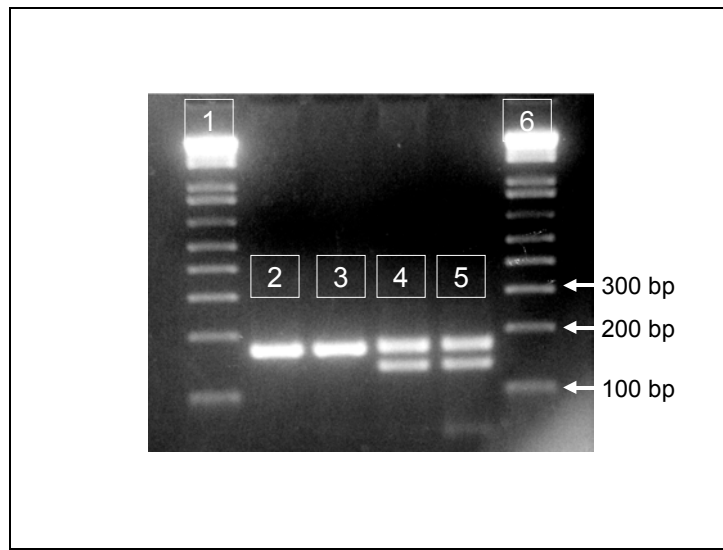
#### 4.2.6 DETERMINACIÓN DE $\beta$ -QUIMIOCINAS EN PLASMA.

Para la cuantificación de los niveles plasmáticos de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES se utilizó el plasma obtenido de la muestra sanguínea y almacenado a  $-70^\circ\text{C}$ , el cual se descongeló a temperatura ambiente empleándose también la técnica de ELISA, previamente estandarizada en nuestro laboratorio; tanto las muestras de plasma como los estándares para la curva de calibración se ensayaron por duplicado. Los estándares de proteínas recombinantes humanas (RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) y la

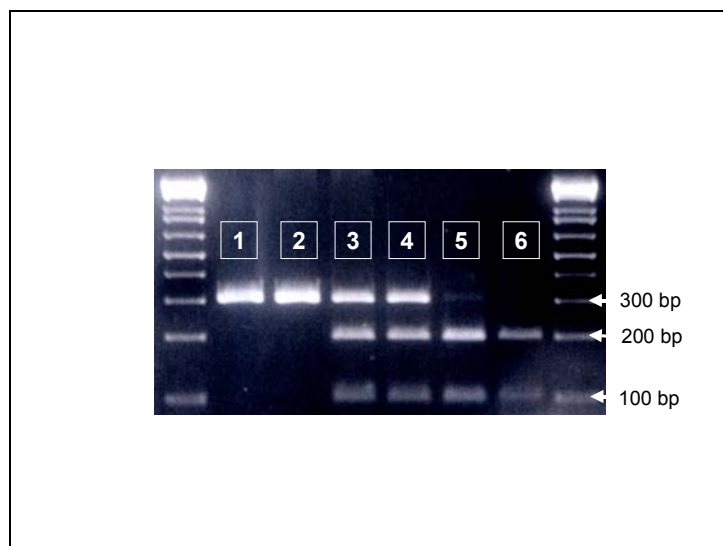
combinación de anticuerpos de captura y detección para el ELISA de las tres  $\beta$ -quimiocinas se desarrolló utilizando reactivos de R&D Systems (Minneapolis, USA). Se usaron placas para ELISA (MaxiSorb Elisa plates de Nunc<sup>tm</sup> Brand Products, Denmark).

#### 4.2.7 DETECCIÓN DEL POLIMORFISMO SDF1-3'A.

La mutación en la posición 801 G→A de la región 3' no traducida (SDF1-3'A) del gen SDF1, ligando natural de CXCR4. Se amplifica utilizando 100 ng de DNA genómico y 0.5 unidades de Taq Polimerasa (Expand<sup>tm</sup> High Fidelity PCR system, Boehringer Mannheim, Ottweiler, Alemania) y los "primers", SDF-1B forward (5' a 3') CAG TCA ACC TGG GCA AAG CC y SDF-2B back (5' a 3') AGG TTT GGT CCT GAG AGT CC. Las condiciones de PCR son; 95°C 5 minutos, 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 1 minuto y 30 ciclos. El producto se separa en agarosa al 2% y se tiñe con Bromuro de etidio. Se purifica el producto con Kit QIAgen de Purificación (QUIAGEN GmbH Hilden, Alemania). 30  $\mu$ l del producto es digerido con unidades de MspI a 37° durante 2h. Los patrones de electroforesis son: *wild type*, con dos bandas una de 201 pb y otra de 100 pb; heterocigoto; con tres bandas, una de 301 pb, otra de 201 pb y otra de 100 pb y homocigoto mutado, con una banda de 301 pb (FIGURA 7).



**FIGURA 6.** Las Líneas 1 y 6 contienen el marcador de , las muestras 2 y 3 son de genotipo CCR5+/+ y las líneas 4 y 5, CCR5+/Δ32.



**FIGURA 7.** Las líneas laterales contienen el marcador de peso molecular; los carriles 1 y 2 muestras con genotipo homocigoto mutado (SDF1-3'A/3'A); 3 y 4, heterocigoto (SDF1+/3'A) y 5 y 6, *wild type* (SDF1+/+).

#### 4.2.8 DETERMINACIÓN DE SDF-1 EN PLASMA.

La cuantificación de SDF-1 en plasma se hizo mediante la técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). A partir de la proteína rhSDF-1 $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, USA), en concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  se generó una curva estándar; la proteína fue diluida 1:250 en PBS más 0.1% de BSA ; y a partir de ella se hicieron diluciones 1:2 para generar una curva estándar de 61.5 – 2000 ng/ml. En placas para ELISA (MaxiSorb Elisa plates de Nunc<sup>tm</sup> Brand Products, Denmark) se agregaron 100  $\mu\text{l}$  del anticuerpo de captura (R&D Systems, Minneapolis, USA), a una concentración de 2  $\mu\text{g/ml}$  en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a pH 9.6 dejando la placa toda la noche a 4°C. Los pocillos fueron lavados 4 veces con 200  $\mu\text{l}$  PBS-0.05% Tween 20. Los sitios de unión no específicos fueron bloqueados agregando 200  $\mu\text{l}$  de PBS-3%BSA y se incubó tres horas a temperatura ambiente; la placa se lavó 6 veces con 200  $\mu\text{l}$  PBS-0.05% Tween 20. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de las diluciones de los estándares y de los plasma, por duplicado, incubando 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó 6 veces con 200  $\mu\text{l}$  PBS-0.05% Tween 20. A cada pocillo se agregaron 100  $\mu\text{l}$  anticuerpo de detección (R&D Systems, Minneapolis, USA), a una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  en PBA-0.1% BSA; la placa se incubó toda la noche a temperatura ambiente. La placa se lavó 6 veces con 200  $\mu\text{l}$  PBS-0.05% Tween 20 y se agregaron 100  $\mu\text{l/pocillo}$  del conjugado estreptavidina-peroxidasa diluida 1:10000 en PBA-0.1% BSA, se incubó una hora a temperatura ambiente. La placa se lavó 6 veces con PBS-0.05% Tween 20, agregaron 100  $\mu\text{l/pocillo}$  del sustrato tetrametil bencidina (TMB), se incubó 30 min a temperatura ambiente y hizo la lectura de la

densidad óptica (DO) en un lector de ELISA a 600 nm, agregar 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2M y se volvió a leer la DO a 450 nm. La concentración de SDF-1 de las muestras se calculó mediante la curva estándar.

#### 4.2.9 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-16.

Se determinó por la técnica de ELISA, previamente estandarizada en nuestro laboratorio. En placas ELISA de 96 pocillos (MaxiSorb Elisa plates de Nunc<sup>™</sup> Brand Products, Denmark), se agregaron 100 µl/pocillo de anticuerpo de captura (Endogen código M-160-E) diluido a 5 µg/ml en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a pH 9,6. La placa se cubrió e incubó toda la noche a 4°C. Se vertió la solución y se secó con papel absorbente. Se agregaron 200 µl/pocillo PBS (*phosphate-buffered saline*)- más 4% de BSA (*bovine serum albumin*) y la placa se cubrió e incubó durante una hora a temperatura ambiente. Se prepararon diluciones de rIL-16 (Endogen, código S-IL 16) con PBS-4% BSA para una curva estándar, de 31.5 - 2000 pg/ml. La placa se lavó tres veces con PBS-0.05% Tween 20. Se agregaron 50 µl de las diluciones del estándar y de los plasmas, por duplicado. La placa se cubrió e incubó una hora a temperatura ambiente. Se vertió el líquido y se secó con papel absorbente. SIN LAVAR LA PLACA, se agregaron 50 µl de anticuerpo de detección (Endogen, código M-161-B) diluido a 0.5 µg/ml en PBS- 4% BSA; la placa se cubrió e incubó una hora a temperatura ambiente. Se lavó la placa tres veces con PBS-0.05% Tween 20. Se agregaron 100 µl/pocillo del conjugado estreptavidina-peroxidasa, diluido 1:10000 en PBS-4% BSA. La placa se cubrió e incubó 30 min a temperatura ambiente. Se lavó la placa tres veces con PBS-0.05% Tween 20. Se agregaron 100 µl/pocillo de TMB (tetrametilbencidina), incubando 30

min a temperatura ambiente. Medir la absorbancia a 600 nm. Agregar 100  $\mu$ l/pocillo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.2M. Leer la absorbancia a 450 nm.



### **4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

#### **4.3.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.**

**PROPORCIONES.-** Para las subpoblaciones de células T, variantes genotípicas CCR5- $\Delta$ 32 y SDF1-3'A

**CONCENTRACIONES.-** El cálculo de las concentraciones de las citocinas se hizo según una curva estándar. La medición de las  $\beta$ -quimiocinas (RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ) se hizo en pg/ml, con límites de sensibilidad para: MIP-1 $\beta$ , 0.0 a 1798.5; RANTES 0.0 a 3039.0 pg/ml y, para MIP-1 $\alpha$ , 0.0 a 1919.7. La quimiocina SDF-1 se midió en ng/ml, cuyos límites de sensibilidad fueron 0.0 – 238.6 ng/ml. La interleucina-16 se midió en pg/ml y sus límites de sensibilidad estuvieron en 102.3 – 7382.2 pg/ml.

Los resultados se expresan en mediana y rango intercuartílico (IQR: interquartile range).

#### **4.3.2 ESTADÍSTICA INFERENCIAL.**

**COMPARACIÓN.-** Las distribuciones tanto de los porcentajes de las subpoblaciones de células T en los diferentes grupos de estudio como de las concentraciones de RANTES, MIP-1 $\alpha$  , MIP-1 $\beta$ , SDF-1, IL-16 se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando se hicieron comparaciones múltiples se utilizó el ajuste de Bonferroni.

La dependencia entre las variantes genotípicas y la resistencia y/o progresión de la infección por el VIH se hizo mediante el cálculo del Odds ratio (OR).

Se considera significación estadística cuando  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

## 5 RESULTADOS.

### 5.1 SUBPOBLACIONES CELULARES.

Para el estudio de las subpoblaciones de células T se incluyeron voluntarios sanos (GC), 62 individuos ENI; 31 ENI<sub>HM</sub> y 31 ENI<sub>SX</sub>, 73 pacientes componen el grupo LTNP y 64 son pacientes normo-progresores (NP) de la infección por el VIH.

#### LINFOCITOS T CD4+ y T CD8+.

Los individuos infectados por el VIH presentaron porcentajes significativamente menores de células T CD4+ (mediana=26.5%) *versus* los grupos control y ENI (medianas de 38.6% y 39.2%, respectivamente y con valores de  $p < 0.05$ ). Los subgrupos ENI<sub>HM</sub> y ENI<sub>SX</sub> no presentaron diferencias entre sí, en esta subpoblación celular. Mientras que el subgrupo NP presentó valores significativamente menores de células T CD4+ que el grupo LTNP ( $=0.0001$ ). Con respecto al porcentaje de células CD8+, encontramos que el grupo VIH+ presentó valores muy elevados (mediana=45.6%) al compararlo tanto con el grupo control (mediana=25.9%) como con el grupo ENI (mediana=26.7%), y este incremento es estadísticamente significativo con ambos grupos (con  $p < 0.05$  y  $p < 0.001$ , respectivamente). Cabe hacer notar que no hay diferencias entre ENI<sub>HM</sub> y ENI<sub>SX</sub>,  $p = 0.57$ ; tampoco las hay entre LTNP y NP,  $p = 0.39$ . (Ver TABLAS 21 y 22, y FIGURA 8 y 9).

Cuando analizamos la relación CD4/CD8 en los grupos de estudio vemos que ésta se encuentra invertida en el grupo VIH+, el cual presenta una mediana de 0.59, significativamente disminuida con respecto tanto al grupo control (1.49) como al grupo ENI (1.35). Por otro lado, la mediana de

la relación CD4/CD8 del subgrupo NP es muy inferior ( $p=0.018$ ) al grupo LTNP.

**TABLA 21. NIVELES DE CÉLULAS T CD4+ EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

GRUPO	%	IQR	MÍN - MÁX
	MEDIANA	25% - 75%	
CONTROL	38.6	31.0 - 61.0	21.0 – 71.0
ENI	39.2	32.8 – 45.2	12.9 – 70.1
ENI <sub>SX</sub>	39.0	32.5 – 44.8	12.9 – 55.1
ENI <sub>HM</sub>	39.2	32.8 – 45.2	24.3 - 70.1
VIH+	26.5	19.8 – 33.8	1.7 – 47.9
LTNP	27.7	21.7 – 35.2	3.6 – 47.9
NP	19.5	14.8 – 28.5	1.7 – 38.3

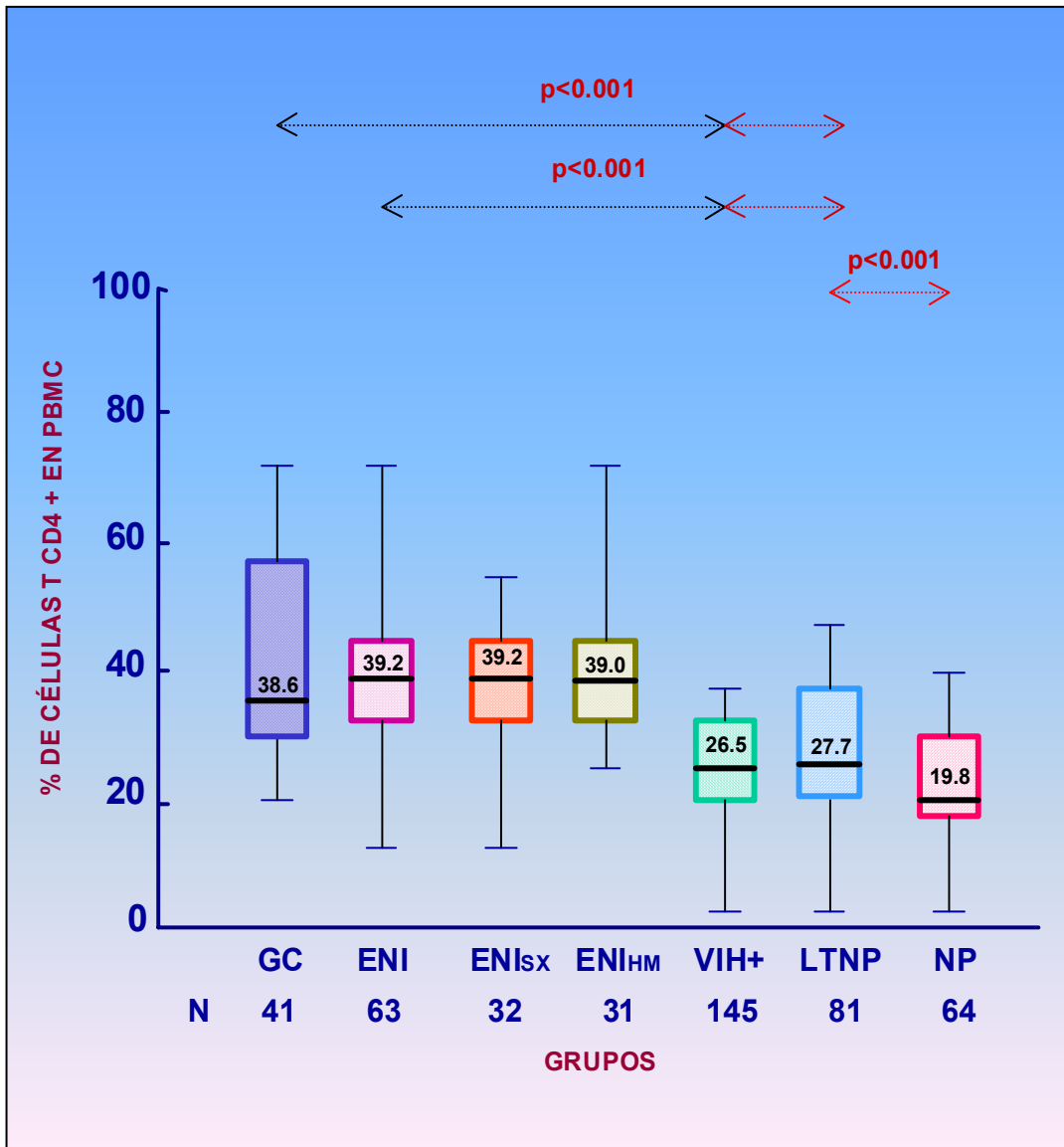
Los subgrupos de pacientes VIH+ tuvieron niveles significativamente menores de células T CD4+ que los grupos control y ENI. Y de éstos, los pacientes del grupo NP, son los que mostraron un mayor deterioro inmunológico.

**TABLA 22. NIVELES DE CÉLULAS T CD8+ EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

GRUPO	%	IQR	MÍN - MÁX
	MEDIANA	25% - 75%	
CONTROL	25.9	18.0 – 34.0	10.0 – 54.0
ENI	26.7	21.9 – 32.9	11.4 – 52.5
ENI <sub>SX</sub>	26.4	21.5 – 29.7	11.4 – 52.5
ENI <sub>HM</sub>	30.0	23.5 – 34.1	11.7 – 49.2
VIH+	45.6	36.8 – 54.8	16.5 – 83.5
LTNP	43.9	35.9 – 56.4	16.5 – 83.5
NP	46.5	41.0 – 53.8	26.9 – 68.1

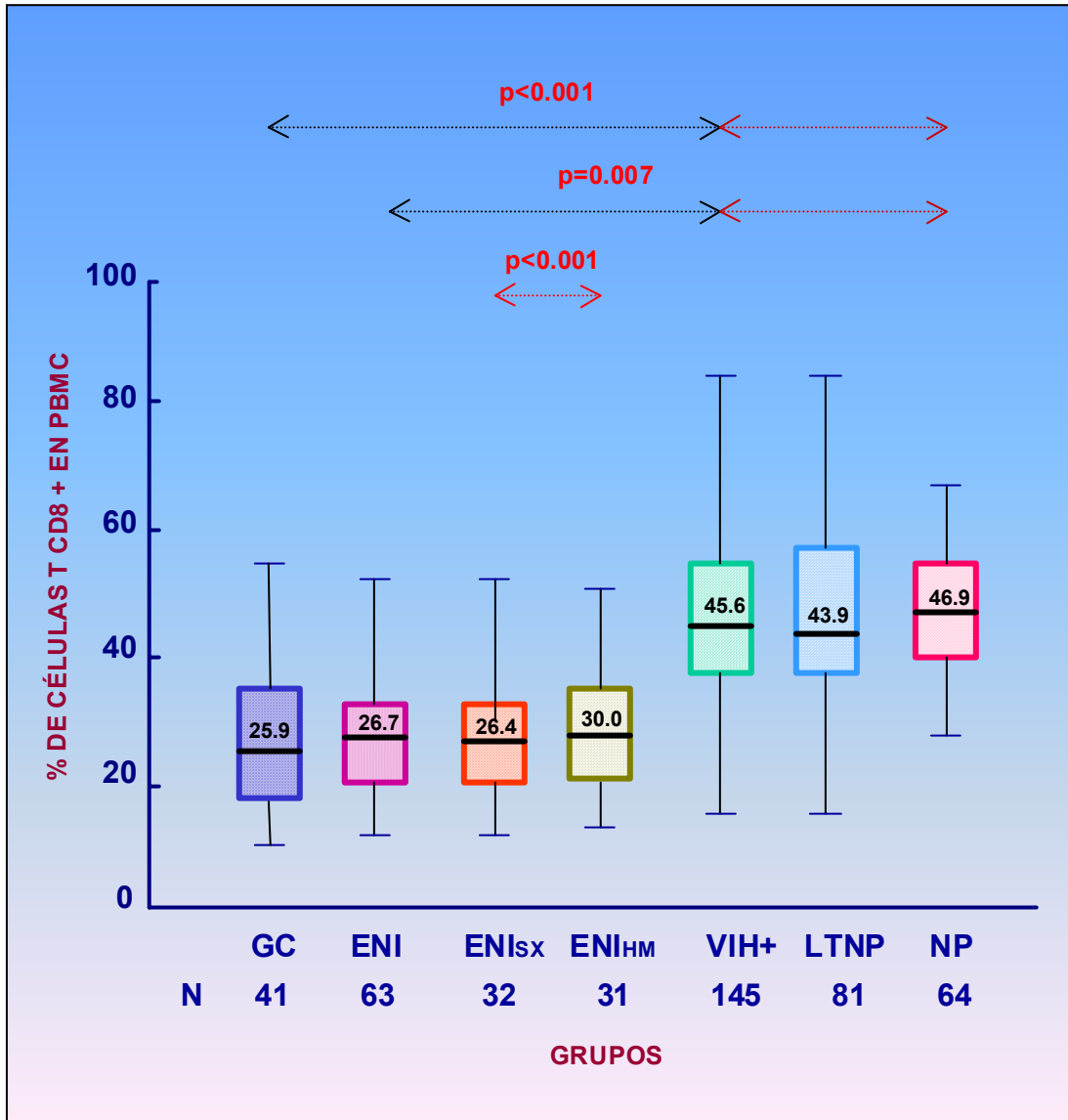
Los pacientes en estado avanzado de la infección por el VIH tuvieron las cifras más altas de células T CD8+.

**FIGURA 8. NIVELES DE LINFOCITOS T CD4+ EN PBMC.**



La línea horizontal representa la mediana, las cajas los valores comprendidos entre los percentiles 25 y 75 y las patillas, los valores mínimo y máximo de la distribución. El grupo de pacientes VIH+, tuvieron los niveles de células T CD4+, por debajo del GC y del ENI ( $p < 0.001$ , en ambos casos). Pero la significancia se dio con el subgrupo NP, marcando su deterioro inmunitario.

**FIGURA 9. NIVELES DE LINFOCITOS T CD8+ EN PBMC.**



La línea horizontal representa la mediana; las cajas los valores comprendidos entre los percentiles 25 y 75 y las patillas, los valores mínimo y máximo de la distribución. Los pacientes VIH+ ( LTNP y NP), tuvieron una significativa expansión de células T CD8+ en PBMC, con respecto a los grupos control y ENI.

La expresión de las isoformas CD45RA y CD45RO de la molécula CD45, fueron utilizadas para definir los fenotipos *naive* (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>) y memoria (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) tanto en las poblaciones de células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>.

**LINFOCITO T NAIVE CD4+CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>.**

Aunque la mediana del porcentaje de células CD4<sup>+</sup>*naive* es más alta en el grupo NP (42.0%) que la de los grupos GC (%), ENI<sub>HM</sub> (36.5%), ENI<sub>SX</sub> (34.8%) y LTNP (36.4%), estos valores no son estadísticamente diferentes ya que los valores de p son superiores a 0.10 en todos los casos. Cabe mencionar que tampoco difieren entre sí las medianas de los grupos LTNP y NP (p=0.54). Ver TABLA 23.

**TABLA 23. NIVELES DE CÉLULAS NAIVE CD4+CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> EN PBMC.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
GC	41.0	30.0 – 52.0	19.0 – 63.0
ENI	35.2	24.7 – 45.4	4.1 – 76.2
ENI <sub>SX</sub>	34.8	25.9 – 42.7	12.1 – 69.6
ENI <sub>HM</sub>	36.5	24.7 – 49.4	4.1 – 76.2
VIH+	39.7	26.3 – 55.7	1.7 – 81.3
LTNP	36.4	26.2 – 54.5	2.3 – 83.2
NP	42.0	26.6 – 5.0	1.7 – 81.3

**No se observaron diferencias en las distribuciones de los porcentajes de células *naive* CD4+CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> entre los grupos de estudio.**

### INFOCITO T *NAIVE* CD8+CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup>.

Los subgrupos de individuos VIH+, LTNP y NP presentaron los valores más bajos de células CD8 *naive* (mediana de 46.6% en ambos casos), que los subgrupos ENI; (mediana de 59.0% para los hemofílicos y 8.1% para los sexuales). Estas diferencias son significativas con valores de  $p < 0.001$  para ENI vs LTNP y  $p = 0.044$  para los valores entre ENI y grupo NP. Los porcentajes de células CD8 *naive* no fueron diferentes entre ENI<sub>HEH</sub> y ENI<sub>SX</sub> ( $p = 0.8$ ); tampoco se hallaron diferencias entre individuos LTNP y NP ( $p = 0.16$ ). Ver TABLA 24.

**TABLA 24 NIVELES DE CÉLULAS *NAIVE* CD8+CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> EN PBMC.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
GC	58.0	43.0 – 73.0	28.0 – 88.0
ENI	58.6	45.8 – 69.8	9.1 – 89.6
ENI <sub>SX</sub>	58.1	49.5 – 67.3	11.5 – 84.4
ENI <sub>HM</sub>	59.0	45.6 – 70.9	9.1 – 89.6
VIH+	49.0*	35.9 – 62.3	11.9 – 90.2
LTNP	46.0	33.3 – 62.7	6.5 – 80.8
NP	46.0	38.9 – 62.1	11.9 – 90.2

\* Los pacientes VIH+ tuvieron niveles de células *NAIVE* CD8+CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> significativamente inferiores que los individuos ENI ( $p < 0.001$ ); mientras que éstos no difieren del GC. No hay diferencia entre ENI<sub>SX</sub> y ENI<sub>HM</sub>, tampoco la hay entre LTNP y NP.



### CÉLULAS MEMORIA CD4+CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>.

Los linfocitos T CD4+ memoria presentaron medianas de porcentajes más altas en los subgrupos ENI<sub>HM</sub> (50.9%) y ENI<sub>SX</sub> (53.3%) que los subgrupos LTNP (37.7%) y NP (39.7%) con valores de  $p < 0.001$  en todos los casos. A pesar de los valores muy parecidos entre los subgrupos de pacientes seropositivos al VIH, no ha diferencias significativas entre sí,  $p = 0.81$ . Tampoco presentaron diferencias en esta subpoblación celular los subgrupos de expuestos no infectados ( $p = 0.87$ ). TABLA 25.

**TABLA 25. NIVELES DE CÉLULAS MEMORIA CD4+CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> EN PBMC.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
GC	39.0	27.0 – 51.0	15.0 – 63.0
ENI	51.6	41.6 – 62.1	8.7 – 85.7
ENI <sub>SX</sub>	53.3	40.4 – 59.5	21.3 – 77.4
ENI <sub>HM</sub>	50.9	42.0 – 62.7	8.7 – 85.7
VIH+	38.8	27.0 – 54.6	4.7 – 84.0
LTNP	37.7	26.2 – 54.6	1.1 – 76.5
NP	39.7	27.1 – 51.8	11.7 – 84.0

Se observó un aumento significativo de células T CD4+ memoria (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) en los individuos ENI respecto a sujetos del GC y a los pacientes VIH+ ( $p < 0.001$ ).

### CÉLULAS MEMORIA CD8+CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>.

La población de células T CD8 memoria fue muy similar entre los diferentes subgrupos, con medianas de % para el GC de 30.4%; para los individuos ENI<sub>HM</sub>, de 29.5% y para los ENI<sub>SX</sub> 36.6% para los LTNP y 31.4 para los NP. Solo se pudo observar una pequeña diferencia entre los subgrupos ENI y los NP (p=0.053), considerándose sólo una tendencia. En esta subpoblación no permitió diferenciar entre individuos LTNP y NP.

TABLA 26.

**TABLA 26. NIVELES DE CÉLULAS MEMORIA CD8+CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> EN PBMC.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
CONTROL	24.0	12.0 – 36.0	2.0 – 48.0
ENI	30.4	19.6 – 37.7	1.7 – 60.6
ENI <sub>SX</sub>	29.5	20.1 – 38.1	1.7 – 60.2
ENI <sub>HM</sub>	30.4	19.4 – 37.3	7.28 – 60.6
VIH+	35.2	22.1 – 47.4	3.5 – 85.4
LTNP	36.6	22.0 – 47.3	3.5 – 77.0
NP	31.4	22.3 – 48.8	4.7 – 85.4

Los pacientes LTNP tuvieron un porcentaje ligeramente superior de células T CD8+ memoria (CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup>) que los ENI con una p=0.055. El resto de las comparaciones no fueron significativas.

#### LINFOCITO TCD4+CD28+.

No se hallaron diferencias en la expresión de células T CD4+CD28+ entre el GC y los grupos ENI y VIH+( $p > 0.2$  en ambos casos). Tampoco se encontraron diferencias entre los subgrupos ENI (ENI<sub>HM</sub> y ENI<sub>SX</sub>,  $p=0.38$ ) y VIH+ (LTNP y NP,  $p=0.24$ ). Ver TABLA 27.

**TABLA 27. NIVELES DE CÉLULAS CD4+CD28+ EN PBMC.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
CONTROL	85.0	80.0 – 90.0	80.0 – 90.0
ENI	95.0	92.4 – 97.2	37.6 – 99.4
ENI <sub>SX</sub>	94.5	91.7 – 96.7	81.9 – 99.2
ENI <sub>HM</sub>	95.8	93.0 – 97.5	37.6 – 99.4
VIH+	93.2	82.9 – 97.6	7.8 – 99.9
LTNP	92.1	80.1 – 97.6	7.8 – 99.9
NP	96.0	86.7 – 97.9	75.2 – 99.6

No han diferencias significativas en las distribuciones de las células T CD8+ que expresan el marcador CD28 (molécula co-estimuladora), entre los grupos de estudio.

#### LINFOCITO TCD8+CD28+.

Los pacientes seropositivos al VIH presentaron niveles de células CD8+CD28+ (mediana=48.7) significativamente menores que los sujetos del grupo control (mediana = 72.0), con  $p < 0.001$  y que los individuos del grupo ENI (mediana = 92.6,  $p < 0.001$ ). Por otro lado, los individuos del grupo ENI<sub>HM</sub>, cuya mediana de esta subpoblación celular es de 66.1, fueron estadísticamente diferentes de los ENI<sub>SX</sub>, quienes tuvieron una

mediana de 57.2 y  $p=0.003$ . También las medianas de los subgrupos de pacientes VIH+ son estadísticamente diferentes entre si (la mediana del grupo LTNP es 46.8 y la del NP es de 52.9 ( $p=0.04$ ). Es decir, de los individuos ENI, los ENI<sub>HM</sub> y los del GC tuvieron valores significativamente más altos de células CD8+CD28+ que los ENI<sub>SX</sub>; y los LTNP, respectivamente. TABLA 28.

**TABLA 28. NIVELES DE CÉLULAS CD8+CD28+EN PBMC.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
CONTROL	72.0	61.0 – 83.0	50.0 – 94.0
ENI	62.9	54.5 – 72.5	26.9 – 94.3
ENI <sub>SX</sub>	57.2	50.8 – 66.4	26.9 – 89.2
ENI <sub>HM</sub>	66.1	60.2 – 76.9	36.9 – 94.3
VIH+	48.7	36.8 – 63.4	10.8 – 95.5
LTNP	46.8	35.1 – 59.9	10.8 – 88.6
NP	52.9	41.5 – 69.1	17.8 – 95.5

Los pacientes VIH+ tuvieron niveles de células T C8+ portadoras del marcador CD28 significativamente más bajas que los sujetos del GC e individuos ENI. También se observó que fueron los valores del GC los más altos..

#### LINFOCITO TCD4+CD38+.

Los pacientes del grupo NP (mediana=78.3%), tuvieron valores más elevados de la subpoblación celular CD4+CD38+ que los grupo GC (%), ENI<sub>SX</sub> (54.4%), ENI<sub>HM</sub> (41.6%) y LTNP (56.1%). Sin embargo, las diferencias estadísticamente significativas se presentaron sólo entre los subgrupos NP, quienes tuvieron una cifra superior de células T CD4+CD38+ que los ENI ( $p<0.001$ ) y los pacientes del grupo NP tuvieron

un mayor porcentaje de esta subpoblación celular que los LTNP ( $p < 0.001$ ). Los subgrupos ENI no presentaron diferencias entre sí ( $p = 0.9$ ). TABLA 29.

**TABLA 29. NIVELES DE CÉLULAS T CD4+CD38+ EN PBMC.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
CONTROL	63.0	54.0 – 72.0	45.0 – 81.0
ENI	54.4	44.5 – 65.4	6.5 – 79.4
ENI <sub>SX</sub>	54.4	46.2 – 64.2	7.7 – 76.6
ENI <sub>HM</sub>	41.6	41.6 – 65.6	6.5 – 79.4
VIH+	67.2	47.0 – 78.1	0.46 – 95.2
LTNP	56.1	41.7 – 71.6	0.46 – 91.2
NP	73.8	67.2 – 83.9	26.6 – 95.2

Se observó que los pacientes VIH+ tuvieron niveles de células CD4+ portadoras de CD38 (marcador de activación) más altas que los ENI ( $p < 0.001$ ) y los pacientes del subgrupo NP más que los LTNP ( $p < 0.001$ ). Lo cual sugiere una persistente activación del sistema inmune en estos dos subgrupos.

#### **LINFOCITO T CD8+CD38+.**

Las medianas de los porcentajes de la población de linfocitos T CD8+CD38+ fueron más bajas en los grupos GC (%), ENI<sub>SX</sub> (41.4%), ENI<sub>HM</sub> (47.0%) y LTNP (47.7%) que el grupo NP (64.2%). Estos valores nos permitieron diferenciar, estadísticamente, las distribuciones de las células T CD8+CD38+ de los ENI vs NP ( $p < 0.001$ ) y de los LTNP con la de los NP ( $p < 0.001$ ). TABLA 30.

**TABLA 30. NIVELES DE CÉLULAS CD8+CD38+ EN PBMC.**

GRUPO	%	IQR	MÍN – MÁX
	MEDIANA	25% - 75%	
CONTROL	51.0	37.0 – 65.0	23.0 - 79.0
ENI	43.2	32.7 – 56.1	19.4 – 70.9
ENI <sub>SX</sub>	41.4	32.4 – 58.0	19.4 – 68.8
ENI <sub>HM</sub>	47.0	34.4 – 54.2	21.0 – 70.9
VIH+	53.1	39.5 – 68.7	6.9 – 96.8
LTNP	47.0	39.5 – 68.7	6.9 – 88.4
NP	64.2	49.6 – 76.9	24.6 – 96.8

**Esta subpoblación de celular activadas estuvo aumentada en los pacientes VIH+ con respecto a l grupo ENI ( $p<0.001$ ) y más aún en los pacientes NP que en los LTNP ( $p<0.001$ ).**

## **5.2 EXPRESIÓN DE LOS CO-RECEPTORES CCR5 Y CXCR4 DEL VIH EN CÉLULAS T.**

Para el estudio de la expresión de los principales co-receptores del VIH la cohorte estuvo compuesta por 41 sujetos voluntarios sanos (GC), 32 individuos ENI<sub>SX</sub>, 31 en el grupo ENI<sub>HM</sub>; 81 pacientes en el grupo LTNP y 64 en el de NP.

### **5.2.1 CCR5 EN CÉLULAS T CD4+.**

Cuando se analizó la expresión CCR5 en células T (TABLAS 31 Y 32), se encontró que en los linfocitos CD4+ de los individuos VIH+, cuyas medianas fueron para LTNP 4.7% y NP de 6.4%, expresaron menos CCR5 que las células de los individuos de los grupos GC (7,4%) y ENI (9.1%) con  $p < 0.05$  entre LTNP y GC y  $p = 0.036$  entre LTNP y ENI. El porcentaje de células CD4+CCR5+ del grupo NP no fue diferente del valor que tuvieron los sujetos del grupo ENI ( $p = 0.14$ ). Se debe hacer mención que los individuos ENI<sub>HM</sub> y ENI<sub>SX</sub> presentaron una tendencia a ser diferentes en la expresión de CCR5 en las células CD4+,  $p = 0.056$  y medianas de 9.7% y 7.6%, respectivamente. Mientras que los valores entre LTNP y NP no presentaron diferencias,  $p = 0.41$ . Ver TABLA 31.

### **5.2.2 CCR5 EN CÉLULAS T CD8+.**

Con respecto a las CD8+CCR5+ se encontraron valores más bajos en individuos seropositivos, tanto LTNP como NP (medianas de 8.3% y 11.8%), con respecto a los grupo GC (mediana=12.8%, con  $p < 0.01$  en ambos casos) y ENI (mediana=16.7%,  $p < 0.001$  con LTNP y  $p = 0.002$  con NP). Por lo que se refiere a los subgrupos de individuos expuestos no infectados (hemofílicos y sexuales) entre sí, con medianas de 17.7% y 13.2%; no se hallaron diferencias en la expresión de CCR5 en células CD8+ ( $p = 0.11$ ). A pesar de ser más alta la mediana del porcentajes de los LTNP con respecto al grupo NP, no hubo significancia estadística (0.11).

**TABLA 31. EXPRESIÓN CCR5 EN CÉLULAS T CD4+.**

GRUPO	%	IQR	MÍN - MÁX
	MEDIANA	25% - 75%	
CONTROL	7.4	6.4 – 9.2	3. – 13.2
ENI	9.1	6.0 – 11.6	0.18 – 29.8
ENI <sub>SX</sub>	7.6	4.0 – 11.2	0.18 – 23.6
ENI <sub>HM</sub>	9.7	7.4 – 12.1	2.40 – 29.8
VIH+	5.6	3.2 – 11.2	0.26 – 96.3
LTNP	4.7	3.2 – 11.2	0.26 – 96.3
NP	6.4	3.4 – 11.5	0.02 – 44.3

Los niveles de CCR5 en células T CD4+ fueron ligeramente inferiores en el GC que en los ENI. Sólo los ENI<sub>SX</sub> tuvieron niveles de CCR5 en células T CD4+ parecidos a los del GC. Pudo observarse que, existe una tendencia a que ENI<sub>HM</sub> y ENI<sub>SX</sub> ( $p=0.056$ ) sean diferentes en esta subpoblación celular. Por otro lado, los LTNP, tuvieron un porcentaje de CCR5, significativamente más bajo ( $p=0.036$ ), que los ENI.

**TABLA 32. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD8+.**

GRUPO	%	IQR	MÍN – MÁX
	MEDIANA	25% - 75%	
CONTROL	12.8	8.2 – 13.1	6.9 – 20.0
ENI	16.7	11.0 – 22.8	0.0 – 49.9
ENI <sub>SX</sub>	13.2	7.4 – 20.9	0.0 – 36.9
ENI <sub>HM</sub>	17.7	13.3 – 23.3	5.0 – 49.9
VIH+	10.1	4.8 – 17.8	0.5 – 79.6
LTNP	8.3	3.3 – 17.0	0.5 – 79.6
NP	11.8	6.4 – 18.0	1.6 – 47.8

Fueron los pacientes VIH+ quienes tuvieron niveles de CCR5 en células T CD8+, significativamente más bajos que los ENI;  $p<0.001$ , con LTNP y  $p<0.031$ , con NP. Del mismo modo, la mediana de los LTNP fue inferior a la de los NP, aunque ésta diferencia no fue significativa ( $p=0.11$ ).



### 5.2.3 CXCR4 EN CÉULAS CD4+.

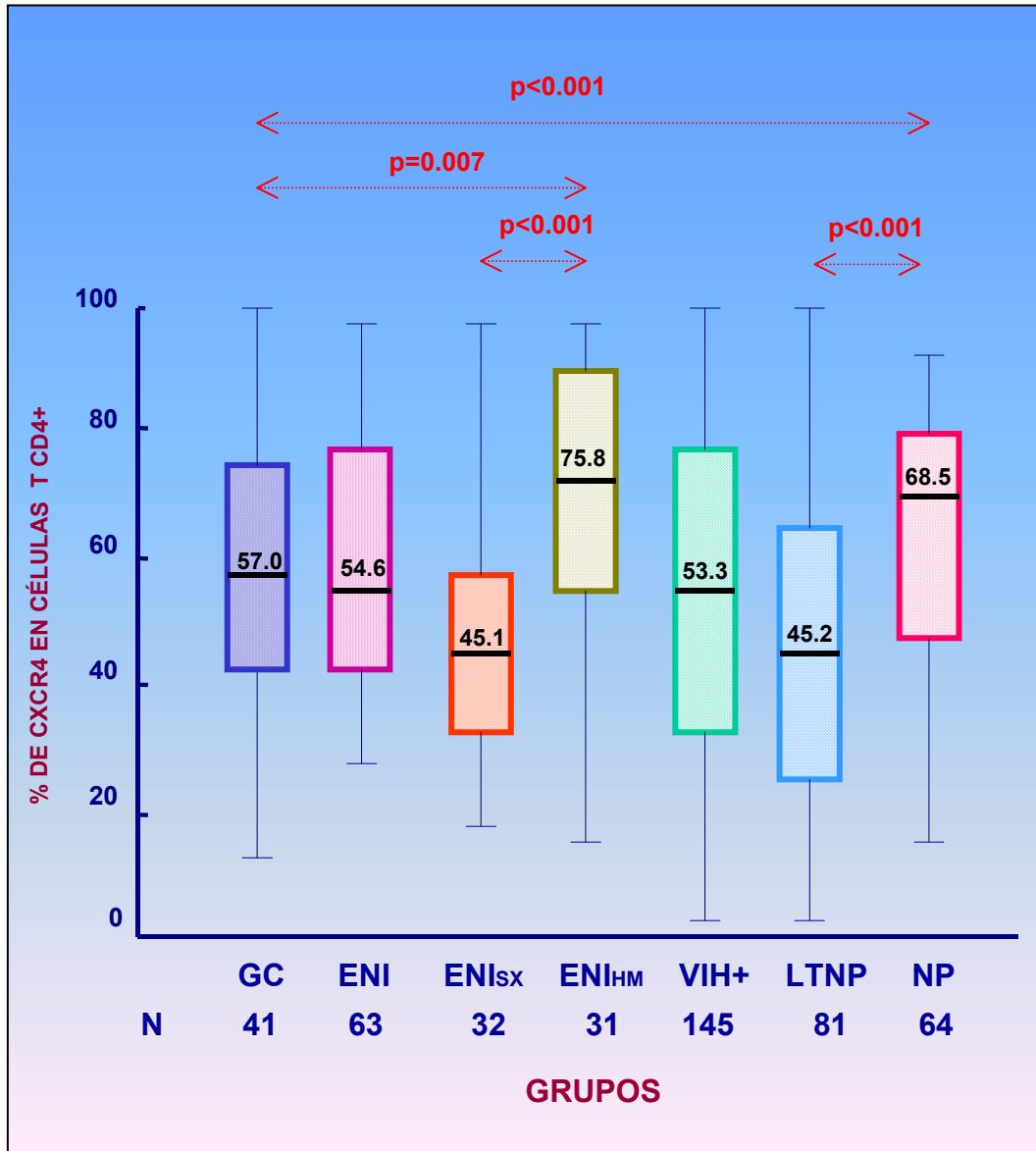
La mediana de células T CD4+CXCR4+ en el grupo LTNP es de 45.2% y en GC es de 57.0%, sólo se observó una tendencia a ser diferentes ( $p=0.08$ ). Por otro lado, y con respecto al GC, el porcentaje de esta subpoblación de células T estuvo aumentado en los individuos ENI<sub>HM</sub> (mediana=72.8 y  $p=0.007$ ) y fue menor en el grupo ENI<sub>SX</sub> (mediana=45.1 y  $p=0.14$ ). De tal forma que los individuos ENI<sub>HM</sub> presentaron un mayor porcentaje de linfocitos T CD4+CXCR4+ que los ENI<sub>SX</sub> ( $p<0.001$ ). El grupo de NP tuvo una mediana de 68.5%, siendo éste un valor superior al que presenta el GC con  $p<0.001$ . El porcentaje de los individuos ENI<sub>HM</sub> también es más alto que en los LTNP y NP, habiendo significancia estadística con los LTNP ( $p=0.008$ ); no así con los NP ( $p=0.26$ ). La expresión de CXCR4 en células CD4+ fue más en el grupo NP que la de los LTNP ( $p<0.001$ ). De tal forma que los ENI<sub>HM</sub> presentaron una mediana superior de células T CD4+CXCR4+ que el resto de los grupos de estudio. Ver TABLA 33 y FIGURA 10.

**TABLA 33. EXPRESIÓN DEL CO-RECEPTOR CXCR4 EN CÉULAS T CD4+.**

GRUPO	MEDIANA	IQR	
		25% - 75%	MÍN - MÁX
CONTROL	57.0	41.0 – 73.0	11.0 – 99.0
ENI	54.6	40.7 – 76.6	15.4 – 98.1
ENI <sub>SX</sub>	45.1	31.5 – 58.9	18.6 – 98.1
ENI <sub>HM</sub>	72.8	54.3 – 93.1	15.4 – 97.8
VIH+	53.3	31.3 – 76.3	1.4 – 99.2
LTNP	45.2*	25.5 – 63.5	1.3 – 100.0
NP	68.5	47.2 – 79.2	12.3 – 94.4

\*Menores niveles de CXCR4 en ENI<sub>SX</sub> vs ENI<sub>HM</sub> y en LTNP vs NP.

**FIGURA 10. EXPRESIÓN DE CXCR4 EN CÉLULAS T CD4+.**



El porcentaje de expresión del co-receptor CXCR4 en células T CD4+ está representado, con la línea horizontal, la mediana; las cajas, los valores comprendidos entre los percentiles 25 y 75, y las patillas, los valores mínimo y máximo de la distribución. La mediana de los LTNP fue significativamente inferior a la de los GC, ENISX y NP. Mientras que los ENIHM tuvieron una mediana superior a la de los ENISX.

#### **CXCR4 EN CÉLULAS T CD8+.**

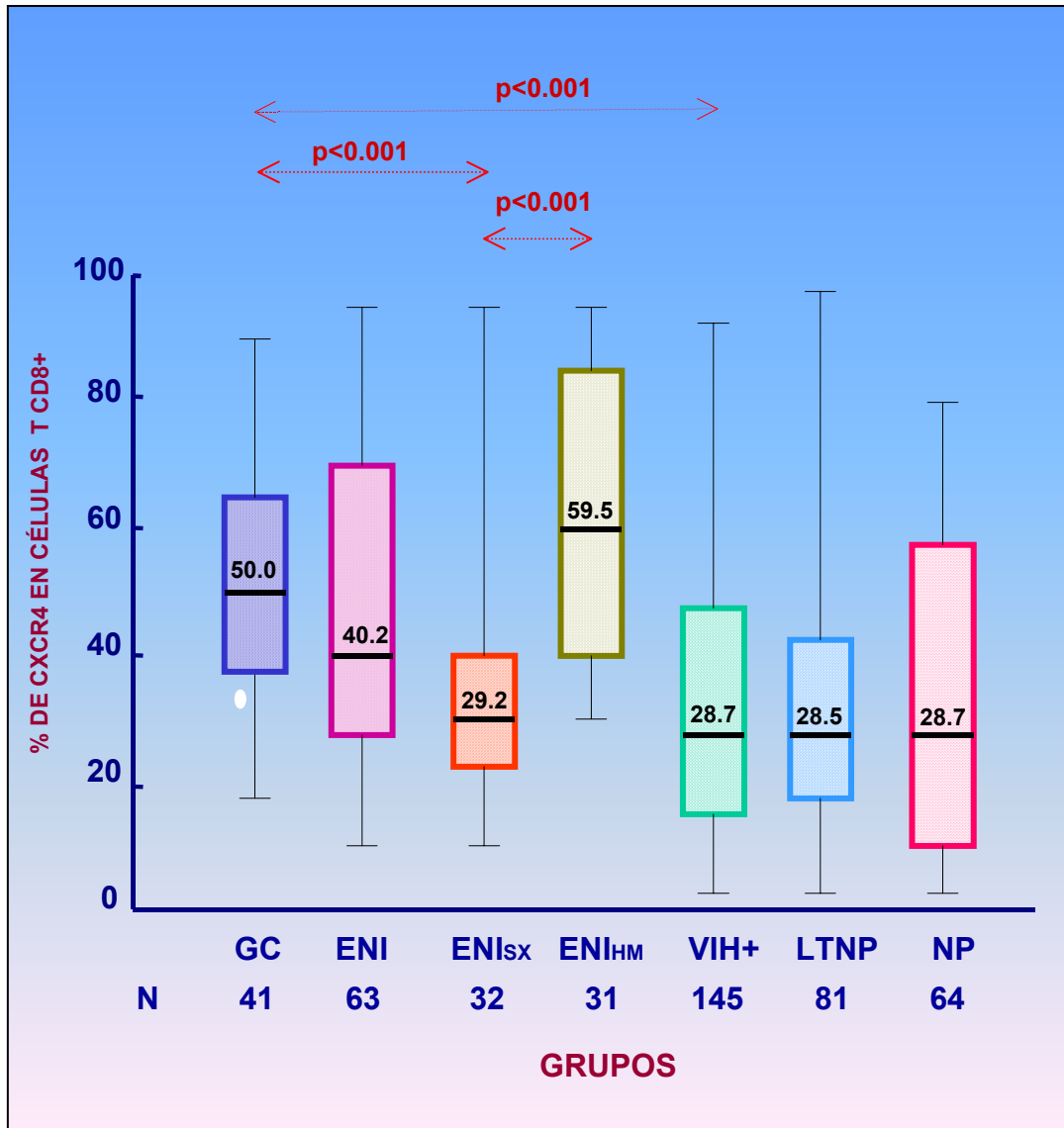
El porcentaje de células T CD8+CXCR4+ está disminuido en los grupos LTNP (mediana=28.5%), NP (mediana=28.7%) y ENI<sub>SX</sub> (mediana=29.2%) con respecto al GC (mediana=50.0%), con  $p < 0.001$ ; mientras que los ENI<sub>HM</sub> no difieren significativamente del control (mediana=59.2%,  $p = 0.11$ ). Los individuos ENI<sub>HM</sub> presentan un porcentaje superior de células T CD8+CXCR4+ incluso que el GC, aunque sin tener significancia ( $p = 0.15$ ) y que los ENI<sub>SX</sub>, con quienes la diferencia sí es significativa ( $p < 0.001$ ). Por otro lado, el grupo ENI<sub>HM</sub> tuvo valores significativamente más altos que los LTNP y los NP ( $p < 0.001$ ). Los valores entre LTNP y NP no fueron estadísticamente diferentes ( $p = 0.8$ ). Así, los individuos expuestos por vía parenteral son lo que tuvieron el valor más alto de células T CD8+ que expresan CXCR4. (Ver TABLA 34 y FIGURA 11).

**TABLA 34. EXPRESIÓN DEL CO-RECEPTOR CXCR4 EN CÉLULAS T CD8+.**

GRUPO	% MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
GC	50.0	39.0 – 65.0	18.0 - 88.0
ENI	40.2	28.0 – 68.4	10.9 - 96.3
ENI <sub>SX</sub>	29.2	22.6 – 40.4	10.9 - 96.2
ENI <sub>HM</sub>	59.5	39.8 – 82.8	29.3 - 95.9
VIH+	28.7	13.6 – 48.2	1.6 - 93.8
LTNP	28.5	15.3 – 43.5	1.7 - 99.0
NP	28.7	9.0 – 57.9	1.6 - 79.5

Los pacientes VIH+ presentaron una mayor variabilidad en la expresión CXCR4 en células T CD8+ y sus medianas son significativamente menores a las del GC; sin embargo, no hay diferencia significativa entre LTNP y NP.

FIGURA 11. EXPRESIÓN DE CXCR4 EN CÉLULAS T CD8+.



La línea horizontal representa la mediana, las cajas representan el intervalo de valores comprendido entre los percentiles 25 y 75, y las patillas, valores mínimo y máximo de la distribución. Los dos subgrupos de pacientes VIH+ (LTNP y NP) tuvieron porcentajes significativamente menores de CXCR4 en células T CD8+ que los sujetos de GC y los individuos ENI y de éstos, los ENI<sub>HM</sub>, fueron los que tuvieron niveles más altos.

### **5.3 POLIMORFISMO CCR5-Δ32.**

Para el estudio del polimorfismo CCR5-Δ32 se incluyeron 309 sujetos. Noventa sujetos en el grupo control; 64 individuos ENI, 29 de ellos expuestos a hemoderivados (ENI<sub>HM</sub>) y 28 por vía sexual (ENI<sub>SX</sub>) y 154 seropositivos al VIH, de éstos 79 LTNP y 75 NP. Los individuos homocigotos CCR5+/+ y heterocigotos (CCR5+/ $\Delta$ 32) para el alelo deleciónado fueron identificados usando PCR. La FIGURA 6 muestra los patrones de la PCR para los tipos de individuos hallados en la cohorte (CCR5+/+ y CCR5+/ $\Delta$ 32).

#### **HOMOCIGOCIA CCR5.**

El genotipo *wild type* (CCR5+/+) se halló uniformemente distribuido en los diferentes grupos de estudio. ver TABLA 35 y FIGURA 12. 85.6% en el grupo control; 87.7% en el grupo ENI, 93.5% y 82.3% en los ENI<sub>HM</sub> y ENI<sub>SX</sub>, respectivamente, y, 81.8% en los pacientes VIH+, 89.3% en los NP y en los LTNP el porcentaje de esta variante es menor (74.7%).

#### **HETEROCIGOCIA CCR5-Δ32.**

En el grupo control, el 14.6% son individuos que pertenecen a este genotipo. En el grupo VIH+; el 18.2% de los pacientes son CCR5+/ $\Delta$ 32. De los 79 pacientes LTNP, 20 (25.3%) son heterocigotos  $\Delta$ 32 y sólo 8 (10.7%) de los 75 NP. Únicamente 8 (12.3%) de los 65 individuos ENI presentaron polimorfismo CCR5+/ $\Delta$ 32; 6 de ellos son ENI<sub>SX</sub> y 2 pertenecen al subgrupo ENI<sub>HM</sub>. La variante CCR5+/ $\Delta$ 32 se encontró sobre-representada en los VIH+ y de éstos, específicamente en los LTNP. (Ver TABLA 35 y FIGURA 12).

### **HOMOCIGOCIA CCR5-Δ32.**

En ninguno de los grupos de estudios se encontraron personas con homocigocia CCR5-Δ32. Ver TABLA 35.

También se hizo el cálculo del OR (Odds ratio) para saber la dependencia entre las variantes CCR5+/+ y CCR5+/ $\Delta$ 32 y la resistencia y/o progresión de la infección por el VIH-1 (TABLA 36). Existe una tendencia de dependencia entre ambas variantes y los grupos ENI y LTNP, con OR de 0.41. Los individuos ENI tienen menos probabilidad de tener el alelo mutado en el gen CCR5 que los LTNP, aunque esta tendencia está al límite de la significación ( $IC_{95\%} = 0.17 - 0.99$ ). Cuando se calculó el OR para LTNP y NP (2.84) se encontró que, el grupo LTNP tiene una probabilidad tres veces superior de pertenecer a la variante genotípica CCR5+/ $\Delta$ 32 que los NP ( $IC_{95\%} = 1.18 - 6.78$ ).

**TABLA 35. DISTRIBUCIÓN DEL POLIMORFISMO CCR5-Δ32 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

GRUPO (N=309)	GENOTIPO N (%)	
	CCR5+/+	CCR5+/ $\Delta$ 32
CONTROL (90)	77(85.5)	13(14.5)
ENI (65)	57(87.7)	8(12.3)*
ENI <sub>SX</sub> (34)	28(82.4)	6(17.6) <sup>♠</sup>
ENI <sub>HM</sub> (31)	29(93.5)	2(6.5)
VIH+ (154)	126(81.8)	28(18.2)
LTNP (79)	59(74.7)	20(25.3) <sup>&amp;</sup>
NP (75)	67(89.3)	8(10.7)

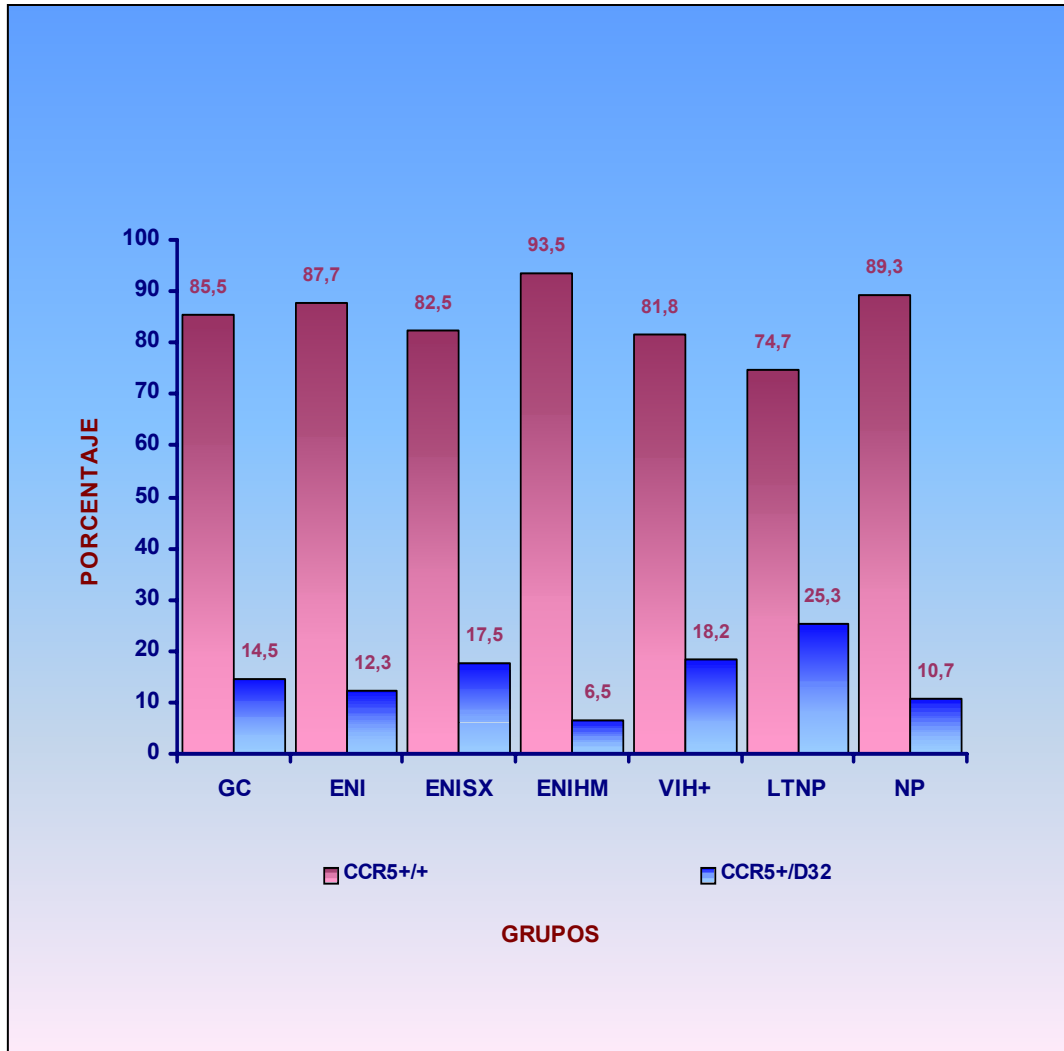
No se hallaron individuos con homocigocia CCR5- $\Delta$ 32 en ninguno de los grupos de estudio. \* La heterocigocia CCR5- $\Delta$ 32 fue menos frecuente entre individuos ENI que en los grupos GC y VIH+. <sup>♠</sup> En los ENI<sub>SX</sub>, hubo mayor frecuencia de heterocigocia. Por otro lado, se observó una sobre-representación de esta variante genética en los pacientes LTNP<sup>&</sup>.

**TABLA 36. ODDS RATIO.**

GRUPOS	OR	IC <sub>95%</sub>
ENI vs CONTROL	0.83	0.33 - 2.09
LTNP vs CONTROL	2.0	0.93 - 4.32
NP vs CONTROL	0.71	0.28 - 1.77
ENI vs LTNP	0.41*	0.17 - 0.99
ENI vs NP	1.18	0.43 - 3.23
LTNP vs NP	2.84 <sup>♠</sup>	1.18 - 6.78
ENI <sub>SX</sub> vs ENI <sub>HM</sub>	3.11	0.65 - <sup>&amp;</sup>

Con tendencia al límite (IC<sub>95%</sub> 0.17 – 0.99), los ENI tienen menos probabilidad de presentar heterocigocia CCR5- $\Delta$ 32 mientras que los LTNP tienen 3 veces más probabilidad de tener heterocigocia CCR5- $\Delta$ 32 que los NP. <sup>&</sup> No fue posible calcular el límite superior del IC, pero no hay significancia (Prueba de Fisher:0.262).

**FIGURA 12. POLIMORFISMO CCR5- $\Delta$ 32 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**



La heterocigocia CCR5- $\Delta$ 32 estuvo sobre-representada en los individuos VIH+ de esta cohorte y de éstos, específicamente en los LTNP (20/79). En este caso, los individuos LTNP, tuvieron tres veces más probabilidad de pertenecer a la variante CCR5+/ $\Delta$ 32 que los NP (OR=2.84).



#### **5.4 ALELO CCR5- $\Delta$ 32 Y EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T.**

Para analizar la influencia que pudiera tener la presencia del alelo CCR5 $\Delta$ 32 sobre la expresión del receptor en la superficie de las células T tanto CD4+ como CD8+ se compararon las medianas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis y el ajuste se hizo mediante el método de Bonferoni.

##### **EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD4+ SEGÚN GENOTIPO CCR5- $\Delta$ 32.**

La TABLA 37 contiene los datos de la cohorte dividida en función del genotipo CCR5- $\Delta$ 32, 260 individuos CCR5+/+ y 49 CCR5+/ $\Delta$ 32; los resultados demuestran que la expresión de CCR5 en células T CD4+ no es significativamente diferente entre ambas variantes. La mediana del genotipo CCR5+/+, fue de 7.4%, y la de la variante CCR5+/ $\Delta$ 32, fue de 7.0% ( $p=0.88$ ). (Ver FIGURA 13). A pesar de que no hay diferencia estadística entre ambas variante genéticas, debemos resaltar que la distribución de los valores varía entre una y otra; a excepción de unos pocos pacientes, las cifras de la variante CCR5+/ $\Delta$ 32 prácticamente se concentra en valores bajos y solo unos cuantos tuvieron niveles de CCR5 en células T CD4+ extremadamente altos.

Al dividir la cohorte según el grupo de estudio, los individuos ENI-CCR5+/+ presentaron una mediana de CCR5 en células CD4+ de 9.2%, la mediana de los ENI-CCR5+/ $\Delta$ 32 fue de 7.7%; no presentaron diferencia significativa ( $p=0.73$ ). Por otro lado, los pacientes LNTP-CCR5+/+ y los LTNP-CCR5+/ $\Delta$ 32, con medianas de 4.8% y 5.7% tampoco mostraron diferencias en la expresión del co-receptor entre las dos variantes genotípicas ( $p=0.57$ ). En el subgrupo de NP, los hallazgos son similares,

tanto los NP-CCR5+/+ como los NP-CCR5+/ $\Delta$ 32 tuvieron una mediana de 6.4%. Ver (TABLA 38 y FIGURA 14).

Por otro lado, tanto en los individuos con homocigocia para CCR5+/+, como en los CCR5+/ $\Delta$ 32 de los tres grupos, la expresión de CCR5 en células T CD4+ es mayor en el grupo ENI y menor en el grupo LTNP. Ver TABLA 38.

**TABLA 37. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD4+ y GENOTIPO CCR5- $\Delta$ 32.**

GENOTIPO	% CCR5 EN CÉLULAS T CD4+ MEDIANA	IQR 25% - 75%	p
CCR5+/+	7.4	3.7 – 11.4	0.88
CCR5+/ $\Delta$ 32	7.0	3.2 – 13.7	

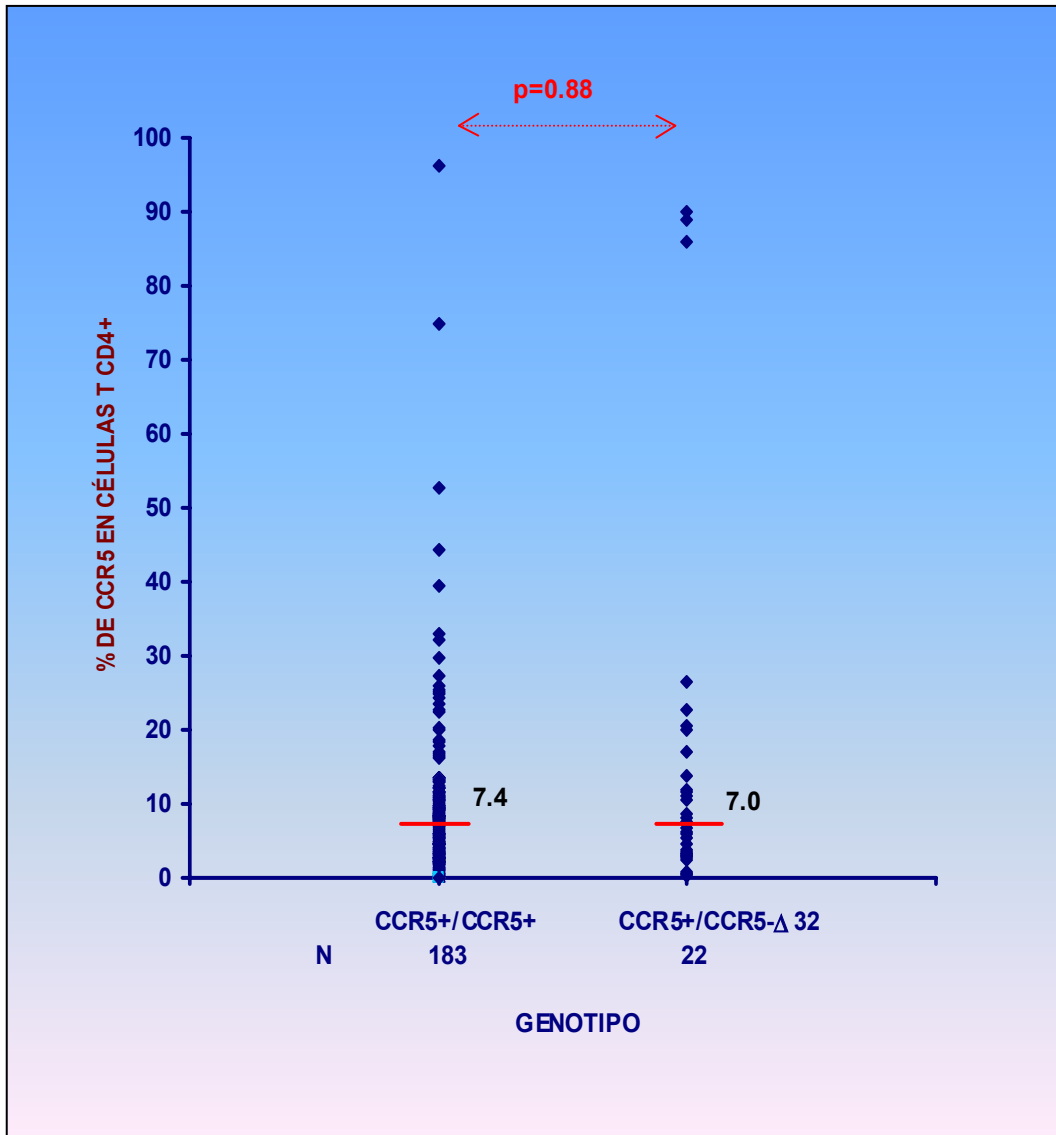
Los niveles de CCR5 en células T CD4+, no fueron significativamente diferentes entre las dos variantes genotípicas. La presencia del alelo  $\Delta$ 32 del gen CCR5 podría no afectar la expresión del co-receptor en las células T CD4+.

**TABLA 38. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD4+ Y GENOTIPO CCR5-Δ32 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

GENOTIPO	% CCR5+ EN CÉLULAS T CD4+ MEDIANA	IQR 25% - 75%	p
ENI			
CCR5+/+	9.2	6.0 – 12.0	0.73
CCR5+/ $\Delta$ 32	7.7	5.6 – 12.3	
LTNP			
CCR5+/+	4.8	2.8 – 10.0	0.57
CCR5+/ $\Delta$ 32	5.7	3.1 – 15.9	
NP			
CCR5+/+	6.4	3.4 – 11.5	0.92
CCR5+/ $\Delta$ 32	6.4	2.7 – 14.8	

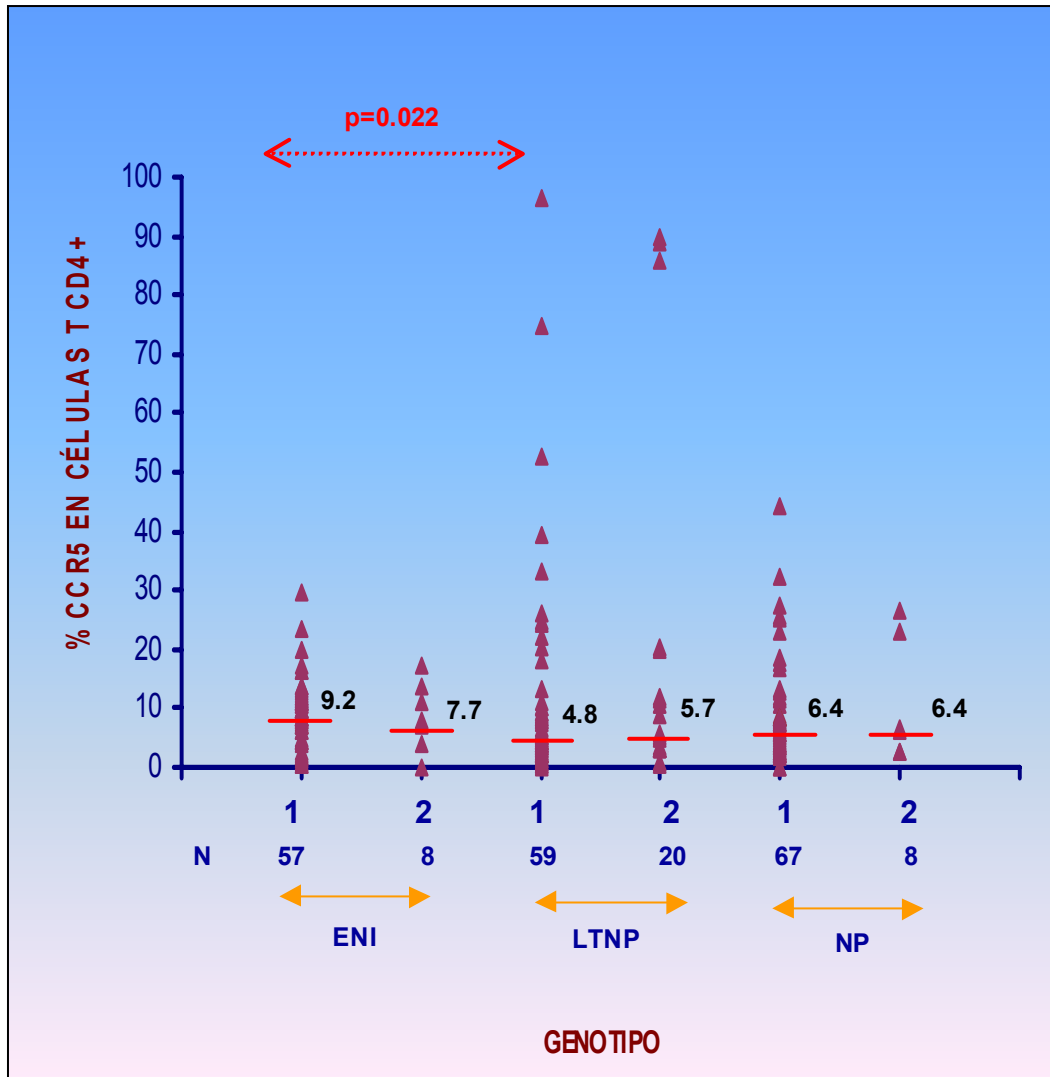
Al analizar la expresión de CCR5 en células T CD4+ en cada grupo, en función de la presencia del alelo CCR5 mutado, se pudo observar que no hubo diferencia significativa en la expresión del co-receptor. Debe resaltarse que el grupo de pacientes LTNP, fue el que tuvo los niveles de CCR5 más bajos, tanto los homocigotos CCR5+ como los heterocigotos CCR5+/ $\Delta$ 32 pero además, una mayor variabilidad.

**FIGURA 13. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD4+ y POLIMORFISMO CCR5-Δ32.**



La línea horizontal representan la mediana del porcentaje de expresión de CCR5 en células T CD4+. La distribución de los porcentajes de CCR5 en células T CD4+ fue menos dispersa en el genotipo CCR5-Δ32. Aunque no existieron diferencia en la expresión del co-receptor entre ambas variantes genéticas, este análisis estableció que el patrón de expresión de muchos individuos mostró una buena correlación con el genotipo CCR5, aunque unos pocos individuos CCR5+/+ mostraron niveles bajos de CCR5, y las células de una minoría de sujetos CCR5+/Δ32 expresaron niveles muy altos de CCR5.

**FIGURA 14. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS CD4+ Y POLIMORFISMO CCR5-Δ32 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**



El número 1 representa el genotipo CCR5+/+, el 2, CCR5+/ $\Delta$ 32 y la línea horizontal la mediana del porcentaje de expresión de CCR5+ en células T CD4+. La comparación de la expresión de CCR5 en células CD4+ entre los genotipos 1 y no mostró diferencias significativas en ninguno de los tres grupos estudiados ( $p > 0.05$ ). Sólo hubo diferencias significativas ( $p = 0.022$ ) en el caso de la variante 1 entre los ENI y los LTNP; nótese que los pacientes LTNP tuvieron menor % de CCR5 que los ENI. Con excepción de algunos individuos LTNP, se sigue observando una marcada concentración del nivel de CCR5 en valores bajos entre los individuos con variante genética CCR5+/ $\Delta$ 32.

#### **EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD8+ SEGÚN GENOTIPO CCR5 $\Delta$ 32.**

Aunque la expresión del co-receptor CCR5 en las células T CD8+ no presentó diferencias entre los genotipos CCR5+/+ (mediana=12.8%), y CCR5+/ $\Delta$ 32 (mediana de 12.2%), con una  $p=0.80$ . (Ver TABLA 39 y FIGURA 15); debemos resaltar un importante hallazgo de este análisis que fue la considerable heterogeneidad de la expresión del co-receptor en células T CD8+ en las dos variante genéticas.

En la TABLA 40 se muestran los datos de la expresión de CCR5 en células T CD8+ cuando la cohorte fue dividida en los diferentes grupos de estudio. Los individuos ENI-CCR5+/+ presentaron una mediana de CCR5 en células CD8+ de 16.8%, la mediana de los ENI-CCR5+/ $\Delta$ 32 fue de 13.7%; estos valores no son estadísticamente diferente ( $p=0.29$ ). Por otro lado, al comparar los pacientes LNTP-CCR5+/+ y los LTNP-CCR5+/ $\Delta$ 32, con medianas de 8.3% y 11.9%, no hubo diferencias en la expresión del co-receptor ( $p=0.69$ ). Aunque los pacientes NP-CCR5+/+ presentaron una valor superior de CCR5 en células T CD8+, (mediana=11.9%) que los NP-CCR5+/ $\Delta$ 32 (mediana=8.2%), esta diferencia no es significativa ( $p=0.85$ ). (Ver FIGURA 16).

**TABLA 39 EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD8+ Y GENOTIPO CCR5-Δ32.**

GENOTIPO	% CCR5 EN CÉLULAS T CD8+ MEDIANA	IQR 25% - 75%	p
CCR5+/+	12.8	6.6 – 18.8	NS
CCR5+/ $\Delta$ 32	12.2	3.7 – 24.3	

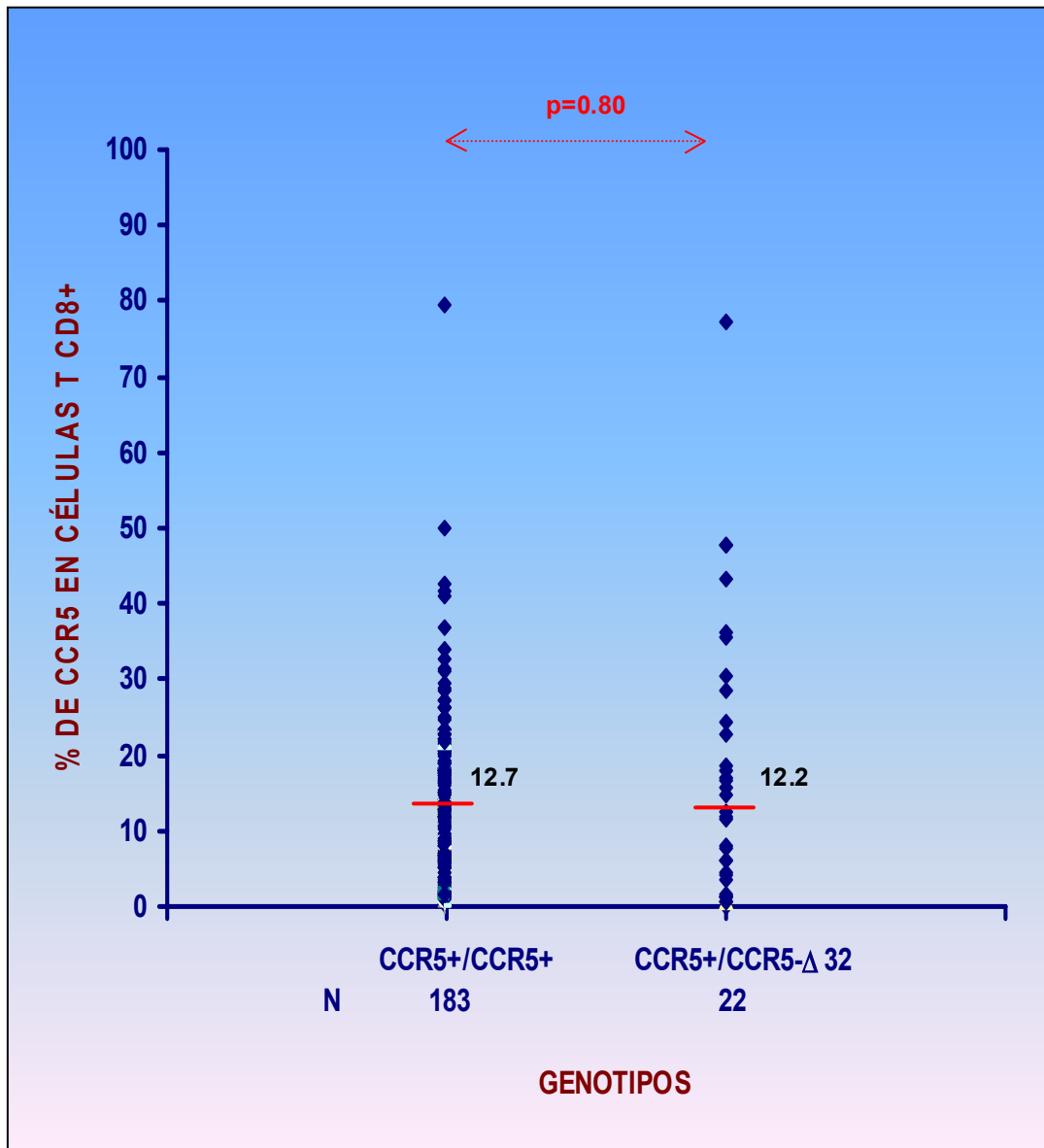
NS.- No significativo ( $p=0.80$ )

**TABLA 40. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD8+ Y GENOTIPOS CCR5-Δ32 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**

GENOTIPO	% CCR5 EN CÉLULAS T CD8+ MEDIANA	IQR 25% - 75%	p
<b>ENI</b>			
CCR5+/+	16.8	11.7 – 23.0	NS*
CCR5+/ $\Delta$ 32	13.7	5.6 – 19.8	
<b>LTNP</b>			
CCR5+/+	8.3	3.3 – 15.5	NS <sup>&amp;</sup>
CCR5+/ $\Delta$ 32	11.9	1.3 – 26.4	
<b>NP</b>			
CCR5+/+	11.9	6.4 – 18.0	NS <sup>ç</sup>
CCR5+/ $\Delta$ 32	8.1	4.6 – 43.2	

NS.- No significativo. Los ENI con genotipo CCR5+/ $\Delta$ 32, sí tuvieron porcentajes más bajos de CCR5 en células CD8+, pero esta diferencia no fue significativa (\*  $p=0.29$ ); lo mismo se pudo observar en el caso de los NP (<sup>ç</sup>  $p=0.85$ ). En cambio, los LTNP con esta variante genotípica tuvieron cifras más altas, pero sin significancia con su contraparte (<sup>&</sup>  $p=0.69$ ).

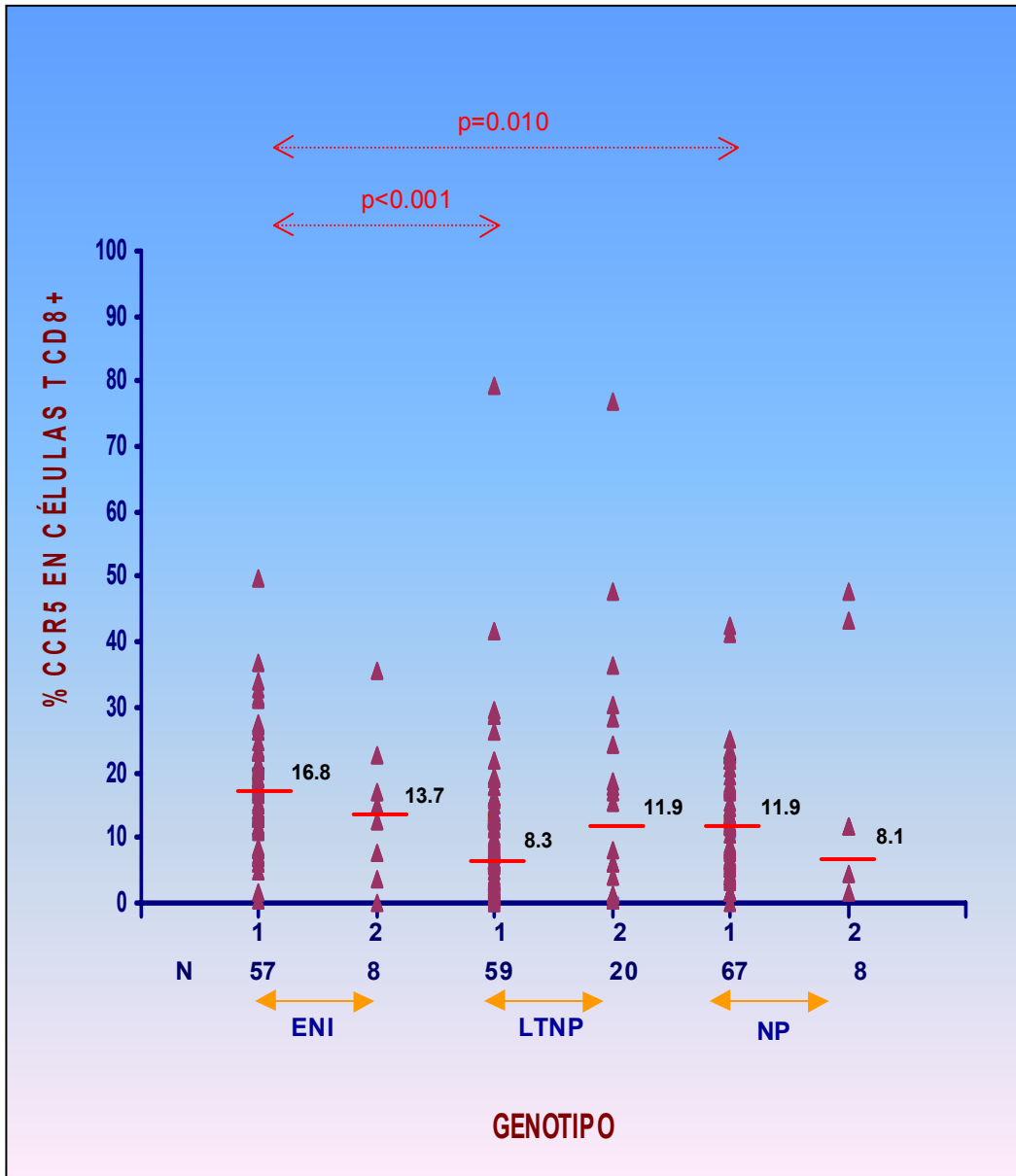
FIGURA 15. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD8+ Y POLIMORFISMO CCR5-Δ32.



La línea horizontal representa la mediana de la distribución. La expresión de CCR5+ en células T CD8+, no es diferente entre las dos variantes genotípicas CCR5-Δ32.



**FIGURA 16. EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD8+ Y POLIMORFISMO CCR5-Δ32 EN LOS GRUPOS DE ESTUDIO.**



El número 1 representa la variante CCR5+/+; el 2, CCR5+/ $\Delta$ 32 y la barra horizontal, la mediana del nivel de CCR5 en células T CD8+. Los individuos CCR5+/ $\Delta$ 32 de los grupos ENI y NP tuvieron un menor porcentaje de CCR5 en células T CD8+, aunque sin diferencia significativa. Por lo que se refiere a los homocigotos para CCR5, los pacientes VIH tuvieron los niveles más bajos de CCR5 y de éstos, los LTNP.

## **5.5 NIVELES PLASMÁTICOS DE $\beta$ -QUIMIOCINAS.**

Para la cuantificación de los niveles plasmáticos de las  $\beta$ -quimiocinas los grupos estuvieron integrados de la siguientes forma: GC, con 82 donantes; ENI, 62, de los cuales 32 del subgrupo ENI<sub>SX</sub> y 30 del ENI<sub>HM</sub>; los subgrupos del VIH+ (n=123) estuvo dividido en 69 pacientes LTNP y 54 en estado avanzado. Globalmente, la concentración plasmática de RANTES estuvo en el rango 0 – 3039.0 pg/ml, la de MIP-1 $\alpha$  entre 6.0 – 1919.7 pg/ml y la de MIP-1 $\beta$  en el intervalo 0 – 1798 pg/ml.

### **CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MIP-1 $\beta$ .**

Aunque la mediana de los niveles plasmáticos (pg/ml) de MIP-1 $\beta$  entre los grupos GC (112.0) y VIH+ (100.0), tanto LTNP (99.0) como los del subgrupo NP (91.4) no presentaron diferencias ( $p > 0.05$  en todos los casos); la distribución de los valores de los pacientes VIH+ (4.9 – 469.0 pg/ml), tanto del subgrupo LTNP ( 4.9 – 469.0 pg/ml) como del NP (10.8 – 314.0 pg/ml), es menos dispersa que la del GC (0.0 – 986.3 pg/ml). Por otro lado, la mediana del grupo ENI (359.2), cuya variabilidad estuvo entre 0.0 a 1798.5 pg/ml, es significativamente diferente ( $p < 0.001$ ) a la del GC y esta diferencia estuvo dada por los valores del subgrupo ENI<sub>HM</sub>, quienes tuvieron los valores más altos de esta  $\beta$ -quimiocina, con una mediana de 867.9 pg/ml y valores mínimo y máximo entre 33.5 y 1798.5 pg/ml. Mientras tanto, no hubo diferencias entre la mediana del GC y la del subgrupo ENI<sub>SX</sub> (224.3 pg/ml). Cabe resaltar que la mediana de los ENI<sub>HM</sub> es significativamente más alta que la de los ENI<sub>SX</sub>, con  $p < 0.001$ . (Ver TABLA 41 y FIGURA 17).

### CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE RANTES.

Por lo que se refiere RANTES, la distribución de los valores en el GC es la menos dispersa (1131.5 – 2254.4 pg/ml) y su mediana (1621.0 pg/ml), fue significativamente más alta que la de los grupos ENI (1425.7 pg/m) y VIH+ (1330.2 pg/ml), en ambos casos con  $p < 0.001$ . Aunque la mediana del grupo ENI es significativamente menor que la del GC, al analizar sus subgrupos se encontró que sólo la mediana del ENI<sub>HM</sub> (1263.7 pg/ml), es significativamente menor a la del control, no así la del ENI<sub>SX</sub>, la cual fue de 1585.5 pg/ml. De tal forma que las distribuciones de los subgrupos ENI fueron significativamente diferentes entre sí con  $p < 0.001$ ); mientras que los valores de los ENI<sub>SX</sub> estuvieron entre 36.0 – 2033.4 pg/ml, la de los ENI<sub>HM</sub> fueron de 65.9 – 1969.3 pg/ml. La diferencia entre las medianas del GC y del VIH+ estuvo dada por la del grupo NP (1267.5 pg/ml y  $< 0.001$ ), mientras que el subgrupo LTNP, con una mediana de 1458.0, no presentó diferencias significativas con el GC. Tampoco las medianas de los subgrupos LTNP y NP fueron estadísticamente diferentes entre sí (ver TABLA 42 y FIGURA 18). La variabilidad de los niveles plasmáticos de RANTES fue mayor en el grupo VIH+ (0.0 – 3039.0 pg/ml) que la del grupo ENI (36.0 – 2033.4 pg/ml). De tal forma que, con respecto a la quimiocina RANTES, los ENI<sub>SX</sub> y los NP tuvieron niveles plasmáticos más bajos que los sujetos del grupo control y en los individuos ENI<sub>HM</sub> y LTNP se hallaron cifras semejantes al GC. Por otro lado, la diferencia que se observó entre el GC y el grupo de pacientes VIH+ estuvo dada entre los niveles plasmáticos del subgrupo de NP (mediana=1267.5 y  $p < 0.001$ ).

### CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MIP-1 $\alpha$ .

El grupo de pacientes VIH+ fue el que presentó la mayor variabilidad en las concentraciones plasmáticas de MIP-1 $\alpha$  (ver TABLA 43 y FIGURA 19). Los valores de este grupo estuvieron entre 2.0 y 1919.7 pg/ml; mientras que los del GC entre 0.2 y 101.3 pg/ y el grupo ENI tuvo cifras muy parecidas al control 0.0 y 102.9 pg/ml. Por lo que se refiere a los subgrupos de estudio, el ENI<sub>SX</sub> tuvo valores entre 1.3 y 71.6 pg/ml, el ENI<sub>HM</sub> entre 0.0 – 102.9 pg/ml, el LTNP entre 2.0 – 563.0 pg/ml, y finalmente, el NP fue el que presentó la mayor variabilidad, 22.0 – 1919.7 pg/ml.

Las medianas de las distribuciones del GC (24.3 pg/ml) y ENI (21.9 pg/ml) no fueron diferentes. Tampoco se hallaron diferencias entre los subgrupos ENI cuyas medianas fueron de 17.2 pg/ml para los ENI<sub>SX</sub> y de 23.9 pg/ml para los ENI<sub>HM</sub>. El grupo VIH+ tuvo una mediana de 114.0 pg/ml, cifra significativamente superior a la del GC y a la del grupo ENI (en ambos casos,  $p < 0.001$ ). De los dos subgrupos VIH+, los individuos LTNP tuvieron una mediana significativamente menor (86.5 pg/ml) a la del NP, el cual presentó el valor más alto, mediana=665.7 pg/ml.

**TABLA 41. NIVELES PLASMÁTICOS DE MIP-1 $\beta$ .**

GRUPO	pg/ml MEDIANA	IQR 25% - 75%	MIN – MÁX
GC	112.0	39.2 – 284.0	0.0 - 986.3
ENI	359.2	149.5 – 890.7	0.0 – 1798.5
ENI <sub>SX</sub>	224.3	124.0 – 372.6	0.0 – 1146.0
ENI <sub>HM</sub>	867.9*	394.8 – 1238.7	33.5 – 1798.5
VIH+	100.0	47.4 – 152.0	4.9 – 469.0
LTNP	99.0	47.4 – 155.0	4.9 – 469.0
NP	91.4	36.8 – 147.9	10.8 – 314.0

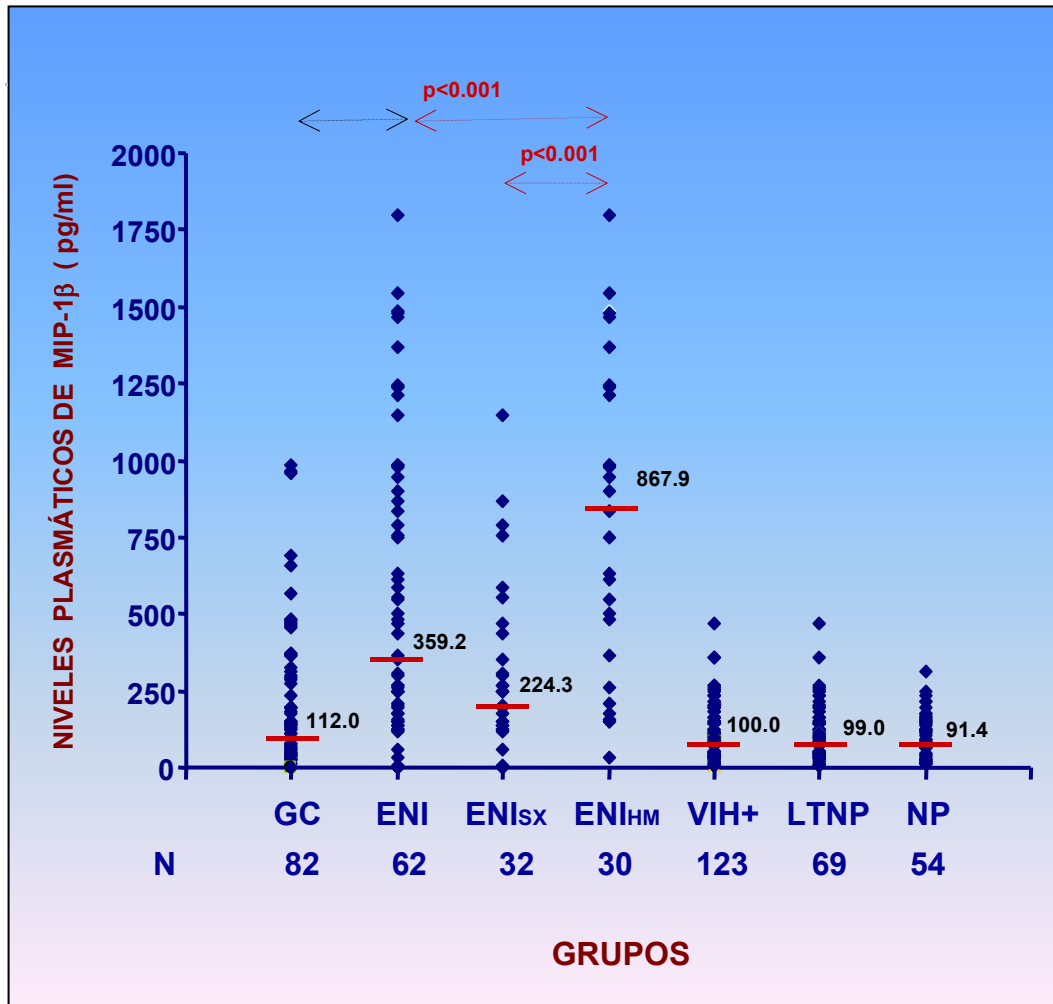
**TABLA 42. NIVELES PLASMÁTICOS DE RANTES.**

GRUPO	pg/ml MEDIANA	IQR 25% - 75%	MIN – MÁX
GC	1621.0	1478.1 – 1765.8	1131.5 – 2254.4
ENI	1425.7	910.0 – 1648.0	36.0 – 2033.4
ENI <sub>SX</sub>	1585.5	1341.7 – 1656.4	36.0 – 2033.4
ENI <sub>HM</sub>	1263.7	531.8 – 1561.1	65.9 – 1969.3
VIH+	1330.2	637.2 – 1761.7	0.0 – 3039.0
LTNP	1458.0	658.0 – 1787.6	0.0 – 3039.0
NP	1267.5	599.4 – 1752.1	0.0 – 2587.0

**TABLA 43. NIVELES PLASMÁTICOS DE MIP-1 $\alpha$ .**

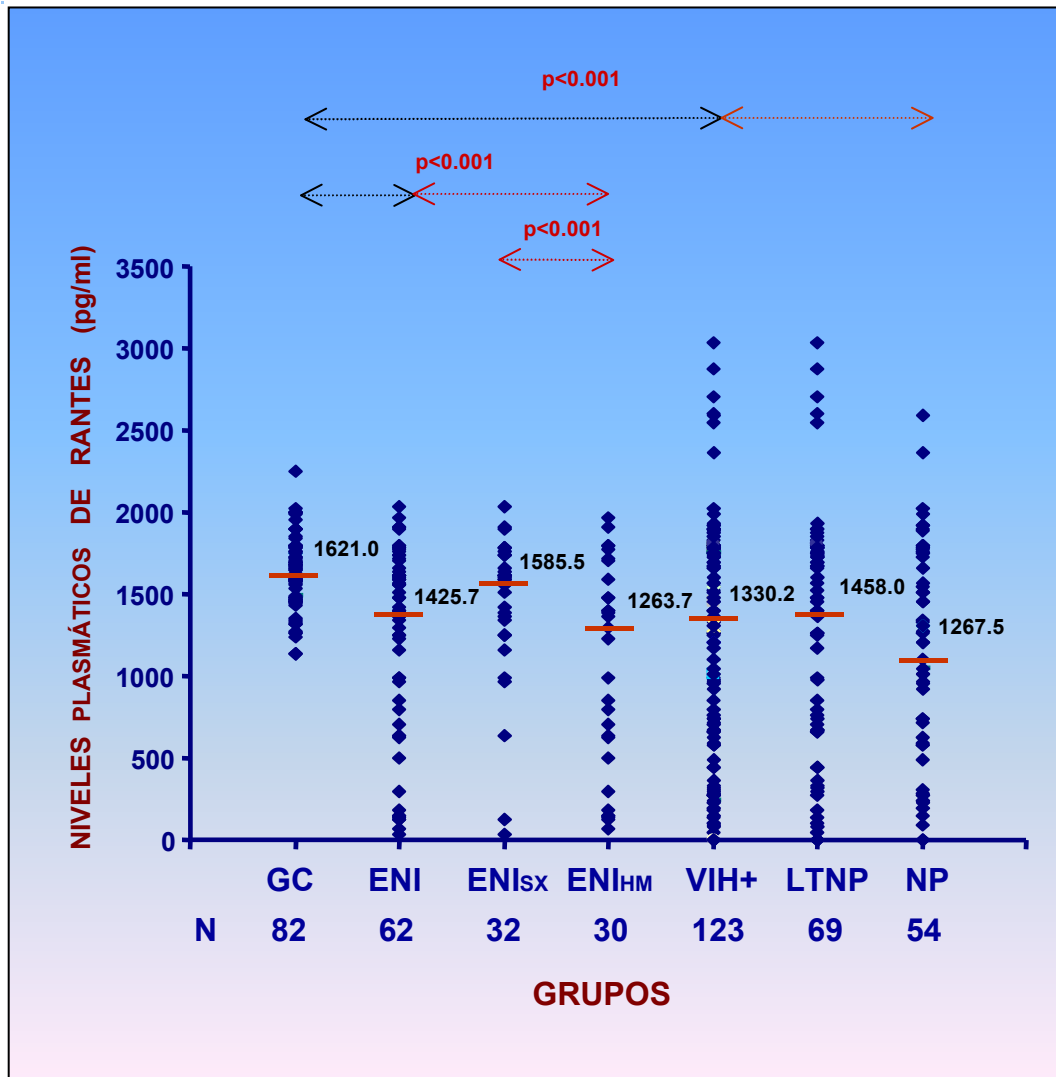
GRUPO	pg/ml MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN – MÁX
GC	24.3	14.6 – 42.1	0.2 – 101.3
ENI	21.9	12.3 – 41.7	0.0 – 102.9
ENI <sub>SX</sub>	17.2	8.4 – 34.8	1.3 – 71.6
ENI <sub>HM</sub>	23.9	13.9 – 44.4	0.0 – 102.9
VIH+	114.0	70.5 – 590.5	2.0 – 1919.7
LTNP	86.5	61.0 – 122.0	2.0 – 563.0
NP	665.7	84.8 – 1470.0	22.0 – 1919.7

FIGURA 17. NIVELES PLASMÁTICOS DE MIP-1 $\beta$ .



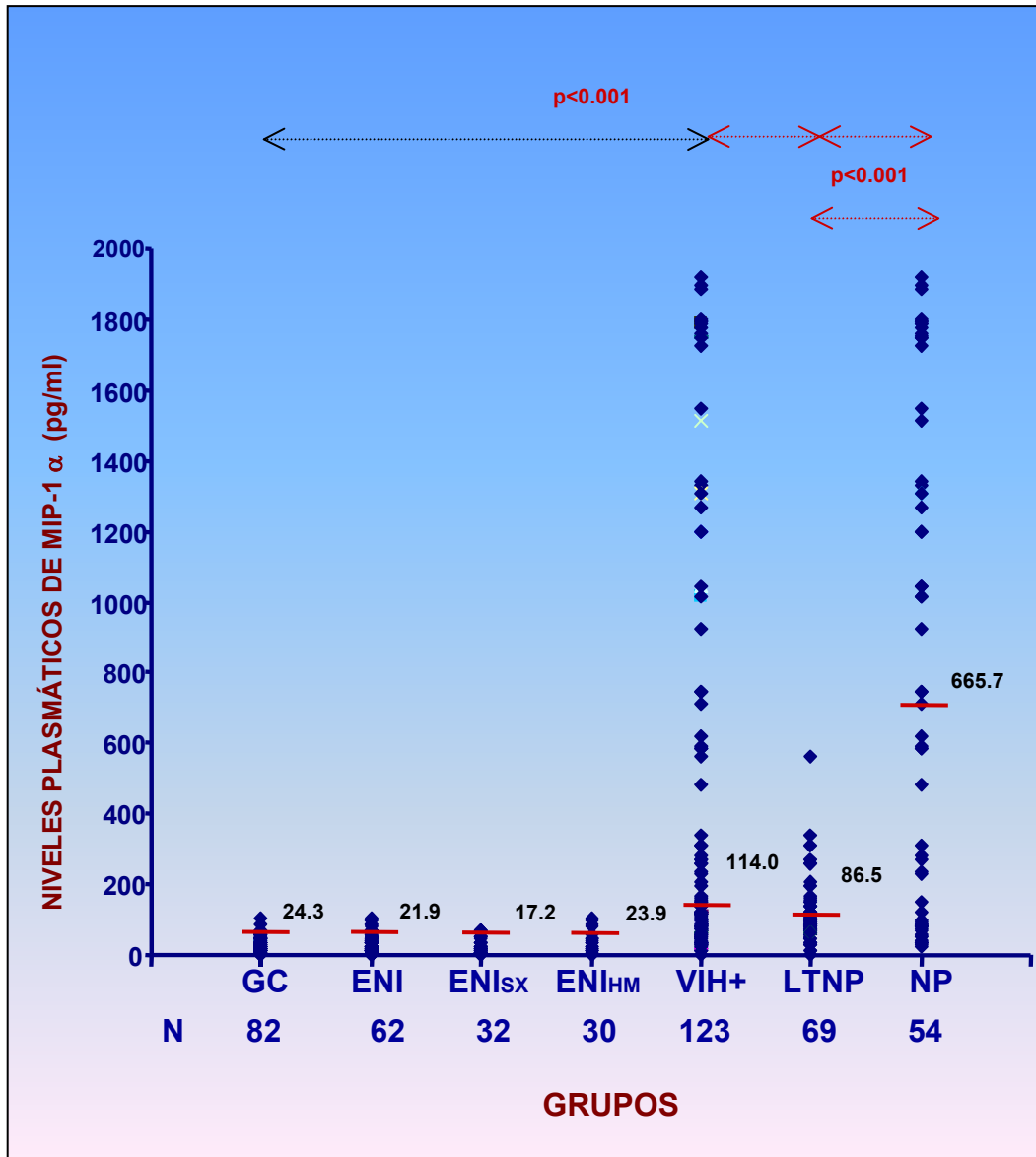
Los puntos representan la distribución de los valores del nivel plasmáticos (pg/ml) de MIP-1 $\beta$  y la línea horizontal, su mediana. Los ENI y de éstos, los ENI<sub>HM</sub>, tuvieron cifras significativamente superiores a las del GC; de tal forma que y con lo que respecta a las concentraciones plasmáticas de MIP-1 $\beta$ , son diferentes ENI<sub>SX</sub> y ENI<sub>HM</sub>. Mientras que los valores de los subgrupos VIH+, no difieren del control y presentaron menos dispersión.

FIGURA 18. NIVELES PLASMÁTICOS DE RANTES.



Los puntos representan los valores de la distribución de los niveles plasmáticos (pg/ml) de RANTES y la línea horizontal, su mediana. Sólo los individuos ENISx tuvieron concentraciones de RANTES semejantes a las del GC. Mientras que los pacientes VIH+ tuvieron una mediana más baja y valores más dispersos.

FIGURA 19. NIVELES PLASMÁTICOS DE MIP-1 $\alpha$ .



Los puntos representan los valores del nivel plasmáticos (pg/ml) de MIP-1 $\alpha$  y la línea horizontal, la mediana. No hubo diferencia en la distribución de los valores entre el GC y el grupo y subgrupos ENI. En cambio, en el caso de los pacientes VIH+ fue muy dispersa y con medianas significativamente elevadas a las del GC; siendo más evidente esta diferencia con los pacientes NP, quienes tuvieron las concentraciones plasmáticas de RANTES más elevadas.



## 5. 6 GENOTIPOS SDF1-3'A.

Los hallazgos muestran que la homocigocia SDF1+/+ estuvo uniformemente distribuida entre los grupos de estudio (Ver TABLA 44). La frecuencia de la variante heterocigota para el alelo SDF1-3'A fue más alta en el grupo VIH+, con 51.3%; siendo estadísticamente significativa la diferencia con la del GC (37.5% y  $p=0.05$ ) y con la del grupo ENI de (23.3% y  $p<0.001$ ) la menor frecuencia fue la del subgrupo ENI<sub>SX</sub> con 16.7%, mientras que la del ENI<sub>HM</sub> fue de 30.0%. La frecuencia de esta variante tampoco es diferente entre los subgrupos de pacientes VIH+, 59.8% para el LTNP y 41.1% para el NP.

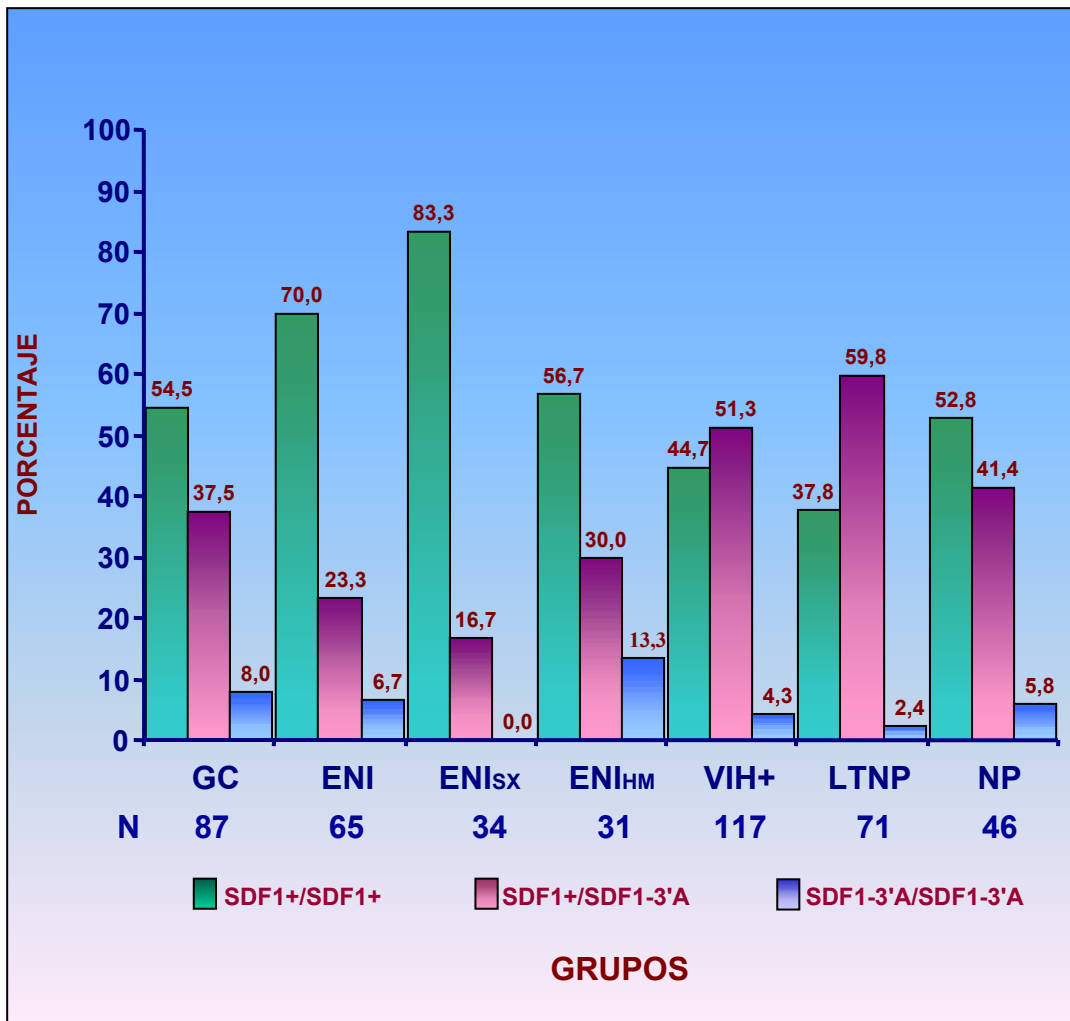
Por lo que se refiere al genotipo SDF1-3'A/3'A, no hubo diferencias significativas entre los tres grupos de estudio; cabe resaltar que los cuatro individuos ENI con mutación homocigota para el alelo SDF1-3'A fueron del subgrupo ENI<sub>HM</sub> (13.3%). Por otro lado, esta variante genotípica estuvo sub-representada en el subgrupo LTNP (2.4%) con respecto al GC (8.0%), al grupo ENI (6.7%) y al subgrupo NP (5.8%). (Ver FIGURA 20).

**TABLA 44. FRECUENCIA DE GENOTIPOS SDF1-3'A.**

GRUPO (N)	GENOTIPO N(%)		
	SDF1+/-	SDF1+/3'A	SDF13'A/3'A
CONTROL (88)	49(55.7)	33(37.5)	6(8.0)
ENI (60)	42(70.0)	14(23.3)	4(6.7)
ENI <sub>SX</sub> (30)	25(83.3)	5(16.7)	0(0)
ENI <sub>HM</sub> (30)	17(56.7)	9(30.0)	4(13.3)
VIH+ (152)	68(44.7)	78(51.3)	6(4.3)
LTNP (82)	31(37.8)	49(59.8)	2(2.4)
NP (70)	37(52.8)	29(41.4)	4(5.8)

La homocigocia SDF1-3'A ha sido asociada a retardo en la progresión de la infección hacia SIDA. En nuestra cohorte sólo 2/82 (2.4%) pacientes LTNP tuvieron este genotipo. Por otro lado 49/82 (59.8%) de ellos, fueron heterocigotos. Contrariamente a lo reportado, sólo el 16.7% (5/30) de los ENI<sub>SX</sub> fueron SDF1+/3'A, mientras que el 30% (9/30) de los ENI<sub>HM</sub> tuvieron esta variante genotípica.

**FIGURA 20. DISTRIBUCIÓN DE GENOTIPOS SDF1-3'A EN LA COHORTE DE ESTUDIO.**



La homocigocia SDF1-3'A estuvo sub-representada en los individuos del subgrupo LTNP (2.4%), mientras que el 13.3% de los ENI<sub>HM</sub> tuvieron esta variante genética. Por otro lado, la heterocigocia (SDF1+/3'A) estuvo sobre-representada entre los LTNP (59.8%).

## 5.7 NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1.

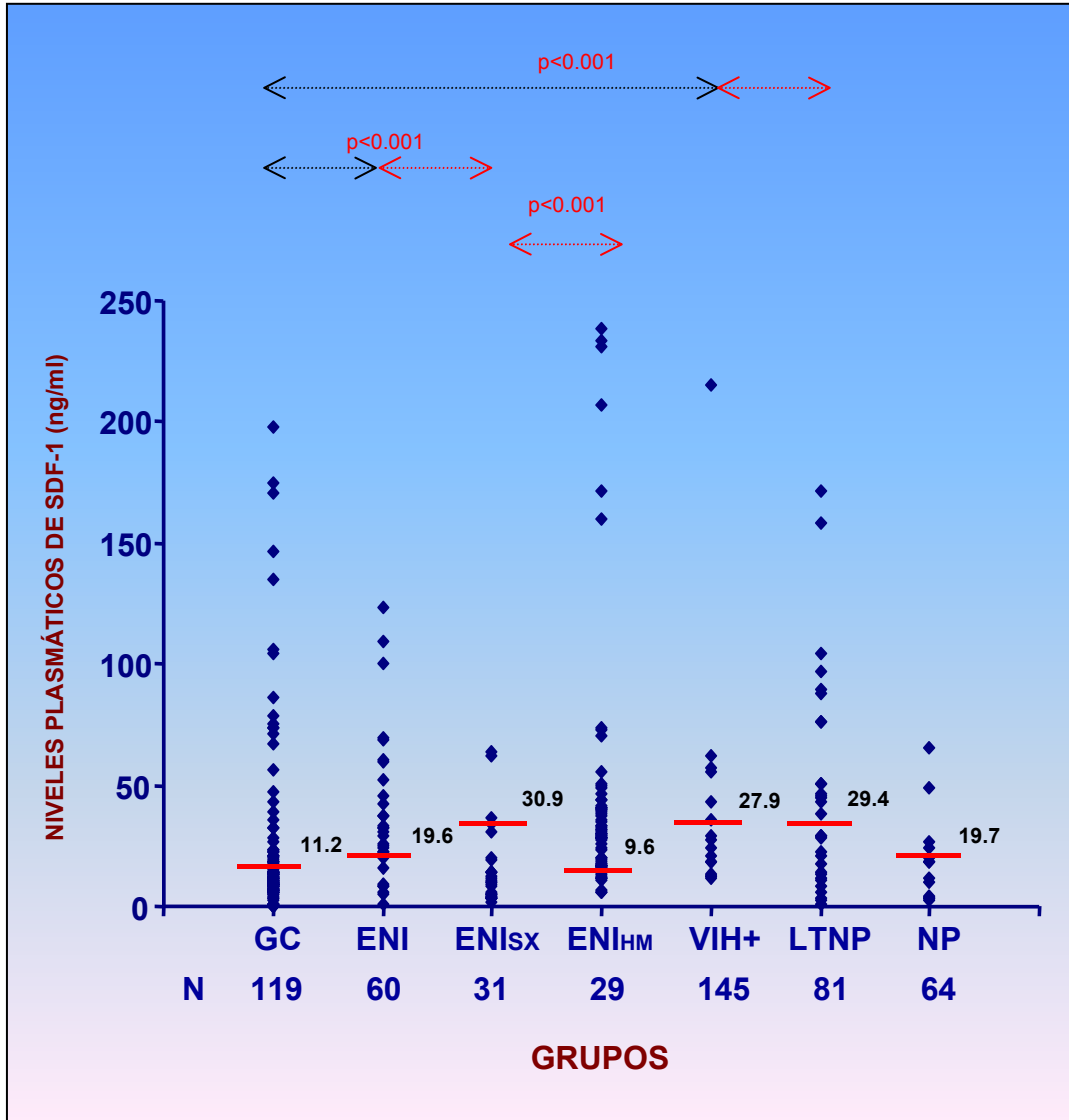
Los valores mínimo y máximo de la concentración plasmática (ng/ml) de SDF-1 de la cohorte total fueron 0.00 y 238.6. La TABLA 45 resume los niveles circulantes de SDF-1 en los diferentes subgrupos de estudio. El grupo GC estuvo compuesto por 119 donantes voluntarios sanos, el grupo ENI estuvo compuesto por 29 ENI<sub>HM</sub> y 31 ENI<sub>SX</sub>; el subgrupo LTNP estuvo formado por 81 pacientes y el de NP por 46. Los individuos ENI<sub>SX</sub> presentaron una concentración plasmática tres veces superior a la del GC, con  $p=0.0002$ ; no así el grupo ENI<sub>HM</sub>, con quien no hubo diferencia ( $P=0.15$ ). Los subgrupos ENI son diferentes entre sí, la media del subgrupo ENI<sub>SX</sub> también es tres veces superior a la de los ENI<sub>HM</sub>, con una  $p=0.0002$ . Por otro lado, los niveles plasmáticos de SDF-1 fueron significativamente más altos en los pacientes LTNP con respecto al grupo GC ( $p=0.0001$ ). (Ver FIGURA 21).

**TABLA 45. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE SDF-1.**

GRUPO	ng/ml MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
GC	11.2	7.9 – 20.3	0.0 - 198.2
ENI	19.5 <sup>&amp;</sup>	7.9 – 35.6	1.2 - 123.7
ENI <sub>SX</sub>	30.9	20.3 – 48.6	1.3 - 64.1
ENI <sub>HM</sub>	9.6	4.0 – 14.2	1.2 - 123.7
VIH+	27.9 <sup>©</sup>	15.2 – 42.6	0.4 - 238.6
LTNP	29.4	7.4 – 40.8	5.4 - 238.6
NP	19.7	3.72 – 42.9	0.4 – 215.1

La barra horizontal representa la mediana de la distribución de los niveles plasmáticos de SDF-1. La mediana de los individuos ENI fue significativamente superior a la del GC (<sup>&</sup>  $p<0.001$ ); lo mismo pudo observarse en el caso de los VIH+ (<sup>©</sup>  $p=0.001$ ).

**FIGURA 21. NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1.**



La línea horizontal representa la mediana de las cifras de SDF-1 en plasma. En el grupo ENI, y en especial en el subgrupo ENISX, la distribución de los valores de SDF-1 plasmático fue menos dispersa y con una mediana más alta que la de los ENIHM. Los pacientes VIH+ también tuvieron una mediana significativamente más alta que el GC y de ellos el subgrupo LTNP.

## 5.8 NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1 Y GENOTIPOS SDF1.

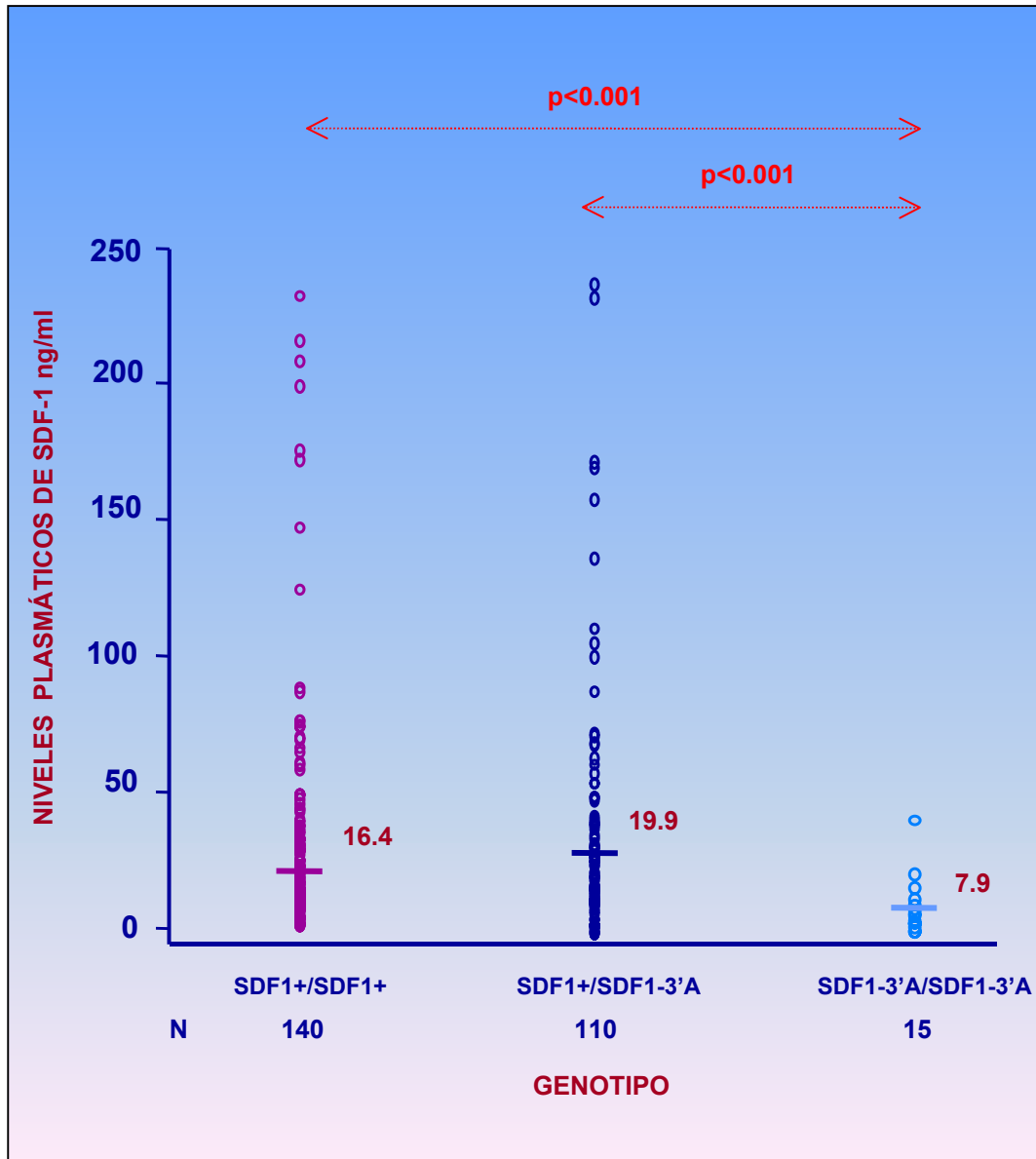
Se compararon los niveles plasmáticos de SDF-1 entre los tres genotipos para la mutación SDF1-3'A (ver TABLA 46 y FIGURA 22 ). La variante homocigota SDF1-3'A presentó la mediana más baja (7.9 ng/ml) e IQR de 5.1ng/ml – 14.1 ng/ml; valor que difiere significativamente ( $p=0.005$ ) con la variante *wild type* (SDF1+/+), cuya mediana es de 16.4 ng/ml (IQR=8.95ng/ml – 34.45 ng/ml), y con la heterocigota ( $p=0.001$ ), quienes tuvieron una mediana de 19.9 ng/ml con un IQR de 9.8 ng/ml – 40.8 ng/ml. Mientras que no se hallaron diferencias entre los individuos homocigotos *wild type* y los que presentaron la variante heterocigota ( $p=0.214$ ).

**TABLA 46. NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1 Y GENOTIPOS SDF1-3'A.**

GENOTIPO	N	ng/ml MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
SDF1+/+	140	16.4	8.9 – 34.5	0.4 – 207.3
SDF1+/3'A	110	19.9	9.8 – 40.8	0.0 – 238.6
SDF1-3'A/3'A	15	7.9	5.1 - 14.1	4.0 – 43.0

Los individuos con homocigocia SDF1-3'A tuvieron una mediana del nivel plasmático de SDF-1, significativamente menor que las otras dos variantes genotípicas.

FIGURA 22. NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1 Y GENOTIPOS SDF1-3'A.



La línea horizontal representa La mediana de la concentración plasmática de SDF-1 en función de la variante genotípica SDF1-3'A. Los individuos con homocigocia (SDF1-3'A/3'A) presentaron niveles plasmáticos de SDF-1 significativamente menores; de tal forma que, esta variante genética podría estar relacionada con menor producción de SDF-1.

## 5. 9 NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-16.

Se midieron los niveles plasmáticos de IL-16 en los diferentes grupos tanto de pacientes infectados por el VIH como ENI y controles. La concentración sérica de IL-16 fue significativamente más alta en los ENI<sub>HM</sub> y en los NP (con medianas de 1062.8 pg/ml y 1078.2, respectivamente), que en el GC (mediana=677.3 pg/ml), siendo estas diferencias significativas con valores de  $p=0.004$  para GC vs ENI<sub>HM</sub> y  $p<0.001$  para GC vs NP. Por otro lado, el GC no presentó diferencias con el LTNP (mediana=916.6 y  $p=0.2$ ). Tampoco hubo diferencias entre los grupos ENI y LTNP ( $p=0.23$ ) mientras que los valores de los ENI Y NP si lo son, con una  $p=0.039$ . También los pacientes NP presentan cifras de IL-16 más elevadas que los LTNP, con  $p=0.005$ . (Ver TABLA 47, FIGURA 23).

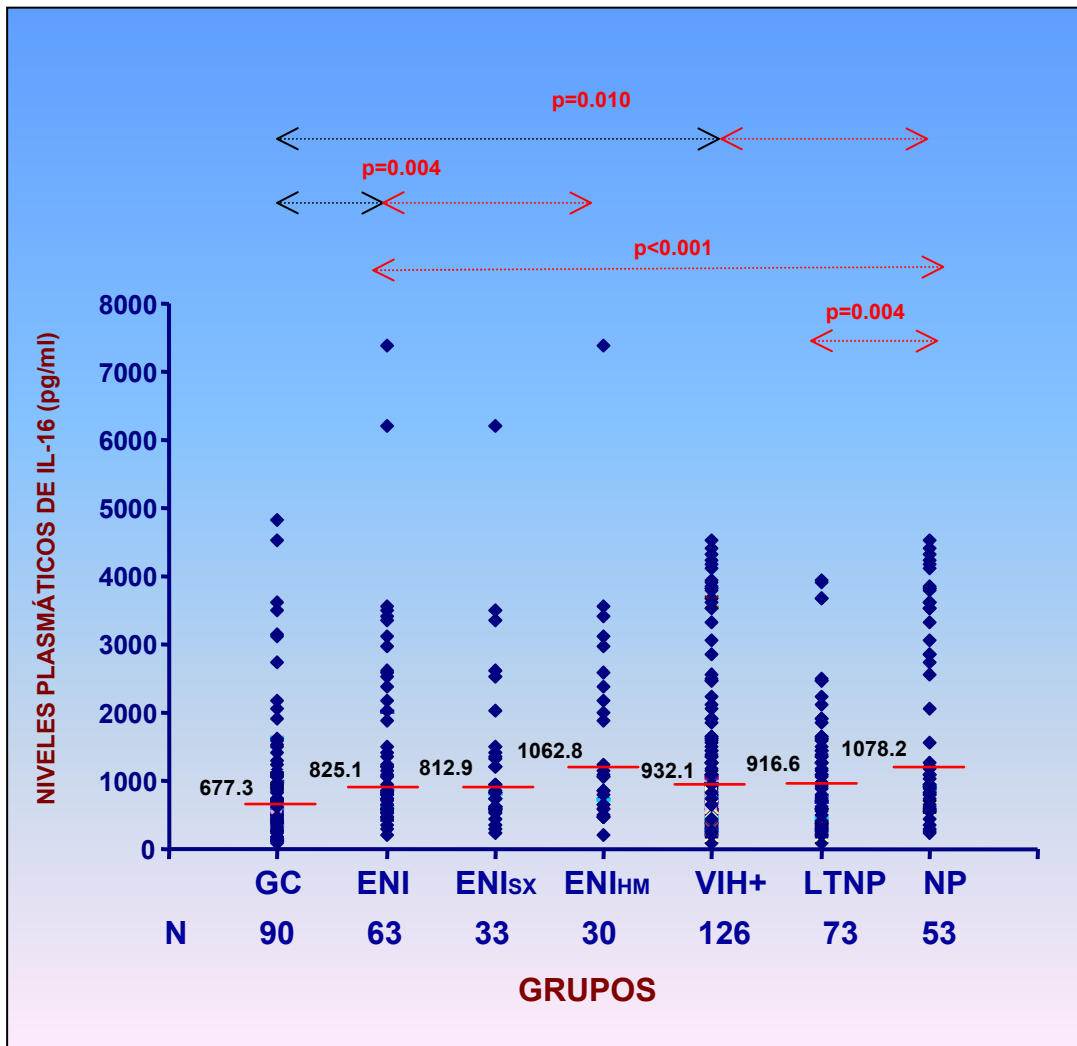
**TABLA 47. NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-16.**

GRUPO	pg/ml MEDIANA	IQR 25% - 75%	MÍN - MÁX
GC	677.3	428.7 – 1100.4	102.3 – 4829.1
ENI	837.2	596.0 – 2188.9	194.1 – 7382.
ENI <sub>sx</sub>	812.9	596.0 – 1347.0	238.0 – 6192.1
ENI <sub>HM</sub>	1062.8	649.8 – 2188.9	194.1 – 7382.2
VIH+	932.1	563.4 – 1862.3	102.7 – 4542.2
LTNP	916.6	396.7 – 1451.6	102.7 – 3933.5
NP	1078.2	721.0 – 3528.2	229.6 – 4542.2

**Tanto los ENI como los pacientes VIH+ tuvieron medianas significativamente superiores a las del grupo control.**



FIGURA 23. NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-16.



La línea horizontal representa la mediana de la concentración plasmática de IL-16 (pg/ml). Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre los valores de los ENI<sub>HM</sub> y los ENI<sub>sx</sub>; los ENI<sub>HM</sub> con mediana superior a la de los ENI<sub>sx</sub>; lo mismo sucede entre NP y LTNP.

## **RESUMEN DE RESULTADOS**

## 5.10 RESUMEN DE RESULTADOS.

### SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T.

Los subgrupos de pacientes VIH+ (LTNP y NP), tuvieron niveles de células T CD4+, significativamente menores que los grupos GC y ENI. y es en los pacientes NP donde se marcó el deterioro inmunitario. Fueron también estos subgrupos quienes tuvieron una significativa expansión de células T CD8+ en PBMC, con respecto a los grupos control y ENI y por tanto, una relación CD4/CD8 más disminuida.

En los pacientes NP hubo un marcado incremento de células T CD4+ y CD8+ activadas, una disminución de células T CD8+ que expresan CD28. Además, en los pacientes con SIDA, se observó una disminución de las células T CD8+ *naive* y un aumento de las células T CD8+ memoria. Estos resultados sugieren un sistema inmune general y persistentemente activado.

### EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T CD4+ Y CD8+.

Por lo que se refiere a la expresión de CCR5 en células T, se pudo observar que son los pacientes **VIH+** los que tuvieron niveles de **CCR5 significativamente inferiores** a los grupo GC y ENI. Al subdividir los grupos de estudio se encontró que sólo existe significancia estadística entre el subgrupo **LTNP** con respecto al GC y al grupo ENI.

### POLIMORFISMO CCR5 $\Delta$ 32.

No se hallaron individuos homocigotos (CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32) para la delección  $\Delta$ 32 del gen CCR5 en ninguno de los grupos de estudio; variante genética que se relaciona con resistencia a la infección por el VIH<sup>100,553</sup>. Mientras que la heterocigocia (**CCR5+/ $\Delta$ 32**), estuvo presente en el **17.6%** (6/34) de los **ENI<sub>SX</sub>** y sólo en 6.5% de los ENI<sub>HM</sub>, y también estuvo sobre-

representada entre los **LTNP** ya que sólo la tuvieron el 10.7% de los pacientes del subgrupo NP y el **25.3%** de LTNP y únicamente el 14.5% del GC y 12.3% de los ENI. Recordemos que fueron los pacientes LTNP quienes tuvieron niveles disminuidos de CCR5 en células T. Con tendencia al límite, los ENI tienen menos probabilidad de tener genotipo CCR5+/ $\Delta$ 32 que los LTNP y éstos tienen 3 veces más probabilidad de tenerla con respecto a los NP.

#### **ALELO CCR5 $\Delta$ 32 Y EXPRESIÓN DE CCR5 EN CÉLULAS T.**

Aunque no hay diferencia en la expresión de CCR5 en células T CD4+ entre las dos variantes genéticas halladas en la cohorte de estudio, el análisis estableció que el patrón de expresión del co-receptor de muchos individuos mostró una buena correlación con el genotipo CCR5, ya que fueron unos pocos individuos CCR5+/+ quienes mostraron niveles bajos de CCR5, y las células T CD4+ de una minoría de sujetos CCR5+/ $\Delta$ 32 expresaron niveles extremadamente altos de la molécula. En cambio, no se observa la misma tendencia en lo que se refiere a células T CD8+.

Cuando la cohorte se dividió por grupos de estudio, los ENI CCR5+/ $\Delta$ 32, tuvieron niveles de CCR5 tanto en células T CD4+ como CD8+, menores que los de la variante CCR5+/+; pero esta diferencia no fue significativa. Lo que sí se ha podido observar es que los individuos heterocigotos para la delección  $\Delta$ 32, tuvieron cifras prácticamente muy concentradas en valores bajos.

Tampoco se hallaron diferencias en la expresión de CCR5 en células T CD4+ y CD8+ *versus* genotipo CCR5 $\Delta$ 32 entre los otros subgrupos. Hemos de resaltar que los niveles de CCR5 en células T CD8+

son extremadamente heterogéneos y que los pacientes LTNP con genotipo CCR5+/+ tuvieron niveles de CCR5 tanto en células T CD4+ como CD8+, significativamente inferiores a los del GC.

#### **NIVELES PLASMÁTICOS DE $\beta$ -QUIMIOCINAS.**

En general, los individuos ENI tuvieron concentraciones plasmáticas de **MIP-1 $\beta$**  más altas que los de GC y VIH+; aunque los ENI<sub>SX</sub> tuvieron sus niveles dos veces más altos que el GC, fue en los ENI<sub>HM</sub> en quienes se observaron los niveles más altos de esta quimiocina (7 veces más). Es importante hacer notar que estos altos niveles en los ENI parecen no ser consecuencia de un estado de activación, ya que estos individuos no tuvieron niveles altos del marcador de activación CD38 en células T. No se hallaron diferencias entre los valores del GC y VIH+.

Los ENI tuvieron niveles plasmáticos de **RANTES** más bajos que el GC y únicamente los valores de los ENI<sub>SX</sub> fueron semejantes a los del GC. Tampoco los **LTNP** se diferencian de los individuos sanos y sí de los NP, cuyos valores de RANTES fueron más bajos.

Los niveles plasmáticos de **MIP-1 $\alpha$**  entre los ENI y el GC son muy semejantes; en cambio, los pacientes VIH+ tuvieron sus concentraciones plasmáticas significativamente **umentadas**, y más aún los NP que los LTNP. Por lo que una elevación en el nivel plasmático de MIP-1 $\alpha$  prodría ser un predictor de progresión a SIDA.

#### **EXPRESIÓN DE CXCR4 EN CÉLULAS T CD4+ Y CD8+.**

Los niveles de CXCR4 en células T CD4+ de los ENI<sub>SX</sub> fueron significativamente menores a los de los ENI<sub>HM</sub>, mientras que los pacientes **LTNP** tuvieron valores más bajos del co-receptor a los del grupo NP y muy

semejantes a los de los grupos GC y ENI. En cuanto al nivel de este co-receptor en células T CD8+, también se observaron concentraciones inferiores en los LTNP que en los sujetos sanos e individuos ENI, sólo que no hay diferencias entre LTNP y NP.

#### **GENOTIPO SDF1-3'A.**

En nuestra cohorte sólo **2/82** (2.4%) de los pacientes **LTNP** tuvieron genotipo **SDF1-3'A/3'A** variante que se asocia a retardo en la progresión hacia SIDA<sup>102</sup> frente a 8.0% del GC y 6.7% del ENI (13.3% ENI<sub>HM</sub>) y 5.8% NP. Contrariamente a lo reportado,<sup>102</sup>, sólo el **16.7%** (5/30) de los ENI<sub>SX</sub> fueron heterocigotos **SDF1+/3'A**, mientras que el **30%** (9/30) de los ENI<sub>HM</sub> tuvieron esta variante genotípica. A pesar de ello, no hay diferencia significativa en la frecuencia de la mutación SDF-1 3'A entre ENI y GC; por lo que no la encontramos asociada a resistencia a la infección por VIH-1. Por otro lado, entre los **LTNP** el genotipo **SDF1+/3'A** estuvo sobre-representado; ya que 49/82 (**59.8%**) de ellos presentaron heterocigosis frente a un 37,5% del GC y 23.3% del grupo ENI.

#### **NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1.**

Por lo que se refiere a la quimiona SDF-1, se pudo observar que los niveles plasmáticos de ella fueron más altos en los ENI que en el GC y que los valores de los ENI<sub>SX</sub> fueron significativamente superiores que los de los ENI<sub>HM</sub>. EN el caso de los pacientes VIH+, los niveles plasmáticos de **SDF-1** fueron más altos en **LTNP** que en el GC y también significativamente más altos que en NP.

#### **NIVELES PLASMÁTICOS DE SDF-1 Y GENOTIPO SDF1-3'A.**

Los individuos con homocigocia SDF1-3'A/3'A tuvieron niveles plasmáticos de SDF-1 significativamente más bajos que los de las otras dos variantes genotípicas.

#### **NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-16.**

Tanto los individuos ENI como los pacientes VIH+, tuvieron niveles plasmáticos de IL-16 significativamente superiores a las del grupo control. Resaltando que la concentración plasmática de los ENI<sub>HM</sub> es superior a la de los ENI<sub>SX</sub> y la de los NP, superior a la de los. LTNP.

## 6. DISCUSIÓN



## 6 DISCUSIÓN.

La exposición al VIH-1 puede resultar en infección por el virus, la cual se define por seroconversión y detección de anticuerpos específicos contra el VIH-1. Sin embargo, es claro que existen mecanismos efectivos que evitan la infección, pues está documentado que hay personas expuestas al VIH-1 a través de contacto sexual<sup>577</sup> o parenteral, mediante productos sanguíneos contaminados, que no llegan a infectarse<sup>641-643</sup>; estos individuos han sido identificados, entre parejas discordantes quienes practican sexo no protegido<sup>418,422,423,425,426,644</sup>, prostitutas<sup>427-429</sup>, adictos a drogas intravenosas<sup>430</sup> e hijos de madres seropositivas al VIH-1<sup>433,434</sup>, son individuos en quienes no se observa seroconversión a pesar de múltiples exposiciones documentadas al VIH-1, y se les conoce como expuestos no infectados (ENI).

Por otro lado, la patogenia de la enfermedad por el VIH es compleja; su naturaleza multifactorial está reflejada por las tasas altamente variables, de progresión de enfermedad que se observan en los individuos infectados por el virus. La importancia de los factores del huésped en la modulación de las tasas de progresión de enfermedad está subrayada por la observación de la existencia de individuos que fueron infectados por una fuente común, pueden presentar desenlaces clínicos ampliamente variables<sup>645,646</sup>.

El tiempo medio desde la infección por el VIH-1 hasta el desarrollo de SIDA es de 8-10 años, pero ya desde el inicio de la década de los 90's<sup>60,87</sup> se había documentado la existencia de una pequeña proporción de pacientes (actualmente entre un 5-10%), cuya infección por el VIH-1 no

progresaba y han sido caracterizados como no progresores a largo plazo (LTNP). Estos pacientes han sido identificados entre personas infectadas cuyos factores de riesgo incluye exposición sexual, adicción a drogas intravenosas y transfusiones<sup>60,82,85,87,647</sup>.

Los LTNP están estrictamente definidos como aquellos pacientes con una infección documentada de más de 13 años y que, sin tratamiento anti-retroviral, no presentan síntomas, la cifra de células T CD4+ es normal (> 600/ $\mu$ l), y se ha mantenido prácticamente igual en los últimos cinco años y, la carga viral permanece baja o indetectable a pesar del periodo prolongado de la infección por el VIH-1. Por el contrario, quizás el 10% de todas las personas infectadas con el VIH-1 son progresores rápidos<sup>99,648</sup>.

La identificación de estos pacientes ha permitido la comparación de personas con diferentes tasas de progresión de enfermedad a fin de tratar de aclarar los factores que determinan el riesgo individual para progresión.

La existencia de pacientes LTNP e individuos ENI sugiere que, tanto la inmunidad natural como la adquirida contra la infección por el VIH-1 existen y, que podrían ser los principales determinantes del desenlace clínico de la infección.

De tal forma que, la interacción de complejos y numerosos factores del virus, como virulencia del patógeno y, del huésped; genéticos, respuesta inmune y el microambiente de ciertas citocinas, podrían determinar no solo el curso de la enfermedad sino también el riesgo para la adquisición inicial del VIH-1.

Estudios inmunológicos y genéticos de personas LTNP y ENI, así como datos de estudios de infección primaria por el VIH-1, han ayudado a

aclarar los mecanismos por los cuales algunas personas son resistentes a la infección por el VIH-1 o muestran una tasa muy lenta de progresión de enfermedad.

Desde mediados de los 80's se sabe que la presencia de la molécula CD4 en la superficie de la célula era necesaria pero no suficiente para la entrada del VIH-1 a la célula diana. Así, un avance en nuestro entendimiento de la patogenia del VIH-1 y por tanto, en el entendimiento de los factores del huésped que podrían afectar la susceptibilidad y progresión de la infección por el VIH-1, se dio en 1995, cuando fueron caracterizadas las  $\beta$ -quimiocinas RANTES, MIP-1 $\beta$  y MIP-1 $\alpha$  como los principales componentes supresores de la replicación del VIH-1, producidos por las células T<sup>296</sup>.

Fue en 1996 cuando Feng *et al*<sup>506</sup>, identificaron a la molécula CXCR4, receptor de la  $\alpha$ -quimiocinas SDF-1, y que se encuentra en las células T, como la molécula que las variantes SI, ahora llamadas X4, del VIH-1, utilizan como co-receptor necesario para la entrada del VIH-1 a la célula diana. En el mismo año, varios grupos publicaron resultados mostrando que el receptor para RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  era un receptor de quimiocinas llamado CCR5 y que se encuentra en macrófagos, monocitos y algunas células T<sup>28,29,507-509,545</sup>; co-receptor preferentemente usado por las cepas virales NSI<sup>508,509</sup>, ahora llamadas cepas R5. No obstante, estas restricciones no son absolutas ya que algunos virus son capaces de utilizar ambas clases de receptores y son entonces referidos como virus duales<sup>43,649</sup>. Además, ciertos subgrupos de virus son capaces de utilizar los receptores CCR2b<sup>28</sup> y CCR3<sup>508</sup> para entrar a la célula diana.

La interacción entre la proteína de envuelta del virus gp120 y la molécula CD4 induce un cambio conformacional que permite la interacción del virus con el receptor de quimiocinas y ultima la fusión del virus y la membrana celular del huésped<sup>546,650</sup>.

El curso usual de la enfermedad de un individuo infectado por el VIH-1 comienza, inmediatamente después de la seroconversión, con la transmisión de una cepa fenotipo R5, aún en individuos expuestos a mezcla de ambos virus<sup>38,39</sup>; como el virus muta y el fenotipo cambia, las cepas X4 tienden a emerger durante los estadios avanzados de la infección en aproximadamente el 50% de los individuos infectados<sup>31,32,80,113,599,651,652</sup>; estas cepas han sido asociadas a citopatogenicidad aumentada, resultando en una deplección de células T más rápida<sup>38,80,114,652-654</sup>. Esta transición entre fenotipo ha sido asociada a evolución en el uso del co-receptor<sup>43,210</sup>.

Por lo tanto, un modelo que actualmente tiene cabida, con sus excepciones, ya que existen cepas con tropismo dual<sup>28,508</sup>; es que las cepas R5 del VIH-1 infectan macrófagos, monocitos y células T mediante el uso de la expresión de CD4 y CCR5 del huésped, como co-receptores. Mientras que las cepas X4 infectan células T usando CD4 y CXCR4 como co-receptores<sup>36</sup>.

Por lo tanto, los receptores de quimiocinas podrían bloquear la entrada del VIH-1 por interferir la unión del virus con el receptor o porque al unirse al receptor, disminuyen su disponibilidad<sup>520</sup>. De tal forma que las quimiocinas RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  pueden bloquear las cepas R5 del VIH-1, mientras que SDF-1, ligando natural para CXCR4, a las cepas X4.

Por lo que, el uso de CCR5 por el VIH parece ser crítico para mantener una infección exitosa en individuos susceptibles.

Antes del descubrimiento de la actividad anti-VIH de las  $\beta$ -quimiocinas, altos niveles de factores solubles supresores del VIH-1 fueron encontrados asociados a infección por el VIH-1 asintomática<sup>439</sup>. Esta asociación, junto con los mecanismos antivirales conocidos de estas quimiocinas condujo a la hipótesis que altos niveles de RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ , podrían estar asociados con resistencia a la infección primaria y/o avanzada por el VIH-1. Con base en esta idea, la sobreproducción de estas moléculas se ha relacionado con resistencia a la infección en individuos ENI<sup>528,574-577</sup>, baja transmisión maternal del virus<sup>580</sup> y a un mejor estado clínico en individuos VIH+ sin terapia anti-retroviral<sup>107,578,582-585,655</sup>. Sin embargo, no podemos dejar de mencionar que a pesar del establecimiento de RANTES, MIP-1 $\beta$  y MIP-1 $\alpha$  como los principales mediadores solubles de la actividad anti-VIH, y que en cuanto a los linfocitos T, las células CD8+ son una fuente potente de quimiocinas<sup>656</sup>, aún no hay evidencia concluyente acerca de papel de las respuestas anti-VIH mediadas por las  $\beta$ -quimiocinas en la patogenia de la infección<sup>574,657-659</sup>.

Los datos más importantes de la relación entre sobre-producción de  $\beta$ -quimiocinas (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  y RANTES) y resistencia a la infección comienzan con el análisis de una cohorte de hemofílicos ENI, seguida por Zagury *et al*<sup>574</sup>, encontraron que las PBMC de estas personas producen niveles incrementados de  $\beta$ -quimiocinas cuando son estimuladas con PHA e IL-2 en comparación con las células de controles seronegativos al VIH-1;

los autores sugieren que la resistencia en estos sujetos está mediada inmunológicamente y se reflejó en una liberación más alta de  $\beta$ -quimiocinas en respuesta al estímulo antigénico. Otros datos que refuerzan el papel de estas quimiocinas son los intentos para identificar protección en macacos vacunados realizados por varios investigadores<sup>587-590,592</sup>.

En otro estudio, también *in vitro*, Ullum *et al*<sup>584</sup> asocian un alto nivel de producción de MIP-1 $\beta$  con un riesgo disminuido de progresión a SIDA o muerte; ellos encontraron que los pacientes VIH+ sin SIDA, tuvieron niveles incrementados de producción de RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ ; mientras que los pacientes con SIDA tuvieron producción disminuida de MIP-1 $\beta$  y niveles similares de las otras quimiocinas, cuando fueron comparados con controles. Los resultados que muestran Cocchi *et al*<sup>660</sup>, indican que los individuos HIV+ asintomáticos producen niveles más altos de MIP-1 $\beta$  y MIP-1 $\alpha$  pero no de RANTES, que los donantes sanos o pacientes que progresan a SIDA, lo que sugiere que la producción constitutiva de las  $\beta$ -quimiocinas podría tener un papel importante en el desenlace de la infección. Sin embargo, algunos reportes no han encontrado relación entre niveles de producción de quimiocinas y tasas de progresión<sup>583,661-664</sup> ó protección de infección. Fowke *et al*<sup>665</sup>, encontraron que las PBMC obtenidas de mujeres resistentes al VIH-1 produjeron menos MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  que las células de controles; hecho que hace suponer que en estas poblaciones de riesgo, la resistencia al VIH-1 no está relacionada con sobreproducción de  $\beta$ -quimiocinas.

Así que, aunque las quimiocinas se comportan como potentes factores anti-VIH *in vitro*, su papel *in vivo* en el curso de la infección por el

VIH y progresión de enfermedad no está muy claro. Se han hecho varios estudios tratando de correlacionar los niveles plasmáticos o séricos de las quimiocinas y la protección de infección por VIH-1<sup>575,665,666</sup> o progresión a SIDA<sup>574,593,595,657-660,666-669</sup> pero con resultados conflictivos y difíciles de interpretar.

Hemos estudiado si los niveles de las tres  $\beta$ -quimiocinas pueden ser protectivos contra la infección o contra la progresión de la enfermedad por el VIH-1; para lo cual comparamos las concentraciones plasmáticas entre sujetos no expuestos, individuos con exposición documentada pero no infectados y pacientes seropositivos al VIH-1, encontrando que las mediciones en plasma de MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  y RANTES tienen variabilidad inherente<sup>575,670</sup>; además de ciertas diferencias en los niveles plasmáticos de las quimiocinas entre los grupos de estudio.

El análisis demostró que los individuos ENI (ENI<sub>SX</sub> y ENI<sub>HM</sub>), únicamente tuvieron niveles plasmáticos altos de MIP-1 $\beta$ ; aunque son los expuestos a hemoderivados, en quienes se observaron las cifras más elevadas de la quimiocina con respecto a las personas no expuestas y a los pacientes infectados. Es particularmente notable que MIP-1 $\beta$  es la única quimiocina que se une exclusivamente a CCR5.

Por otro lado, tanto los individuos ENI como los pacientes VIH+ tuvieron niveles plasmáticos de RANTES significativamente menores que los del GC. Por lo que se refiere a los ENI, fueron los ENI<sub>HM</sub> quienes tuvieron los valores más disminuidos y en el caso de los VIH+, los NP; aunque sin diferencias con los LTNP. Además, a diferencia de los reportes que mencionan que los individuos VIH+ presentan niveles circulantes de

MIP-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$  y RANTES inferiores a los de los sujetos VIH negativos<sup>669</sup>, nosotros no encontramos diferencias entre los valores de los grupos control *versus* pacientes seropositivos; tampoco las hubo entre el estado clínico LTNP *versus* NP<sup>658,660</sup>.

Con los resultados mostrados nosotros no encontramos correlación entre niveles plasmáticos de RANTES y resistencia y/o progresión de la infección por el VIH-1<sup>666</sup>.

Ahora bien, el papel de los niveles plasmáticos de RANTES en la protección contra la progresión de la enfermedad por el VIH-1 también es controversial. Un estudio transversal demostró un nivel sérico más alto de RANTES en pacientes con progresión a SIDA que en no progresores<sup>657</sup>. Con base en resultados de un estudio longitudinal donde se incluyeron pacientes VIH+ con diferentes grados de progresión, Polo S *et al*<sup>655</sup>, sugieren que una elevación de RANTES sérico predice una progresión rápida de enfermedad desde los estados precoces de la infección. Por el contrario, en otro reporte<sup>658</sup> no encontraron diferencias en los niveles de quimiocinas entre LTNP y progresores. Muller *et al*<sup>668</sup>, dicen que la proporción aumentada de células activadas CD8+CD38+ en PBMC de los pacientes seropositivos es paralela al aumento de los niveles plasmáticos de RANTES; lo cual podría indicar que la activación inmune es lo que contribuye al aumento de la concentración de la quimiocina en plasma. En nuestra, cohorte únicamente los NP tuvieron un marcado incremento de células activadas con respecto a los LTNP pero niveles muy similares de RANTES.



Es importante enfatizar que ninguna medición de RANTES en suero o plasma refleja los niveles circulantes porque ellos resultan, en gran parte, de la liberación *ex vivo* de la quimiocina durante el procesamiento de la muestra de sangre. Se sabe que RANTES se encuentra almacenado en los  $\alpha$ -gránulos de las plaquetas<sup>671</sup> y es rápidamente liberado durante a coagulación<sup>659,672-674</sup>.

Otro hallazgo sobresaliente de nuestro análisis ha sido el hecho que los pacientes VIH+ fueron los únicos que tuvieron niveles plasmáticos de MIP-1 $\alpha$  significativamente superiores a los del GC y ENI y, que fue en el grupo NP donde se observó el mayor incremento de la quimiocina; hecho que podría estar correlacionado con el estado persistentemente activado del sistema inmune observado en estos pacientes<sup>295,656</sup>.

Por lo tanto y dado que únicamente los individuos ENI<sub>HM</sub> tuvieron niveles plasmáticos excesivamente elevados de MIP-1 $\beta$ , es esta quimiocina la que podría ser, parcialmente, responsable de la resistencia a la infección por el VIH-1, especialmente en los ENI<sub>HM</sub> como ha sido sugerido por hallazgos en pacientes hemofílicos<sup>574</sup>. Además, los niveles plasmáticos incrementados de MIP-1 $\alpha$  que tuvieron los pacientes NP podrían representar un indicador de progresión a SIDA.

Aún en estudio donde se evalúan los cambios en los niveles plasmáticos de las  $\beta$ -quimiocinas después de terapia antirretroviral los resultados presentan controversia<sup>593,675</sup>.

El descubrimiento que los receptores de quimiocinas son usados por el VIH-1 como co-receptores para la entrada celular condujo al descubrimiento de factores genéticos del huésped que podrían afectar la

susceptibilidad a la infección por el VIH-1 o la tasa de progresión de enfermedad una vez establecida la infección.

Tales factores genéticos podrían determinar el desenlace de interacciones entre el virus y el huésped en varios caminos. Por un lado, las respuestas inmunes del huésped contra el VIH están restringidos por los alelos del MHC del individuo. Por otro lado, estudios recientes han mostrado que las características cualitativas y cuantitativas de las respuestas inmunes del huésped podrían ser importantes moduladores de la progresión de la enfermedad. Así, la apreciación del papel de los factores del huésped en la patogenia de la enfermedad por el VIH podría dirigir al diseño de nuevas estrategias terapéuticas.

Genes para un detallado conjunto de quimiocinas circulantes y sus receptores claramente regulan la unión celular y la penetración del VIH. Pero el mejor caracterizado de estos rasgos genéticos es el descubrimiento de un defecto en el gen CCR5 (delección de 32 bp), el cual fue primero identificado en 1996<sup>553</sup> en dos hombres homosexuales y en una cohorte de pacientes hemofílicos<sup>100</sup>; este polimorfismo tiene un impacto importante en la susceptibilidad a la infección por el VIH en individuos homocigotos para este defecto y en la progresión de enfermedad en individuos heterocigotos<sup>100,554,555</sup>, sugiriendo que la expresión de CCR5 puede estar alterada en ellos, y que ésto afecta la replicación *in vivo* del VIH. Aunque el papel protector del polimorfismo del receptor de quimiocinas CCR5 (CCR5-Δ32) en la resistencia y/o progresión de la infección VIH/SIDA es controversial<sup>42,100,102,261,553,612,676</sup>.

Algunos estudios epidemiológicos han mostrado que el genotipo CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 protege ampliamente contra la adquisición del VIH-1 y presumiblemente refleja el fracaso a transmitir inicialmente una cepa R5<sup>100,554,555,602</sup>.

En varios estudios, grandes cohortes de individuos VIH+ fueron analizadas en busca de la presencia del alelo  $\Delta$ 32 y no se identificaron individuos homocigotos para la mutación. Por el contrario, en cohortes de individuos ENI se observó una alta frecuencia de la variante genotípica CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 en comparación con individuos no expuestos, demostrando la clara ventaja protectora conferida por el alelo  $\Delta$ 32<sup>528,555</sup>. No obstante, el efecto protector de este alelo no es absoluto; ya que existen reportes que describen individuos CCR5 $\Delta$ 32/ $\Delta$ 32 que están infectados con el VIH<sup>42,606,608</sup>.

Por otro lado, existen datos que sugieren que los individuos heterocigotos para la mutación CCR5 $\Delta$ 32 tienen progresión retardada a SIDA o a muerte; sin embargo, aunque con pocas excepciones<sup>554,609</sup>, también hay varios estudios en donde se demuestra que personas heterocigotas para la mutación CCR5 $\Delta$ 32 (CCR5+/ $\Delta$ 32) no son menos susceptibles a la infección por el VIH-1<sup>555,602</sup>. Se sabe que los individuos heterocigotos tienen más probabilidad de tener una carga viral más baja, tasas más disminuidas de pérdida de células T CD4+ y, permanecer libres de enfermedad por más tiempo que los individuos CCR5+/ $\Delta$ 32<sup>100,554,555,602</sup>. Así, aunque hay una cierta correlación entre el genotipo heterocigoto y progresión retardada de la enfermedad, no necesariamente todos los individuos CCR5+/ $\Delta$ 32 serán no progresores.

También se ha observado que los linfocitos de individuos con heterocigocia  $\Delta 32$  en comparación con los de los homocigotos CCR5+/CCR5+, muestran, *in vitro*, niveles reducidos de replicación de cepas R5<sup>552-554</sup>, lo cual podría tener una significancia *in vivo*.

Así, para investigar la influencia del alelo  $\Delta 32$  del gen CCR5 en la transmisión o progresión de la infección por el VIH, se han comparado pacientes infectados por el VIH con individuos no infectados pero expuestos, por virtud de su inclusión en grupos de riesgo para SIDA y con sujetos no expuestos al VIH.

En US, la frecuencia del alelo  $\Delta 32$  del gen CCR5 es del 11% en individuos blancos, pero sólo del 1.7% en personas negras; se encuentra en un alto porcentaje en poblaciones Caucásicas de Europa<sup>553,554,602</sup> y en la cohorte de nuestro estudio, la frecuencia global del alelo fue de 15.4%. Por otro lado, al comparar la frecuencia del alelo CCR5- $\Delta 32$  en individuos infectados (18.1%) *versus* no infectados, ENI o donantes sanos (13.5%), no encontramos diferencias significativas, resultados que coinciden con los reportados en la bibliografía<sup>466,553,554,677</sup>.

La reducción en la replicación de cepas R5 observada en linfocitos T CD4+ de individuos CCR5+/ $\Delta 32$ , ha sido correlacionada con el nivel de expresión del CCR5 en la superficie celular. Usando anticuerpos monoclonales anti-CCR5 y mediante un análisis por FCAS, los linfocitos T CD4+ de individuos CCR5+/ $\Delta 32$ , mostraron niveles reducidos del co-receptor. Pero también existe la observación de que los niveles de CCR5 en células T de individuos heterocigotos para la mutación son muy

parecidos con los de los individuos CCR5+/+, hecho que ha sugerido que no sólo el alelo  $\Delta 32$  sea el responsable de la expresión de CCR5<sup>621,622</sup>.

Cuando se analizó la expresión de CCR5 en PBMC de los individuos incluidos en nuestra cohorte en función del polimorfismo CCR5 $\Delta 32$ , se pudo observar que aunque no existe diferencia en la expresión de dicha molécula en células T CD4+ entre las dos variantes genéticas halladas, el análisis estableció que el patrón de expresión del co-receptor de muchos individuos mostró una buena correlación con el genotipo CCR5, ya que fueron unos pocos individuos CCR5+/+ quienes mostraron niveles bajos de CCR5, y las células T CD4+ de una minoría de sujetos CCR5+/ $\Delta 32$  expresaron niveles extremadamente altos de la molécula.

Si nosotros asumimos que los niveles de expresión de CCR5 pueden limitar la replicación de cepas R5, *in vivo*; podríamos predecir que aquellos individuos con fenotipo de baja expresión de CCR5 en células T, mantendrán un mejor estado clínico que aquellos con fenotipo de alta expresión; por lo que en este estudio nosotros analizamos los niveles de expresión de CCR5 en PBMC de individuos no infectados, tanto no expuestos como expuestos no infectados, e individuos seropositivos al VIH-1 (LTNP y normo-progresores), para identificar, con base en este parámetro, diferencias que permitan explicar se estado de susceptibilidad tanto a la infección como a la progresión de la enfermedad por VIH-1.

A pesar de la heterogeneidad de los resultados en la expresión de CCR5 en células T de los grupos de estudio y de que los grupos control y ENI fueron equiparables; pero los ENI<sub>SX</sub> tuvieron niveles de CCR5 en

células T CD4+ significativamente menores a los del GC. Por otro lado, y con respecto a los pacientes VIH+, sólo los LTNP tuvieron porcentajes células T CD4+ que expresan de CCR5 significativamente menores a los del GC y ENI, datos que no concuerdan con los reportados por Ostrowski *et al*<sup>44</sup>, y Tortajada *et al*<sup>103</sup>, quienes encontraron porcentajes significativamente más altos de células T CD4+CCR5+ en los individuos infectados por el VIH al compararlos con sujetos no infectados. Aunque podría ser un hecho importante porque son precisamente los individuos LTNP, del grupo de pacientes VIH positivos, quienes tuvieron un menor estado de activación inmune con respecto a los NP<sup>561</sup>. Por otro lado, en las células T CD8+, la expresión de CCR5 estuvo disminuida en los sujetos VIH+; siendo aún más pronunciada la diferencia con los LTNP. Los pacientes del grupo NP tuvieron cifras ligeramente superiores tanto de células T CD4+ como CD8+ portadoras de CCR5. Los individuos ENI, como era de esperarse, se comportan como sujetos sanos.

Los resultados que hemos obtenido en la búsqueda del posible papel del polimorfismo CCR5 $\Delta$ 32 en la carencia de transmisión del VIH-1, hemos observado que, a diferencia de los reportes con frecuencias elevadas de homocigocia CCR5- $\Delta$ 32 entre individuos ENI<sup>100,553-555,602,678</sup>, nosotros no sólo no detectamos esta variante en el grupo ENI, la cual provee protección contra la variante R5 del VIH<sup>100,554</sup>, sino en ninguno de los grupos de estudio. Estos datos concuerdan con los de Zagury *et al*<sup>574</sup>, quienes en 1998 ya reportaron la ausencia de homocigocia para el alelo  $\Delta$ 32 en una grupo de hemofílicos seronegativos altamente expuestos al VIH-1; con los de Barretina *et al*<sup>666</sup>, quienes sólo encontraron un individuo

homocigoto  $\Delta 32$ , entre 7 hemofílicos ENI y con Marmor *et al*<sup>679</sup>, quienes muy recientemente, reportan una frecuencia muy baja (1.3%) de la variante CCR5 $\Delta 32/\Delta 32$  entre individuos con prácticas sexuales de riesgo para la infección por el VIH-1. Por lo que, no podríamos atribuir la resistencia a la infección en los individuos ENI, a la presencia de la homocigocia CCR5- $\Delta 32$ ; hecho que ya también concuerda con la propuesta de Goh *et al*<sup>425</sup>, y Salkowitz *et al*<sup>680</sup>, quienes mostraron que la herencia de la delección  $\Delta 32$  no explica la mayoría de los casos persistentemente resistentes al VIH.

EN cambio, en nuestra cohorte de estudio hemos hallado que 8 (12.3%) de los 65 individuos ENI son heterocigotos para la mutación CCR5 $\Delta 32$ , de los cuales 2 (6.5%) son ENI<sub>HM</sub> y 6 (17.6%) son ENI<sub>SX</sub>; a la fecha son poco los estudio que existen acerca de la asociación de la resistencia a la infección por el VIH-1 y la presencia de heterocigocia  $\Delta 32$ . Hoffman *et al*<sup>609</sup>, encontraron en su estudio de parejas discordantes, una mayor proporción (28%) de heterocigocia entre los individuos VIH negativos que entre los seropositivos (11%), aunque la asociación sólo fue vista entre las parejas heterosexuales y no sucediendo lo mismo entre los homosexuales, pero si que enfatiza la posible asociación entre el genotipo heterocigoto  $\Delta 32$  en patrones heterosexuales y la resistencia a la infección por VIH-1 y más recientemente Marmor *et al*<sup>679</sup>, han reportado un 12.9% de individuos heterocigotos en una cohorte de 2996 seronegativos en alto riesgo de infectarse con el VIH-1. Esta frecuencia fue mayor (22.3%) entre individuos con riesgo sexual que en aquellos que no tuvieron este riesgo

(15.9%), sugiriéndose de esta forma una ventaja selectiva en los individuos ENI con heterocigocia  $\Delta 32$  en la progresión de la infección por el VIH-1.

Aunque algunos reportes detallan un limitado papel protector contra la progresión de la infección por el VIH-1, hemos tratado de determinar la influencia de la heterocigocia para el alelo mutado  $\Delta 32$  del gen CCR5 en la progresión de la enfermedad y pudimos observar que la variante CCR5+/ $\Delta 32$  estuvo sobre-representada entre nuestros pacientes LTNP, 20 de 154 pacientes VIH+ (25.3%) en comparación de 8 NP (10.7%), ya se han hecho algunos reportes al respecto como el de Husman *et al*<sup>681</sup>, quienes encontraron un 48% de los LTNP fueron heterocigotos CCR5 $\Delta 32$  y sólo 9% de los NP (con un OR 6.9%); también Meyer *et al*<sup>682</sup>, han mostrado que los pacientes VIH positivos con heterocigocia tuvieron una probabilidad significativamente disminuida, con respecto a los pacientes con los dos alelos CCR5, de tener una infección sintomática.

De tal forma que la adición del genotipo CCR5 $\Delta 32$  a los marcadores de progresión como CV y CD4+ podría permitir una mejor estimación del curso clínico de la infección por el VIH.

Además, en los pacientes LTNP se pudo observar un nivel disminuido de la expresión de CCR5 en las células CD4+; datos que coinciden con los reportes a cerca de la frecuencia aumentada de la variante heterocigota entre individuos con no progresión o progresión retardada de enfermedad y expresión alterada de CCR5 en la superficie celular<sup>100,101,553-555,602,613-616,683,684</sup>.

EL SDF-1 es el principal ligando para el receptor CXCR4<sup>543,544</sup>. Esta molécula sirve como un co-receptor, junto con CD4, para que las cepas X4



del VIH-1 entre a la célula diana<sup>531</sup>, tales variantes aparecen en estados avanzados de la enfermedad. Este evento es muy próximo al momento en que se observa la aparición de los primeros síntomas de SIDA. La aparición de las cepas X4, usualmente precede a la caída precipitosa en las células T CD4+, lo cual sugiere que son estas cepas las que podrían contribuir a la deplección de las células T<sup>531,599</sup>.

El SDF-1 induce una rápida internalización de CXCR4, la disminución, inducida por el ligando, podría contribuir al efecto anti-VIH del SDF-1 sobre las cepas X4<sup>520,524,685</sup>. Además, existen reportes que un rasgo genético en la quimiocina SDF-1 podría afectar la progresión a SIDA.

Se ha visto que personas homocigotas para la mutación en el segmento conservado de la región 3'A no traducida (3'UTR) del gen del SDF-1 (SDF1-3'A) tienen una progresión significativamente retardada a SIDA y una fuerte protección a muerte<sup>102,629,686</sup>. También se ha hipotetizado que la mutación SDF1-3'A podría resultar en una producción incrementada de SDF-1, resultando, *a posteriori*, en infección en fuerte competición con variantes X4 del VIH en el nivel del receptor CXCR4.

Por el contrario, otras cohortes de estudio muestran que homocigosis en realidad no protege contra la progresión, sino que, incluso puede asociarse con la pérdida rápida de células CD4 y muerte<sup>261,262,634-636</sup> o no tener ningún efecto sobre ella<sup>615</sup>.

Aquí nosotros analizamos por un lado, los niveles plasmáticos de SDF-1 en los diferentes grupos y subgrupos de la cohorte para determinar si tienen relación con la resistencia y/o progresión de la infección por el

VIH-1 y por otro, el efecto del polimorfismo SDF1-3'A sobre los niveles plasmáticos de la quimiocina.

Hemos podido observar que la frecuencia de homocigocia es ligeramente menor en el grupo VIH+, (6/152, 4.3%); en comparación con el GC (6/88, 8.0%) y el grupo ENI (4/60, 6.7%), van Rij, *et al*<sup>634</sup>, encontraron en una cohorte, también de individuos infectados por el VIH, una frecuencia de la variante homocigota para la mutación SDF1-3'A del 3.5%. Debemos hacer notar que de los 6 pacientes VIH+ con la variante SDF1-3'A, únicamente 2 (2.4%) pertenecen al grupo LTNP, mientras que y 4 (5.8%), al grupo NP, datos que presentan discrepancia con los resultados de estudios que asocian homocigocia SDF1-3'A/3'A con retardo en la progresión a SIDA<sup>102,629,686</sup>, pero que serían consistentes con aquellos que han mostrado que la homocigocia en realidad no protege sino que podría estar asociada a progresión acelerada<sup>262,635</sup>. Así que, en contraste al efecto protector de la homocigocia SDF1-3'A/3'A, en el curso clínico de la infección por el VIH-1, nuestros hallazgos de mayor frecuencia de homocigocia en el grupo NP, no podrían ser asociados con retraso en la progresión a SIDA.

Fue también en el grupo VIH+, donde hemos encontrado que la variante SDF1-3'A/3'A está sobre-representada (51.3% vs 37.5% del GC y 23.3% del ENI); en el mismo trabajo van Rij, *et al*<sup>634</sup>; debemos subrayar que fue precisamente entre los LTNP, donde observamos la elevada frecuencia (59.8%) de individuos con heterocigocia.

En el reporte de Winkler *et al*<sup>102</sup>, hacen mención que el 50% de 79 individuos ENI por vía sexual, eran heterocigotos para la SDF1-3'A frente a

un 30% de individuos, sugiriendo que tal variante genética tuviese un papel protector frente a la infección por el VIH. Al analizar los resultados de nuestro grupo de individuos ENI, pudimos observar que no concuerdan con tal reporte ya que únicamente 5/30 (16.7%) ENI<sub>SX</sub> fueron heterocigotos frente a 9/30 (30%) ENI<sub>HM</sub>.

Sorprendentemente los niveles plasmáticos de SDF-1 fueron más altos en los individuos VIH+ <sup>687</sup>. Pero es de resaltar que las concentraciones en plasma de SDF-1 significativamente más elevadas fueron las de los LTNP y además, los individuos ENI<sub>SX</sub> tuvieron niveles plasmáticos más elevados de SDF-1.

Dado que se ha propuesto que el genotipo SDF1-3'A/3'A podría aumentar la expresión de SDF-1, hemos analizado los niveles plasmáticos de SDF-1 según el genotipo de toda la población, es decir, homocigotos SDF1+/, heterocigotos y homocigotos mutados SDF1+/3'A, interesantemente encontramos que los individuos homocigotos mutados tuvieron niveles plasmáticos de SDF-1 significativamente menores que las otras dos variantes genotípicas; y únicamente en los individuos heterocigotos existe una tendencia a tener los niveles ligeramente superiores a los sujetos *wild type*. De todas formas, sí llama la atención el valor tan bajo y agrupado de los niveles de SDF-1 en estos individuos homocigotos mutados. De confirmarse este hallazgo, con una muestra más grande, apuntaría a que la homocigocia no sólo no implica mayor secreción de SDF-1<sup>102,688</sup>, sino, por el contrario, una menor producción de la proteína.

Estudios *in vitro* han postulado<sup>520,524</sup>, que el efecto inhibitorio del SDF-1 sobre la fusión celular e infección por cepas X4 del VIH, está

mediado por bloqueo y por lo tanto una disminución en la expresión del co-receptor CXCR4. Por lo que también determinamos los niveles de CXCR4 en células T en los grupos de estudio.

Aunque no hubo diferencias entre las medianas del GC y del grupo ENI, los ENI<sub>SX</sub> tuvieron niveles de CXCR4 significativamente menores que el GC y que los ENI<sub>HM</sub>. En el caso de los pacientes VIH+, el grupo LTNP, tuvo cifras más bajas del co-receptor que los NP; Tortajada, *et al*<sup>103</sup>, también reportan cifras significativamente superiores de CXCR4 en células T CD4+ en individuos VIH+ tanto en estado precoz de la infección como avanzado. Otros estudios han mostrado que la expresión de CXCR4 está disminuida y la de CCR5 está aumentada en células T de individuos infectados comparados con sujetos no infectados<sup>44</sup>.

Los datos obtenidos también muestran que podría existir una correlación inversa entre los niveles plasmáticos de SDF-1 y la expresión de CXCR4 tanto en células T CD4+ como CD8+; situación que se cumple en dos subgrupos de estudio, LTNP y ENI<sub>SX</sub>; los ENI<sub>HM</sub> no presentan esta característica.

Nuestros resultados son congruentes con: 1) altos niveles plasmáticos de SDF-1, podrían evitar la progresión de la enfermedad por el VIH mediante el bloqueo y disminución de la expresión de CXCR4 en las células T, evitando la emergencia de cepas X4, las cuales, usualmente, aparecen en los estados avanzados de la infección<sup>506,543,544,689</sup> y, 2) concentraciones plasmáticas elevadas de SDF-1 podrían asociarse a resistencia, vía sexual, a la infección por el VIH. Una posible explicación puede ser que el estar en constante estimulación muco-genital condicione

una mayor producción de SDF-1; lo cual no sucede en los ENI por vía parenteral, que son individuos hemofílicos que recibieron hemoderivados provenientes de sangre contaminada desde hace más de diez años. Otra posibilidad sería que los ENI vía sexual, sea un tipo de ENI diferente y que presenten una variante genética de SDF-1 hasta ahora no descrita, que condicione una mayor secreción de SDF-1, que podría actuar promoviendo una mayor respuesta inmune frente al virus a nivel local, lo cual sería consistente con la respuesta CTL que vemos en prostitutas ENI<sup>362</sup>.

Aunque la IL-16 es una citocina quimiotáctica con potente anti-VIH secretada por células T CD4+ y CD8+, células del epitelio bronquial y eosinófilos<sup>690,691</sup>, no pudimos observar ninguna correlación en los niveles plasmáticos de IL-16 con protección a la infección o progresión de la enfermedad por el VIH-1 en los grupos de estudio, ya los niveles plasmáticos de esta citocina fueron significativamente más altos tanto en el grupo ENI como en el VIH+<sup>583,692</sup>, lo que sugiere que la IL-16 no juega un papel en la protección contra la infección por el VIH-1 en la cohorte estudiada.

## **7. CONCLUSIONES**

## **GENERALES.**

- 1.- El patrón de expresión del co-receptor CCR5 de la mayoría de los individuos mostró una buena correlación con su genotipo CCR5 $\Delta$ 32; ya que fueron pocos los individuos CCR5+/+ quienes mostraron niveles bajos de CCR5, y las células T de una minoría de sujetos CCR5+/ $\Delta$ 32 expresaron niveles extremadamente altos de la molécula.
- 2.- Los individuos con genotipo SDF1-3'A/3'A tuvieron niveles plasmáticos de SDF-1 significativamente más bajos que aquellos con variantes SDF1+/+ y SDF1+/3'A.
- 3.- No observamos ninguna correlación entre los niveles plasmáticos de IL-16 y resistencia y/o progresión de la infección por el VIH-1.

## **RESISTENCIA A LA INFECCIÓN POR VIH-1.**

- 4.- La ausencia de infección por el VIH-1, en los expuestos no infectados de la cohorte de estudio, no podría ser explicada por la delección homocigota del alelo  $\Delta$ 32 del gen CCR5, ya que ninguno de ellos presentó este defecto.
- 5.- Los expuestos no infectados tuvieron niveles plasmáticos, significativamente superiores de MIP-1 $\beta$  que los donantes sanos y los pacientes VIH positivos; y fueron los expuestos por vía sexual, quienes tuvieron valores significativamente inferiores que los expuestos a hemoderivados contaminados por el VIH-1.
- 6.- Fueron los expuestos por vía sexual quienes tuvieron elevadas concentraciones plasmáticas de SDF-1, lo cual podría estar correlacionado con el bajo nivel de CXCR4 en células T de sangre periférica de estos individuos.

## **PROTECCIÓN CONTRA LA PROGRESIÓN A SIDA.**

7.- En los pacientes seropositivos no progresores a largo plazo, se observó una alta frecuencia de heterocigocia CCR5 $\Delta$ 32; lo que podría estar condicionando su baja expresión de CCR5 en células T.

8.- Entre los no progresores a largo plazo el genotipo SDF1+3'A estuvo sobre-representado; ya que 49/82 (59.8%) de ellos presentaron heterocigocia frente a un 37,5% del GC y 23.3% del grupo ENI, hecho que a su vez, podría estar asociado a los niveles disminuidos de CXCR4 en células T de sangre periférica.

## **PROGRESIÓN A SIDA**

9.- Las altas concentraciones plasmáticas de MIP-1 $\alpha$  halladas en los pacientes normo-progresores correlacionan con niveles incrementados de CD38 en células T (marcador de activación inmunitaria); lo que sugiere que el nivel plasmático elevado de esta quimiocina, podría ser útil como predictor de progresión a SIDA.



## 8. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

## 8 INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

### TABLAS.

TABLA 1.- Estimación mundial de la infección VIH/SIDA en 2000	8
TABLA 2.- Casos de SIDA en España por categorías de transmisión y año de diagnóstico.	12
TABLA 3.- Genes del VIH	16
TABLA 4.- Definición y características de los pacientes infectados por el VIH según la progresión.	25
TABLA 5.- Clasificación de la infección por el VIH y criterios de definición de SIDA para adultos y adolescentes.	28
TABLA 6.- Situaciones clínicas diagnósticas de SIDA. Correspondientes a la clasificación de 1993.	29
TABLA 7.- Marcadores de mala evolución de la infección VIH/SIDA.	32
TABLA 8.- Pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por el VIH.	37
TABLA 9.- Nomenclatura de las bandas de <i>western blot</i> .	39
TABLA 10.- Sitios de acción de los principales agentes anti-retrovirales.	47
TABLA 11.- Componentes de la inmunidad innata y adquirida.	51
TABLA 12.- Actividad antiviral no citotóxica de las células T CD8+.	59
TABLA 13.- Tipos de respuesta inmune.	59
TABLA 14.- Mecanismos de la disminución cuantitativa y funcional de las células T CD4+ en la infección VIH/SIDA.	77
TABLA 15.- Factores del huésped asociados a resistencia y/o Progresión de la infección VIH/SIDA.	83
TABLA 16.- Asociación de moléculas HLA con resistencia y/o Progresión de enfermedad por el VIH.	92
TABLA 17.- Familias de quimiocinas-receptor. Nueva clasificación.	105
TABLA 18.- Receptores de quimiocinas y sus ligandos.	106
TABLA 19.- Genes de quimiocinas y sus receptores y SIDA.	110
TABLA 20.- Frecuencias de los alelos de quimiocinas y sus receptores.	118
TABLA 21.- Niveles de células T CD4+ en los grupos de estudio.	134

TABLA 22.- Niveles de células T CD8+ en los grupos de estudio.	134
TABLA 23.- Niveles de células <i>naive</i> CD4+CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> .	137
TABLA 24.- Niveles de células <i>naive</i> CD8+CD45RA <sup>+</sup> CD45RO <sup>-</sup> .	138
TABLA 25.- Niveles de células memoria CD4+CD45RA <sup>-</sup> CD45RO <sup>+</sup> .	139
TABLA 26.- Niveles de células memoria CD8+CD45RA <sup>-</sup> CD45RO <sup>+</sup> .	140
TABLA 27.- Niveles de células CD4+CD28+ en PBMC.	141
TABLA 28.- Niveles de células CD8+CD28+ en PBMC.	142
TABLA 29.- Niveles de células CD4+CD38+ en PBMC.	143
TABLA 30.- Niveles de células CD8+CD38+ en PBMC.	144
TABLA 31.- Expresión del co-receptor CCR5 en células T CD4+.	146
TABLA 32.- Expresión del co-receptor CCR5 en células T CD8+.	146
TABLA 33.- Expresión del co-receptor CXCR4 en células T CD4+.	147
TABLA 34.- Expresión del co-receptor CXCR4 en células T CD8+.	149
TABLA 35.- Distribución del polimorfismo CCR5-Δ32 en los grupos de estudio.	153
TABLA 36.- Odds ratio.	153
TABLA 37.- Expresión de CCR5 en células T CD4+ y genotipo CCR5-Δ32	156
TABLA 38.- Expresión de CCR5 en células T CD4+ y genotipo CCR5-Δ32 en los grupos de estudio.	157
TABLA 39.- Expresión de CCR5 en células T CD8+ y genotipo CCR5-Δ32.	161
TABLA 40.- Expresión de CCR5 en células T CD8+ y genotipo CCR5-Δ32 en los grupos de estudio.	161
TABLA 41.- Niveles plasmáticos de MIP-1β.	167
TABLA 42.- Niveles plasmáticos de RANTES.	167
TABLA 43.- Niveles plasmáticos de MIP-1α.	167
TABLA 44.- Frecuencia genotipos SDF1-3'A.	172
TABLA 45.- Concentraciones plasmáticas de SDF-1.	174
TABLA 46.- Niveles plasmáticos de SDF-1 y genotipos SDF1-3'A.	176
TABLA 47.- Niveles plasmáticos de IL-16.	178

## FIGURAS.

FIGURA 1.- Estimación del número de adultos y niños infectados por VIH/SIDA.	9
FIGURA 2.- Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana.	15
FIGURA 3.- Espectro clínico de la infección VIH/SIDA.	71
FIGURA 4.-Esquema de las moléculas clase I y II del MHC.	89
FIGURA 5.- Funciones biológicas de las quimiocinas y sus receptores.	96
FIGURA 6.- Polimorfismo CCR5 $\Delta$ 32	128
FIGURA 7.-Mutación SDF1-3'A	128
FIGURA 8.-Niveles de linfocitos T CD4+ en PBMC.	135
FIGURA 9.-Niveles de linfocitos T CD8+ en PBMC.	136
FIGURA 10.- Expresión de CXCR4 en células T CD4+.	148
FIGURA 11.-Expresión de CXCR4 en células T CD8+.	150
FIGURA 12.- Polimorfismo CCR5- $\Delta$ 32 en los grupos de estudio	154
FIGURA 13.- Expresión de CCR5 en células T CD4+ y polimorfismo CCR5- $\Delta$ 32.	158
FIGURA 14.- Expresión de CCR5 en células T CD4+ y polimorfismo CCR5- $\Delta$ 32 en los grupos de estudio.	159
FIGURA 15.- Expresión de CCR5 en células T CD8+ y polimorfismo CCR5- $\Delta$ 32.	162
FIGURA 16.- Expresión de CCR5 en células T CD8+ y polimorfismos CCR5- $\Delta$ 32 en los grupos de estudio.	163
FIGURA 17.- Niveles plasmáticos de MIP-1 $\beta$ .	168
FIGURA 18.- Niveles plasmáticos de RANTES.	169
FIGURA 19.- Niveles plasmáticos de MIP-1 $\alpha$ .	170
FIGURA 20.- Distribución de genotipos SDF1-3'A en la cohorte de estudio.	173
FIGURA 21.- Niveles plasmáticos de SDF-1.	175
FIGURA 22.- Niveles plasmáticos de SDF-1 y genotipos SDF1-3'A.	177
FIGURA 23.- Niveles plasmáticos de IL-16.	179

## 9. BIBLIOGRAFÍA

## 9 BIBLIOGRAFÍA.

1. CDC. *Pneumocystis* Pneumonia - Los Angeles. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 30 1981; 250-252.
2. CDC. Possible transfusion-associated AIDS. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 31 1982; 652-654.
3. Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, si. Isolation of T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome. Science 1983; 220:868-871.
4. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 1984; 224:497-500.
5. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuru JM, Oshiro LS. Isolation of lymphotropic retrovirus from San Francisco patients with AIDS. Science 1984; 225:840-842.
6. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 1986; 233:343-346.
7. Miller MJ. Viral taxonomy. Clin Infect Dis 1995; 21:279-280.
8. Bacellar H, Munoz A, Hoover DR, Phair JP, Besley DR, Kingsley LA, y cols. Incidence of clinical AIDS conditions in a cohort of homosexual men with CD4+ cell counts < 100/mm<sup>3</sup>. J Infect Dis 1994; 170:1284-1287.
9. Centers for Diseases Control. Classification system for human Y lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infections. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 35 1986; 334-339.

10. Centers for Diseases Control. Revision de la definicion de casos de SIDA. Segunda parte. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 1987; 81-83.
11. UNAIDS/WHO. AIDS epidemic update: december 2000. UNAIDS/00 2000; 44E:1-28.
12. UNAIDS/WHO Global AIDS Statistics. AIDS Care 2001; 13:408.
13. CDC. Characteristics of persons living with AIDS at the end of 1999. HIV/AIDS Suerveillance Supplemental Report 7 [1] 2001, 1-16.
14. CDC. The Global HIV/AIDS Epidemin, 2001. Morb Mortal Wkly Rep 2001; 50:34-39.
15. Centro Nacional de Epidemiología. Vigilancia Epidemiológica del SIDA en España. Registro Nacional de Casos de Sida. Balance de la Epidemia a 31 de diciembre de 2000. Centro Nacional de Epidemiología Informe Semestral[2] 2000; 1-18
16. Lewis P, Hensel M, Emerman M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. EMBO J 1992; 11:3053-3058.
17. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, Stevenson M. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89:6580-6584.
18. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. J Virol 1994; 68:510-516.
19. Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. N Engl J Med 1991; 324:308-317.

20. Hammond AL, Lewis J, May J, Albert J, Balfe P, McKeating JA. Antigenic variation within the CD4 binding site of human immunodeficiency virus type 1 gp120: effects on chemokine receptor utilization. *J Virol* 2001; 75:5593-5603.
21. Dalgleish AG, Beverley PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984; 312:763-767.
22. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984; 312:767-768.
23. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993; 57:183-189.
24. Sewell AK, Price DA. Dendritic cells and transmission of HIV-1. *Trends Immunol* 2001; 22:173-175.
25. Lin CL, Sewell AK, Gao GF, Whelan KT, Phillips RE, Austyn JM. Macrophage-tropic HIV induces and exploits dendritic cell chemotaxis. *J Exp Med* 2000; 192:587-594.
26. Gendelman HE, Orenstein JM, Martin MA, Ferrua C, Mitra R, Phipps T, Wahl LA, Lane HC, Fauci AS, Burke DS. Efficient isolation and propagation of human immunodeficiency virus on recombinant colony-stimulating factor 1-treated monocytes. *J Exp Med* 1988; 167:1428-1441.
27. Bitton N, Verrier F, Debre P, Gorochov G. Characterization of T cell-expressed chimeric receptors with antibody-type specificity for the CD4 binding site of HIV-1 gp120. *Eur J Immunol* 1998; 28:4177-4187.
28. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, Parmentier M, Collman RG, Doms RW. A dual-tropic primary HIV-1 isolate



that uses fusin and the beta- chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996; 85:1149-1158.

29. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC- CKR-5. *Nature* 1996; 381:667-673.

30. Schuitemaker H, Kootstra NA, Groenink M, De Goede RE, Miedema F, Tersmette M. Differential tropism of clinical HIV-1 isolates for primary monocytes and promonocytic cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8:1679-1682.

31. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Dercksen MW, De Goede RE, van Steenwijk RP, Lange JM, Schattenkerk JK, Miedema F, Tersmette M. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992; 66:1354-1360.

32. Fenyo EM, Morfeldt-Manson L, Chiodi F, Lind B, von Gegerfelt A, Albert J, Olausson E, Asjo B. Distinct replicative and cytopathic characteristics of human immunodeficiency virus isolates. *J Virol* 1988; 62:4414-4419.

33. Berger EA. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 1997; 11:S3-16.

34. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:551-562.

35. Doms RW, Peiper SC. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 1997; 235:179-190.

36. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. A new classification for HIV-1. *Nature* 1998; 391:240.
37. Zhang LQ, MacKenzie P, Cleland A, Holmes EC, Brown AJ, Simmonds P. Selection for specific sequences in the external envelope protein of human immunodeficiency virus type 1 upon primary infection. *J Virol* 1993; 67:3345-3356.
38. Zhu T, Mo H, Wang N, Nam DS, Cao Y, Koup RA, Ho DD. Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993; 261:1179-1181.
39. Roos MTJ, Lange JMA, de GREY, Countinho RA, Schellekens TA, Miedema F, Tersmette M. Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1992; 165:427-432.
40. Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-Inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease Progression. *J Infect Dis* 1994; 169:968-974.
41. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:657-700.
42. O'Brien TR, Winkler C, Dean M, Nelson JA, Carrington M, Michael NL, White GC. HIV-1 infection in a man homozygous for CCR5 delta 32. *Lancet* 1997; 349:1219.
43. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997; 185:621-628.

44. Ostrowski MA, Justement SJ, Catanzaro A, Hallahan CA, Ehler LA, Mizell SB, Kumar PN, Mican JA, Chun TW, Fauci AS. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol* 1998; 161:3195-3201.
45. Lu Z, Berson JF, Chen Y, Turner JD, Zhang T, Sharron M, Jenks MH, Wang Z, Kim J, Rucker J, Hoxie JA, Peiper SC, Doms RW. Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:6426-6431.
46. Wang ZX, Berson JF, Zhang TY, Cen YH, Sun Y, Sharron M, Lu ZH, Peiper SC. CXCR4 sequences involved in coreceptor determination of human immunodeficiency virus type-1 tropism. Unmasking of activity with M-tropic Env glycoproteins. *J Biol Chem* 1998; 273:15007-15015.
47. Chabot DJ, Zhang PF, Quinnan GV, Broder CC. Mutagenesis of CXCR4 identifies important domains for human immunodeficiency virus type 1 X4 isolate envelope-mediated membrane fusion and virus entry and reveals cryptic coreceptor activity for R5 isolates. *J Virol* 1999; 73:6598-6609.
48. Abrams DI, Lewis BJ, Beckstead JH, Casavant CA, Drew WL. Persistent diffuse lymphadenopathy in homosexual men: Endpoint or prodrome? *Ann Intern Med* 1984; 100:801-808.
49. Cohen OJ, Kinter A, Fauci AS. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol Rev* 1997; 159:31-48.
50. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:625-656.
51. Clark SJ, Saag MS, Decker WD. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:954-960.

52. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991; 324:961-964.
53. Tindall B, Cooper A. Primary HIV infection: host response and intervention strategies. *AIDS* 1991; 5:1-14.
54. Quinn TC. Acute primary HIV infection. *JAMA* 1997; 278:58-62.
55. Pantaleo G, Grazioni C, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1993; 328:327-335.
56. Kinloch-De LS, Saussure P, Saurat JH, et al. Symptomatic primary infection due to human immunodeficiency virus type 1: review of 31 cases. *Clin Infect Dis* 1993; 17:59-65.
57. Vento S, Di Perri G, Garofano T, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia during primary HIV-1 infection. *Lancet* 1993; 342:24-25.
58. Buchbinder SP, Katz MH, Hessel NA, et al. Long term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994; 8:1123-1128.
59. Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1991; 114:678-693.
60. Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, Mawle AC, Wilber JC, Stanley M, Hart CE, Hessel NA, Holmberg SD. Long-term human immunodeficiency virus infection in asymptomatic homosexual and bisexual men with normal CD4+ lymphocyte counts: immunologic and virologic characteristics. *J Infect Dis* 1991; 163:959-965.
61. Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase AT. Massive covert infection of helper T lymphocytes and

macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 1993; 362:359-362.

62. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, Pizzo PA, Schnittman SM, Kotler DP, Fauci AS. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88:9838-9842.

63. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Butini L, Montroni M. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993; 362:355-358.

64. Piatak M, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, Hahn BH, Shaw GM, Lifson JD. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993; 259:1749-1754.

65. Wei X, Ghosh S, Taylor M, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH, Saag MS. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995; 373:117-122.

66. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen WVA, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373:123-126.

67. Pierson T, McArthur J, Siliciano RF. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:665-708.

68. Koup RA, Saag MS, Yang LC, Clark SJ, Kappes JC, Luk KC, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; 68:4650-4655.

69. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP. Major

expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 1994; 370:463-467.

70. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; 283:857-860.

71. Sewell AK, Price DA, Oxenius A, Kelleher AD, Phillips RE. Cytotoxic T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus: control and escape. *Stem Cells* 2000; 18:230-244.

72. Mellors JW, Kingsley LA, Rinaldo CR, Todd JA, Hoo BS, Kokka RP, y cols. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122:573-579.

73. Easterbrook PJ. Non-progression in HIV infection [editorial; comment] [published erratum appears in *AIDS* 1994 Oct;8(10):1514]. *AIDS* 1994; 8:1179-1182.

74. Hogervost E, Jurrians S, Wolf Fd, Wijk Av, Wiersma A, Valk M, y cols. Predictors for non and slow progression in human immunodeficiency virus (VIH) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance og high HIV-1 p24-specific bur not. *J Infect Dis* 1995; 171:811-821.

75. Dorrucchi M, Rezza G, Vlahov D, Pezzotti P, Sinicco A, Nicolosi A, y cols. Clinical characteristics and prognostic value of acute retroviral syndrome among injecting drug users. *AIDS* 1995; 9:597-604.

76. Hockett RD, Kilby JM, Derdeyn CA, Saag MS, Sillers M, Squires K, Chiz S, Nowak MA, Shaw GM, Bucy RP. Constant mean viral copy number per infected cell in tissues regardless of high, low, or undetectable plasma HIV RNA. *J Exp Med* 1999; 189:1545-1554.

77. Harris M, Patenaude P, Cooperberg P, et al. Correlation of virus load in plasma and lymph node tissue in Human Immunodeficiency Virus infection. *J Infect Dis* 1997; 176:1388-1392.
78. Mellors JW, Rinaldo CR, Gupta P, White M, Todd JA, Kingsley LA. Prognosis in HIV infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 1996; 272:1167-1169.
79. Hellerstein M, Hanley MB, Cesar D, Siler S, Papageorgopoulos C, Wieder E, Schmidt D, Hoh R, Neese R, Macallan D, Deeks S, McCune JM. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat Med* 1999; 5:83-89.
80. Connor RI, Mohri H, Cao Y, Ho DD. Increased viral burden and cytopathicity correlate temporally with CD4+ T-lymphocyte decline and clinical progression in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* 1993; 67:1772-1777.
81. Reinhart TA, Rogan MJ, Huddleston D, Rausch DM, Eiden LE, Haase AT. Simian immunodeficiency virus burden in tissues and cellular compartments during clinical latency and AIDS. *J Infect Dis* 1997; 176:1198-1208.
82. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332:201-208.
83. Kirchhoff F, Greenough TC, Brettler DB, Sullivan JL, Desrosiers RC. Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection. *N Eng J Med* 1995; 332:228-232.
84. Levy JA. HIV pathogenesis and long term survival. *AIDS* 1993; 7:1401-1410.

85. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, Graziosi C, Cohen OJ, Demarest JF, Montefiori D, Orenstein JM, Fox C, Schragger LK. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection [see comments]. *N Engl J Med* 1995; 332:209-216.
86. Phair JP. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:883-885.
87. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, Vittinghoff E, Winkelstein W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS* 1993; 7:1159-1166.
88. Phair J, Hoover D, Huprikar J, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. The significance of western blot assays indeterminate for antibody to HIV in a cohort of homosexual/bisexual men. The Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:988-992.
89. Muñoz A, Kirby A, He Y, et al. Long term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal pattern of CD4 lymphocytes. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 8:496-505.
90. Rezza G, Lazzarin A, Angarano G, Sinicco A, Pristera R, Ortona L, Barbanera M, Gafa S, Tirelli U, Salassa B, Ricchi E. The natural history of HIV infection in intravenous drug users: risk of disease progression in a cohort of seroconverters. *AIDS* 1989; 3:87-90.
91. Moss AR, Bacchetti P. Natural history of HIV infection. *AIDS* 1989; 3:55-61.
92. Gatell JM. SIDA: Dónde estamos y hacia donde vamos. *Med Clin (Barc)* 1991; 98:775-777.
93. Lifson AR, Hessel NA, Rutherford GW. Progression and clinical outcome of infection due to human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1992; 14:966-972.



94. Fauci AS, Masur H, Gelmann EP, Markham PD, Hahn BH, Lane HC. The Acquired Immunodeficiency Syndrome: An Update. *Ann Intern Med* 1985; 102:800-813.
95. Centers for Diseases Control. 1993 Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance of definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR* 1992; 41:1-19.
96. CDC. Classification system for human immunodeficiency virus HIV infection in children under 13 years of age. *MMWR* 1987; 36:225-236.
97. Keet IP, Krijnen P, Koot M, Lange JM, Miedema F, Goudsmit J, Coutinho RA. Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters. *AIDS* 1993; 7:51-57.
98. Farzadegan H, Henrard DR, Kleeberger CA, Schragger L, Kirby AJ, Saah AJ, Rinaldo CR, Jr., O'Gorman M, Detels R, Taylor E, Phair JP, Margolick JB. Virologic and serologic markers of rapid progression to AIDS after HIV-1 seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13:448-455.
99. Haynes BF, Pantaleo G, Fauci AS. Toward an understanding of the correlates of protective immunity to HIV infection. *Science* 1996; 271:324-328.
100. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the *CCR5* structural gene. *Science* 1996; 273(5283):1856-1861.
101. Smith MW, Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Lomb DA, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Kaslow R, Buchbinder S, Vittinghoff E, Vlahov D, Hoots K, Hilgartner MW, O'Brien SJ. Contrasting genetic influence of *CCR2* and *CCR5* variants on HIV-1 infection and disease

progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* 1997; 277:959-965.

102. Winkler C, Modi W, Smith MW, Nelson GW, Wu X, Carrington M, Dean M, Honjo T, Tashiro K, Yabe D, Buchbinder S, Vittinghoff E, Goedert JJ, O'Brien TR, Jacobson LP, Detels R, Donfield S, Willoughby A, Gomperts E, Vlahov D, Phair J, O'Brien SJ. Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* 1998; 279:389-393.

103. Tortajada C, Plana M, Soriano A, Palou E, Garcia F, Miro JM, Gatell JM. Differences in CXCR4 and CCR5 Expression in Early and Advanced Patients at Baseline and Changes and their Expression after HAART. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. January 31-February 4 1999. Chicago.USA.

104. Iversen AKN, Shpaer E, Rodrigo A, Hirsch MS, Walker BD, Sheppard HV, et al. Persistence of attenuated rev genes in a human immunodeficiency virus type 1-infected asymptomatic individual. *J Virol* 1995; 69:5743-5753.

105. Musey L, Hughes J, Schacker T, Shea T, Corey L, McElrath M. Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1997; 337:1267-1274.

106. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jones SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; 279:2103-2106.

107. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, Boswell SL, Sax PE, Kalams SA, Walker BD. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997; 278(5342):1447-1450.
108. Echaniz P, Arrizabalaga J, Iribarren JA, Cuadrado E. CD8+CD38+ and CD8+DR+ peripheral blood lymphoid subsets of HIV- infected intravenous drug abusers correlate with CD4+ cell counts and proliferation to mitogens. *Cell Immunol* 1993; 150:72-80.
109. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A, Batista L, Winter M, Sabin CA, Johnson M, Lee CA, Phillips A, Janossy G. Cd8+,cd38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring hiv-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14:158-162.
110. Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, Svejgaard A. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *Lancet* 1997; 349:236-240.
111. Pastinen T, Liitsola K, Niini P, Salminen M, Syvanen AC. Contribution of the CCR5 and MBL genes to susceptibility to HIV type 1 infection in the Finnish population. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:695-698.
112. Cheng-Mayer C, Seto D, Tateno M, Levy JA. Biologic features of HIV that correlate with virulence in the host. *Science* 1988; 240:80-82.
113. Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, De Goede RE, Lange JM, Schellekens PT, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *J Virol* 1989; 63:2118-2125.

114. Kimata JT, Kuller L, Anderson DB, Dailey P, Overbaugh J. Emerging cytopathic and antigenic simian immunodeficiency virus variants influence AIDS progression. *Nat Med* 1999; 5:535-541.
115. Paxton WA, Kang S. Chemokine receptor allelic polymorphisms: relationships to HIV resistance and disease progression. *Semin Immunol* 1998; 10:187-194.
116. Michael NL, Chang G, Louie LG, Mascola JR, Dondero D, Birx DL, Sheppard HW. The role of viral phenotype and CCR-5 gene defects in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997; 3:338-340.
117. Michael NL. Host genetic influences on HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:466-474.
118. Michael NL, Chang G, D'Arcy LA, Tseng CJ, Birx DL, Sheppard HV. Functional characterization of human immunodeficiency virus-type 1 nef genes in patients with divergent rates of disease progression. *J Virol* 1995; 69:6758-6769.
119. Shioda T, Oka S, Xin X, Liu H, Harukuni R, Kurotani A, Fukushima M, Hasan MK, Shiino T, Takebe Y, Iwamoto A, Nagai Y. In vivo sequence variability of human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120: association of V2 extension with slow disease progression. *J Virol* 1997; 71:4871-4881.
120. Wang B, Spira TJ, Owen S, Lal RB, Saksena NK. HIV-1 strains from a cohort of American subjects reveal the presence of a V2 region extension unique to slow progressors and non-progressors. *AIDS* 2000; 14:213-223.
121. Greenough TC, Sullivan JL, Desrosiers RC. Declining CD4 T-cell counts in a person infected with nef-deleted HIV-1. *N Engl J Med* 1999; 340:236-237.

122. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1: a report for the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 1999; 340:1715-1722.
123. Alexander L, Weiskopf E, Greenough TC, Gaddis NC, Auerbach MR, Malim MH, O'Brien SJ, Walker BD, Sullivan JL, Desrosiers RC. Unusual polymorphisms in human immunodeficiency virus type 1 associated with nonprogressive infection. *J Virol* 2000; 74:4361-4376.
124. Zaunders JJ, Geczy AF, Dyer WB, McIntyre LB, Cooley MA, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Learmont J, Cooper DA, Sullivan JS. Effect of long-term infection with nef-defective attenuated HIV type 1 on CD4+ and CD8+ T lymphocytes: increased CD45RO+CD4+ T lymphocytes and limited activation of CD8+ T lymphocytes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15:1519-1527.
125. Garcia F, Plana M, Soriano A, Vidal C, Arnedo M, Gil C, Cruceta A, Pumarola T, Gallart T, Miro JM, Gatell JM. Predictors of progression in chronically infected naive patients with plasma viraemia below 5000 copies/ml and CD4 T lymphocytes greater than 500 x 10<sup>6</sup>/l. *AIDS* 2001; 15:131-133.
126. Jurriaans S, van Gemen B, Weverling GJ, van Strijp D, Nara P, Coutinho R, Koot M, Schuitemaker H, Goudsmit J. Natural history of HIV-1 infection: virus load and virus phenotype independent determinants of clinical course? *Virology* 1994; 204:223-233.
127. Schacker TW, Hughes JP, Shea T, Coombs RW, Corey L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann Intern Med* 1998; 128:613-620.

128. O'Brien TR, Blattner WA, Waters D, Eyster E, Hilgartner MW, Cohen AR, Luban N, Hatzakis A, Aledort LM, Rosenberg PS, Miley WJ, Kroner BL, Goedert JJ. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *JAMA* 1996; 276:105-110.

129. Lyles RH, Munoz A, Yamashita TE, Bazmi H, Detels R, Rinaldo CR, Margolick JB, Phair JP, Mellors JW. Natural history of human immunodeficiency virus type 1 viremia after seroconversion and proximal to AIDS in a large cohort of homosexual men. Multicenter AIDS Cohort Study. *J Infect Dis* 2000; 181:872-880.

130. Sinicco A, Fora R, Sciandra M, Lucchini A, Caramello P, Giannini P. Risk of developing AIDS after primary acute HIV<sub>1</sub> infection. *J Acq Immune Def Syndr* 1993; 6:575-581.

131. Weiss PJ, Brodine SK, Goforth RR, Kennedy CA, Wallace MR, Olson PE, Garland FC. Initial low CD4 lymphocyte counts in recent human immunodeficiency virus infection and lack of association with identified coinfections. *J Infect Dis* 1992; 166:1149-1153.

132. Wasserheit JN. Epidemiological synergy. Interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis* 1992; 19:61-77.

133. Laga M, Manoka A, Kivuvu M, Malele B, Tuliza M, Nzila N, Goeman J, Behets F, Batter V, Alary M. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS* 1993; 7:95-102.

134. Royce RA, Sena A, Cates W, Jr., Cohen MS. Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* 1997; 336:1072-1078.

135. Dillon B, Hecht F, Swanson M. Primary HIV infections associated with oral transmission. 7th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, January 30-February 2, 2000. San Francisco.

136. Keenlyside RA, Johnson AM, Mabey DC. The epidemiology of HIV-1 infection and AIDS in women. *AIDS* 1993; 7:S83-90.
137. Nicoll A, Gill ON. The global impact of HIV infection and disease. *Commun Dis Public Health* 1999; 2:85-95.
138. Berkelman RL, Heyward WL, Stehr-Green JK, Curran JW. Epidemiology of human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* 1989; 86:761-770.
139. Piot P, Laga M. Genital ulcers, other sexually transmitted diseases, and the sexual transmission of HIV. *BMJ* 1989; 298:623-624.
140. Plummer FA, Simonsen JN, Cameron DW, Ndinya-Achola JO, Kreiss JK, Gakinya MN, Waiyaki P, Cheang M, Piot P, Ronald AR. Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 1991; 163:233-239.
141. Halperin DT, Bailey RC. Male circumcision and HIV infection: 10 years and counting. *Lancet* 1999; 354:1813-1815.
142. Moses S, Plummer FA, Bradley JE, Ndinya-Achola JO, Nagelkerke NJ, Ronald AR. The association between lack of male circumcision and risk for HIV infection: a review of the epidemiological data. *Sex Transm Dis* 1994; 21:201-10.
143. Goedert JJ, Kessler CM, Aledort LM, et al. A prospective study of Human Immunodeficiency Virus type 1 infection and the development of AIDS in subjects with hemophilia. *N Eng J Med* 1989; 321:1141-1148.
144. Pedraza MA, del Romero J, Roldan F, Garcia S, Ayerbe MC, Noriega AR, Alcami J. Heterosexual transmission of HIV-1 is associated with high plasma viral load levels and a positive viral isolation in the infected partner. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 21:120-15.

145. Padian NS, Shiboski SC, Jewell NP. The effect of number of exposures on the risk of heterosexual HIV transmission. *J Infect Dis* 1990; 161:883-887.
146. Schoenbaum EE, Hartel D, Selwyn PA, Klein RS, Davenny K, Rogers M, Feiner C, Friedland G. Risk factors for human immunodeficiency virus infection in intravenous drug users. *N Engl J Med* 1989; 321:874-879.
147. Woods WJ, Guydish JR, Sorensen JL, Coutts A, Bostrom A, Acampora A. Changes in HIV-related risk behaviors following drug abuse treatment. *AIDS* 1999; 13:2151-2155.
148. Gibson DR, Flynn NM, McCarthy JJ. Effectiveness of methadone treatment in reducing HIV risk behavior and HIV seroconversion among injecting drug users. *AIDS* 1999; 13:1807-18.
149. Donegan E, Stuart M, Niland JC. Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) among recipients of antibody-positive blood donations. *Ann Intern Med* 1990; 113:733-739.
150. Stratton C. Clinical microbiology in the 1990s: emerging pathogens and the role of the fluoroquinolones. *Infect Dis Newsletter* 1992; 11:25-29.
151. Kumar P, Pearson JE, Martin DH, et al. Transmission of human immunodeficiency virus by transplantation of a renal allograft, with development of the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1987; 106:244-245.
152. Petersen LR, Simonds RJ, Koistinen J. HIV transmission through blood, tissues, and organs. *AIDS* 1993; 7 Suppl 1:S99-107.:S99-107.
153. Dabis F, Msellati P, Dunn D, Lepage P, Newell ML, Peckham C, Van de Perre P. Estimating the rate of mother-to-child transmission of HIV. Report of a workshop on methodological issues Ghent (Belgium), 17-20



February 1992. The Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. *AIDS* 1993; 7:1139-148.

154. Ryder RW, Behets F. Reasons for the wide variation in reported rates of mother-to-child transmission of HIV-1. *AIDS* 1994; 8:1495-7.

155. Cooper ER, Nugent RP, Diaz C, Pitt J, Hanson C, Kalish LA, Mendez H, Zorrilla C, Hershov R, Moye J, Smeriglio V, Fowler MG. After AIDS clinical trial 076: the changing pattern of zidovudine use during pregnancy, and the subsequent reduction in the vertical transmission of human immunodeficiency virus in a cohort of infected women and their infants. Women and Infants Transmission Study Group. *J Infect Dis* 1996; 174:1207-11.

156. Lindegren ML, Byers RH, Thomas P, Davis SF, Caldwell B, Rogers M, Gwinn M, Ward JW, Fleming PL. Trends in perinatal transmission of HIV/AIDS in the United States. *JAMA* 1999; 282:531-58.

157. Maguire A, Sanchez E, Fortuny C, Casabona J. Potential risk factors for vertical HIV-1 transmission in Catalonia, Spain: the protective role of cesarean section. The Working Group on HIV-1 Vertical Transmission in Catalonia. *AIDS* 1997; 11:1851-1857.

158. Mofenson LM, Lambert JS, Stiehler ER, Bethel J, Meyer WA, Whitehouse J, Moye J, Reichelderfer P, Harris DR, Fowler MG, Mathieson BJ, Nemo GJ. Risk factors for perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in women treated with zidovudine. *N Engl J Med* 1999; 341[6]:385-393.

159. Backe E, Unger M, Jimenez E, Siegel G, Schafer A, Vogel M. Fetal organs infected by HIV-1. *AIDS* 1993; 7:896-7.

160. Goedert JJ, Duliege AM, Amos CI, Felton S, Biggar RJ. High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins. *Lancet* 1991; 338:1471-5.

161. Chouquet C, Burgard M, Richardson S, Rouzioux C, Costagliola D. Timing of mother-to-child HIV-1 transmission and diagnosis of infection based on polymerase chain reaction in the neonatal period by a non-parametric method. *AIDS* 1997; 11:1183-4.
162. Kuhn L, Steketee RW, Weedon J, Abrams EJ, Lambert G, Bamji M, Schoenbaum E, Farley J, Nesheim SR, Palumbo P, Simonds RJ, Thea DM. Distinct risk factors for intrauterine and intrapartum human immunodeficiency virus transmission and consequences for disease progression in infected children. Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study. *J Infect Dis* 1999; 179:52-58.
163. Leroy V, Newell ML, Dabis F, Peckham C, Van de PP, Bulterys M, Kind C, Simonds RJ, Wiktor S, Msellati P. International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV. *Lancet* 1998; 352:597-600.
164. Coutoudis A, Pillay K, Spooner E, Kuhn L, Coovadia HM. Influence of infant-feeding patterns on early mother-to-child transmission of HIV-1 in Durban, South Africa: a prospective cohort study. South African Vitamin A Study Group. *Lancet* 1999; 354:471-476.
165. Dunn DT, Newell ML, Ades AE, Peckham CS. Risk of human immunodeficiency virus type 1 transmission through breastfeeding. *Lancet* 1992;585-588.
166. Van de PP, Lepage P, Homsy J, Dabis F. Mother-to-infant transmission of human immunodeficiency virus by breast milk: presumed innocent or presumed guilty? *Clin Infect Dis* 1992; 15:502-507.
167. Ryder RW, Manzila T, Baende E, Kabagabo U, Behets F, Batter V, Paquot E, Binyingo E, Heyward WL. Evidence from Zaire that breast-

feeding by HIV-1-seropositive mothers is not a major route for perinatal HIV-1 transmission but does decrease morbidity. *AIDS* 1991; 5:709-714.

168. Newell ML, Dunn DT, Peckham CS, Semprini AE, Pardi G. Vertical transmission of HIV-1: maternal immune status and obstetric factors. The European Collaborative Study. *AIDS* 1996; 10:1675-1681.

169. O'Shea S, Newell ML, Dunn DT, Garcia-Rodriguez MC, Bates I, Mullen J, Rostron T, Corbett K, Aiyer S, Butler K, Smith R, Banatvala JE. Maternal viral load, CD4 cell count and vertical transmission of HIV-1. *J Med Virol* 1998; 54:113-117.

170. Dunn DT, Tess BH, Rodrigues LC, Ades AE. Mother-to-child transmission of HIV: implications of variation in maternal infectivity. *AIDS* 1998; 12:2211-2216.

171. Dabis F, Newell ML, Fransen L, Saba J, Lepage P, Leroy V, Cartoux M, Meda N, Whynes DK, Peckham C, Nduati R, Msellati P, Vincenzi ID, Van de PP. Prevention of mother-to-child transmission of HIV in developing countries: recommendations for practice. The Ghent International Working Group on Mother-To-Child Transmission of HIV. *Health Policy Plan* 2000; 15:34-42.

172. Dabis F, Leroy V, Castetbon K, Spira R, Newell ML, Salamon R. Preventing mother-to-child transmission of HIV-1 in Africa in the year 2000. *AIDS* 2000; 14:1017-1026.

173. McCarthy M. Timing of fetal membrane rupture predicts HIV risk. *Lancet* 1996; 347:1821.

174. Tovo PA, de Martino M, Gabiano C, Galli L, Cappello N, Ruga E, Tullisso S, Vierucci A, Loy A, Zuccotti GV. Mode of delivery and gestational age influence perinatal HIV-1 transmission. Italian Register for HIV Infection in Children. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 11:88-94.

175. Brandt CD, Sison AV, Rakusan TA, Kaufman TE, Saxena ES, O'Donnell RM, Ellaurie M, Sever JL. HIV DNA blood levels in vertically infected pediatric patients: variations with age, association with disease progression, and comparison with blood levels in infected mothers. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13:254-261.
176. Cao Y, Krogstad P, Korber BT, Koup RA, Muldoon M, Macken C, Song JL, Jin Z, Zhao JQ, Clapp S, Chen IS, Ho DD, Ammann AJ. Maternal HIV-1 viral load and vertical transmission of infection: the Ariel Project for the prevention of HIV transmission from mother to infant. *Nat Med* 1997; 3:549-552.
177. Mock PA, Shaffer N, Bhadrakom C, Siriwasin W, Chotpitayasunondh T, Chearskul S, Young NL, Roongpisuthipong A, Chinayon P, Kalish ML, Parekh B, Mastro TD. Maternal viral load and timing of mother-to-child HIV transmission, Bangkok, Thailand. Bangkok Collaborative Perinatal HIV Transmission Study Group. *AIDS* 1999; 13:407-414.
178. Coll O, Hernandez M, Boucher CA, Fortuny C, de Tejada BM, Canet Y, Caragol I, Tijnagel J, Bertran JM, Espanol T. Vertical HIV-1 transmission correlates with a high maternal viral load at delivery. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 14:26-30.
179. Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, Kornegay J, Jackson B, Moye J, Hanson C, Zorilla C, Lew J. Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission. *N Engl J Med* 1999; 341:394-402.
180. Constantine NT. Serologic tests for the retroviruses: approaching a decade of evolution. *AIDS* 1993; 7:1-13.
181. Soriano V, Heredia A. Residual risk of retrovirus transmission by transfusions. *Rev Clin Esp* 1995; 195:418-24.

182. Yang X, Wyatt R, Sodroski J. Improved elicitation of neutralizing antibodies against primary human immunodeficiency viruses by soluble stabilized envelope glycoprotein trimers. *J Virol* 2001; 75:1165-1171.
183. WHO. AIDS: Proposed WHO criteria for interpreting results from Western Blot assays for HIV-1, HIV-2, and HTLV-1/HTLV-II. *Wkly.Epidem.Rec.*1990; 37, 281-288.
184. Busch MP, Korelitz JJ, Kleinman SH, Lee SR, AuBuchon JP, Schreiber GB. Declining value of alanine aminotransferase in screening of blood donors to prevent posttransfusion hepatitis B and C virus infection. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion* 1995; 35:903-910.
185. JANSSEN RS, Satten GA, Stramer SL, Rawal B, O'Brien TR, Weiblen BJ, HECHT FM, Jack N, Cleghorn FR, Kahn JO, CHESNEY MA, Busch MP. Early testing strategy to detect early HIV-1 infection for use in incidence estimates and for clinical and prevention purposes. *JAMA* 1998; 280:42-48.
186. Bravo R, Gutierrez M, Soriano V, Mellado MJ, Perez-Labad ML, Mas A, Gonzalez-Lahoz J, Martin-Fontelas P. Lack of evidence for viral clearance in children born to HIV-infected mothers. *AIDS* 1996; 10:1744-1745.
187. Pahwa R, Good RA, Pahwa S. Prematurity, hypogammaglobulinemia, and neuropathology with human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84:3826-3830.
188. Ho DD, Moudgil T, Robin HS, Alam M, Wallace BJ, Mizrahi Y. Human immunodeficiency virus type 1 in a seronegative patient with visceral Kaposi's sarcoma and hypogammaglobulinemia. *Am J Med* 1989; 86:349-351.

189. Young KK, Peter JB, Wasserman RL. HIV infection detected by polymerase chain reaction in an agammaglobulinemic patient. *AIDS* 1990; 4:468-469.
190. Soriano V, Gutierrez M, Heredia A, Bravo R, Hewlett I, Gonzalez-Lahoz J. Evaluation of different supplementary assays for the confirmation of HIV-1 and HIV-2 infections. *Vox Sang* 1994; 66:82-83.
191. Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, Wong-Staal F. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83:772-776.
192. Ho DD, Moudgil T, Alam M. Quantitation of Human Immunodeficiency virus type I in the blood of infected persons. *N Engl J Med* 1989; 321:1621-1625.
193. Simmonds P. Variation in HIV virus load of individuals at different stages in infection: possible relationship with risk of transmission. *AIDS* 1990; 4 Suppl 1:S77-S83.
194. Schnittman SM, Greenhouse JJ, Psallidopoulos, Baseler M, salzman NP, Fauci AS, Lane C. Increasing viral burden in CD4+ T cells from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection reflects rapidly progressive immunosuppression and clinical disease. *Ann Intern Med* 1990; 113:438-443.
195. Guyer RL, Koshland DE, Jr. The Molecule of the Year. *Science* 1989; 246:1543-1546.
196. Peter JB. The polymerase chain reaction: amplifying our options. *Rev Infect Dis* 1991; 13:166-171.
197. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G. DNA amplification for direct

detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239:295-297.

198. Simmonds P, Balfe P, Peutherer JF, Ludlam CA, Bishop JO, Brown AJ. Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J Virol* 1990; 64:864-872.

199. Hewlett IK, Gregg R, Ou C. Detection in plasma of HIV-1 specific DNA and RNA by PCR before and after seroconversion. *J Clin Immunoassay* 1988; 11:161-164.

200. Castro BA, Cheng-Mayer C, Evans LA, Levy JA. HIV heterogeneity and viral pathogenesis. *AIDS* 1988; 2 Suppl 1:S17-S27.

201. Perez AL, Verdejo J, Gonzalez LJ, Gurbindo D, Hernandez-Sampelayo T, Moreno E, Azanedo M, Contreras G, Medrano L, Najera R. [Expression of different HIV-1 phenotypic subpopulations through the natural history of the infection]. *Med Clin (Barc)* 1998; 110:441-445.

202. Liesnard C, Delforge ML, Tchetcheff M, De M, V, Farber CM, Van Vooren JP. Importance of method in the determination of syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Virol Methods* 1997; 64:137-145.

203. Mulato AS, Lamy PD, Miller MD, Li WX, Anton KE, Hellmann NS, Cherrington JM. Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from AIDS patients after prolonged adefovir dipivoxil therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1620-1628.

204. Tedder RS, Kaye S, Loveday C, Weller IV, Jeffries D, Norman J, Weber J, Bourelly M, Foxall R, Babiker A, Darbyshire JH. Comparison of culture- and non-culture-based methods for quantification of viral load and

resistance to antiretroviral drugs in patients given zidovudine monotherapy. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1056-1063.

205. Daar ES, Chernyavskiy T, Zhao JQ, Krogstad P, Chen IS, Zack JA. Sequential determination of viral load and phenotype in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:3-9.

206. Peeters MF, Colebunders RL, Van den AK, Nys PC, Goeman J, Colans P, Geerts Y, Van der GG. Comparison of human immunodeficiency virus biological phenotypes isolated from cerebrospinal fluid and peripheral blood. *J Med Virol* 1995; 47:92-96.

207. Koot M, 't Wout AB, Kootstra NA, De Goede RE, Tersmette M, Schuitemaker H. Relation between changes in cellular load, evolution of viral phenotype, and the clonal composition of virus populations in the course of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1996; 173:349-354.

208. Delwart EL, Mullins JI, Gupta P, Learn GH, Jr., Holodniy M, Katzenstein D, Walker BD, Singh MK. Human immunodeficiency virus type 1 populations in blood and semen. *J Virol* 1998; 72:617-623.

209. Renta JY, Cadilla CL, Vega ME, Hillyer GV, Estrada C, Jimenez E, Abreu E, Mendez I, Gandia J, Melendez-Guerrero LM. Longitudinal studies on maternal HIV-1 variants by biological phenotyping, sequence analysis and viral load. *Cell Mol Biol* 1997; 43:1097-1114.

210. Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, Albert J, Scarlatti G, Littman DR, Fenyo EM. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 1997; 71:7478-7487.

211. McKnight A, Dittmar MT, Moniz-Periera J, Ariyoshi K, Reeves JD, Hibbitts S, Whitby D, Aarons E, Proudfoot AE, Whittle H, Clapham PR. A



broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J Virol* 1998; 72:4065-4071.

212. Zhang L, He T, Huang Y, Chen Z, Guo Y, Wu S, Kunstman KJ, Brown RC, Phair JP, Neumann AU, Ho DD, Wolinsky SM. Chemokine coreceptor usage by diverse primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1998; 1998 Nov;72:9307-9312.

213. Balotta C, Colombo MC, Colucci G, Vigano A, Riva C, Papagno L, Violin M, Crupi L, Bricalli D, Salvaggio A, Moroni M, Principi N, Galli M. Plasma viremia and virus phenotype are correlates of disease progression in vertically human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 1997; 16:205-211.

214. Fitzgibbon JE, Gaur S, Gavai M, Gregory P, Frenkel LD, John JF, Jr. Effect of the HIV-1 syncytium-inducing phenotype on disease stage in vertically-infected children. *J Med Virol* 1998; 55:56-63.

215. Dittmar MT, Simmons G, Donaldson Y, Simmonds P, Clapham PR, Schulz TF, Weiss RA. Biological characterization of human immunodeficiency virus type 1 clones derived from different organs of an AIDS patient by long-range PCR. *J Virol* 1997; 71:5140-5147.

216. Kaplan JE, Masur H, Holmes KK, Wilfert JE, Sperling R, Baker SA, Trapnell CB, Freedberg KA, Cotton D, Powderly WG, Jaffe HW. USPHS/IDSA guidelines for the prevention of opportunistic infections in persons infected with the human immunodeficiency virus: an overview. *Clin Infect Dis* 1995; 21:S12-S31.

217. Piscitelli SC, Flexner C, Minor JR, Polis MA, Masur H. Drug interactions in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1996; 23:685-693.

218. C.D.C. Guideline for prevention of transmission of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis B virus to health-care and public-safety workers. MMWR 1989; 38 (S-6):1-37.
219. DHHS. Guidelines for the use of antiretroviral agents in HIV-infected adults and adolescents. <http://www.hivatis.org> 2001.
220. Berenguer J, Laguna F, Lopez-Aldeguer J, Moreno S. [Prevention of opportunistic infections in adult and adolescent patients infected with the human immunodeficiency virus in the era of highly active antiretroviral therapy. Recommendations of the Grupo de Estudio del SIDA (GESIDA/Plan National sobre el SIDA]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:457-468.
221. Katlama C, Mouthon B, Gourdon D, Lapierre D, Rousseau F. Atovaquone as long-term suppressive therapy for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS and multiple drug intolerance. Atovaquone Expanded Access Group. *AIDS* 1996; 10:1107-1112.
222. Podzamczar D, Miro JM, FERRER I, Gatell JM. Thrice-weekly vs. daily sulfadiazine- pyrimethamine(SP) for maintenance therapy of toxoplasmic encephalitis (TE). 5th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, February 1-5, 1998. Chicago, IL.
223. Drew WL, Ives D, Lalezari JP, Crumpacker C, Follansbee S, Spector SA, Benson CA, Friedberg DN, Hubbard L, Stempien MJ, Shadman A, Buhles W. Oral ganciclovir as maintenance treatment for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *N Engl J Med* 1995; 333:615-620.
224. Chaisson RE, Benson CA, Dube MP. Clarithromycin therapy for bacteremic *Mycobacterium avium* complex disease: a randomized, double-blind, dose-ranging study of patients with AIDS. *Ann Intern Med* 1994; 121:905-911.

225. Lew J, Reichelderfer P, Fowler M, Bremer J, Carrol R, Cassol S, Chernoff D, Coombs R, Cronin M, Dickover R, Fiscus S, Herman S, Jackson B, Kornegay J, Kovacs A, McIntosh K, Meyer W, Michael N, Mofenson L, Moye J, Quinn T, Robb M, Vahey M, Weiser B, Yeghiazarian T. Determinations of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: reassessment of parameters affecting assay outcome. TUBE Meeting Workshop Attendees. Technology Utilization for HIV-1 Blood Evaluation and Standardization in Pediatrics. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1471-1479.

226. Carpenter CC, Cooper D, Fischl M, Gatell JM, Gazzard B, Hammer S, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein D, Montaner J, Richman DD, Saag M, Schechter M, Schooley R, Thompson M, Vella S, Yeni P, Volberding PA. Antiretroviral therapy in adults. Updated recommendation of the International AIDS Society-USA panel. *JAMA* 2000; 283:381-391.

227. Gazzard B, Moyle G, BHIVA Guidelines Writing Committee. 1998 revision to the British HIV Association guidelines for antiretroviral treatment of HIV seropositive individuals. *Lancet* 1998; 352:314-316.

228. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, Aschman DJ, Holmberg SD. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1998; 338:853-860.

229. Miro JM, Antela A, Arrizabalaga J, Clotet B, Gatell JM, Guerra L, Antonio IJ, Laguna F, Moreno S, Parras F, Rubio R, Santamaria JM, Viciano P. [Recommendations of GESIDA (Grupo de Estudio de SIDA)/National Plan on AIDS with respect to the anti-retroviral treatment in adult patients infected with the human immunodeficiency virus in the year 2000 (II)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:396-412.

230. Miro JM, Antela A, Arrizabalaga J, Clotet B, Gatell JM, Guerra L, Iribarren JA, Laguna F, Moreno S, Parras F, Rubio R, Santamaria JM,

Viciano P. [Recommendation of GESIDA (AIDS Study Group)/National Plan on AIDS with respect to the anti-retroviral treatment in adult patients infected with the human immunodeficiency virus in the year 2000 (I)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:329-351.

231. Schragar LK, D'Souza MP. Cellular and anatomical reservoirs of HIV-1 in patients receiving potent antiretroviral combination therapy. *JAMA* 1998; 280:67-71.

232. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, Smith K, Lisziewicz J, Lori F, Flexner C, Quinn TC, Chaisson RE, Rosenberg E, Walker B, Gange S, Gallant J, Siliciano RF. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5:512-517.

233. Plana M, García F, Gallart MT, Tortajada C, Soriano A, Palou E, Maleno M, Barcelo J, Vidal C, Cruceta A, Miró JM, Gatell JM. Immunological benefits of antiretroviral therapy in very early stages of asymptomatic chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2000; 14:1921-1933.

234. Tortajada C, Garcia F, Plana M, Gallart T, MALENO MJ, Miro JM, Gatell JM. Comparison of T-cell subsets' reconstitution after 12 months of highly active antiretroviral therapy initiated during early versus advanced states of HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 25:296-305.

235. Plana M, Garcia F, Gallart T, Miro JM, Gatell JM. Lack of T-cell proliferative response to HIV-1 antigens after 1 year of highly active antiretroviral treatment in early HIV-1 disease. Immunology Study Group of Spanish EARTH-1 Study. *Lancet* 1998; 352:1194-1195.

236. Autran B, Carcelain G, Tubiana R, CALVEZ V, Mallet A, Debre P, Katlama C. Effects of antiretroviral therapy on immune reconstitution. 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. 1999.

237. Rizzardì GP, Tambussi G, Bart PA, Chapuis AG, Lazzarin A, Pantaleo G. Virological and immunological responses to HAART in asymptomatic therapy-naïve HIV-1-infected subjects according to CD4 cell count. *AIDS* 2000; 14:2257-2263.
238. Bart PA, Rizzardì GP, Tambussi G, Chave JP, Chapuis AG, Graziosi C, Corpataux JM, Halkic N, Meuwly JY, Munoz M, Meylan P, Spreen W, McDade H, Yerly S, Perrin L, Lazzarin A, Pantaleo G. Immunological and virological responses in HIV-1-infected adults at early stage of established infection treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2000; 14:1887-1897.
239. Fleury S, Rizzardì GP, Chapuis A, Tambussi G, Knabenhans C, Simeoni E, Meuwly JY, Corpataux JM, Lazzarin A, Miedema F, Pantaleo G. Long-term kinetics of T cell production in HIV-infected subjects treated with highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5393-5398.
240. Autran B, Carcelain G. *AIDS*. Boosting immunity to HIV--can the virus help? *Science* 2000; 290:946-949.
241. Lori F, Lisziewicz J. Role of immune modulation in primary HIV infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14:45-48.
242. Garcia F, Plana M, Ortiz GM, Bonhoeffer S, Soriano A, Vidal C, Cruceta A, Arnedo M, Gil C, Pantaleo G, Pumarola T, Gallart T, Nixon DF, Miro JM, Gatell JM. The virological and immunological consequences of structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15:F29-F40.
243. Ruiz L, Carcelain G, Martínez-Picado J, Frost S, Marfil S, Paredes R, Romeu J, Ferrer E, Morales-Lopetegi K, Autran B, Clotet B. HIV dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection. *AIDS* 2001; 15:F19-F27.

244. Lisziewicz J, JESSEN H, Finzi D, Siliciano RF, Lori F. HIV-1 suppression by early treatment with hydroxyurea, didanosine and a protease inhibitor [letter]. *Lancet* 1998; 352[9123]:199-200.
245. Lori F, Lewis M, Xu J, Varga G, Zinn D, Crabbs C, Wagner W, Greenhouse J, Silvera P, Yalley-Ogunro J, Tinelli C, Lisziewicz J. Control of SIV rebound through structured treatment interruptions during early infection. *Science* 2000; 290:1591-1593.
246. Lori F, JESSEN H, Lieberman J, Finzi D, Rosenberg E, Tinelli C, Walker B, Siliciano RF, Lisziewicz J. Treatment of human immunodeficiency virus infection with hydroxyurea, didanosine, and a protease inhibitor before seroconversion is associated with normalized immune parameters and limited viral reservoir. *J Infect Dis* 1999; 180:1827-1832.
247. Lori F, Lisziewicz J. Rationale for the use of hydroxyurea as an anti-human immunodeficiency virus drug. *Clin Infect Dis* 2000; 30:S193-S197.
248. Ravot E, Tambussi G, JESSEN H, Tinelli C, Lazzarin A, Lisziewicz J, Lori F. Effects of hydroxyurea on T cell count changes during primary HIV infection. *AIDS* 2000; 14:619-622.
249. Chapuis A, Rizzardì P, D'Agostini C, Attinger A, Knabenhans C, Fleury S, Acha-Orbea H, Pantaleo G. Effects of mycophenolic acid on human immunodeficiency virus infection in vitro and in vivo. *Nat Med* 2000; 6:762-768.
250. Valentine F, Degruittola V. Immunological and virological evaluations of the effects of HAART compared to HAART plus an inactivated HIV immunogen after 32 weeks. 6th Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections. 1999. Chicago, IL.
251. Chun TW, Engel D, Mizell SB, Hallahan CW, Fischette M, Park S, Davey RT, Jr., Dybul M, Kovacs JA, Metcalf JA, Mican JM, Berrey MM,

Corey L, Lane HC, Fauci AS. Effect of interleukin-2 on the pool of latently infected resting CD4+ cells in HIV-1-infected patients receiving highly active anti-retroviral therapy. *Nat Med* 1999; 5:651-655.

252. Lori F, Maserati R, Foli A, SEMINARI E, Timpone J, Lisziewicz J. Structured treatment interruptions to control HIV-1 infection. *Lancet* 2000; 355:287-288.

253. Garcia F, Plana M, Vidal C, Cruceta A, O'Brien WA, Pantaleo G, Pumarola T, Gallart T, Miro JM, Gatell JM. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13:F79-F86.

254. Rizzardì GP, Vaccarezza M, Capiluppi B, Tambussi G, Lazzarin A, Pantaleo G. Cyclosporin A in combination with HAART in primary HIV-1 infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14:79-81.

255. Foley KM. Competent care for the dying instead of physician-assisted suicide. *N Engl J Med* 1997; 336:54-58.

256. Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses [comment]. *J Exp Med* 1998; 1998 Dec 21;188:2199-2204.

257. Callan MF, Tan L, Annels N, Ogg GS, Wilson JD, O'Callaghan CA, Steven N, McMichael AJ, Rickinson AB. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. *J Exp Med* 1998; 187:1395-1402.

258. Paul WE. Can the immune response control HIV infection? *Cell* 1995; 82:177-182.

259. Letvin NL. Progress in the development of an HIV-1 vaccine. *Science* 1998; 280:1875-1880.

260. Kanki PJ, Hamel DJ, Sankale JL, Hsieh C, Thior I, Barin F, Woodcock SA, Gueye-Ndiaye A, Zhang E, Montano M, Siby T, Marlink R, NDoye I, Essex ME, Mboup S. Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression. *J Infect Dis* 1999; 179:68-73.
261. Mummidi S, Ahuja SS, Gonzalez E, Anderson SA, Santiago EN, Stephan KT, Craig FE, O'Connell P, Tryon V, Clark RA, Dolan MJ, Ahuja SK. Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression. *Nat Med* 1998; 4:786-793.
262. Balotta C, Bagnarelli P, Corvasce S, Mazzucchelli R, Colombo MC, Papagno L, Santambrogio S, Ridolfo AL, Violin M, Berlusconi A, Velleca R, Facchi G, Moroni M, Clementi M, Galli M. Identification of two distinct subsets of long-term nonprogressors with divergent viral activity by stromal-derived factor 1 chemokine gene polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1999; 180:285-289.
263. Nixon DF, Broliden K, Ogg G, Broliden PA. Cellular and humoral antigenic epitopes in HIV and SIV. *Immunology* 1992; 76:515-534.
264. Levy JA. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. *Trends Immunol* 2001; 22:312-316.
265. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-344.
266. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; 173:89-97.
267. Sullivan BL, Knopoff EJ, Saifuddin M, Takefman DM, Saarloos MN, Sha BE, Spear GT. Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *J Immunol* 1996; 157:1791-1798.



268. Spear GT, Sullivan BL, Landay AL, Lint TF. Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by complement occurs by viral lysis. *J Virol* 1990; 64:5869-5873.
269. Spear GT, Landay AL, Sullivan BL, Dittel B, Lint TF. Activation of complement on the surface of cells infected by human immunodeficiency virus. *J Immunol* 1990; 144:1490-1496.
270. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:189-220.:189-220.
271. Matsukawa A, Hogaboam CM, Lukacs NW, Kunkel SL. Chemokines and innate immunity. *Rev Immunogenet* 2000; 2:339-358.
272. Garzino-Demo A, Devico AL, Conant KE, Gallo RC. The role of chemokines in human immunodeficiency virus infection. *Immunol Rev* 2000; 177:79-87.
273. Graziosi C, Gantt KR, Vaccarezza M, Demarest JF, Daucher M, Saag MS, Shaw GM, Quinn TC, Cohen OJ, Welbon CC, Pantaleo G, Fauci AS. Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:4386-4391.
274. Pomerantz RJ, Hirsch MS. Interferon and human immunodeficiency virus infection. *Interferon* 1987; 9:113-27.:113-127.
275. Bogdan C. The function of type I interferons in antimicrobial immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:419-424.
276. Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 178:1655-1663.

277. Rogge L, D'Ambrosio D, Biffi M, Penna G, Minetti LJ, Presky DH, Adorini L, Sinigaglia F. The role of Stat4 in species-specific regulation of Th cell development by type I IFNs. *J Immunol* 1998; 161:6567-6574.
278. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:593-620.:593-620.
279. Lennert K, Kaiserling E, Muller-Hermelink HK. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* 1975; 1:1031-1032.
280. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-1837.
281. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal MR, Liu YJ. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283:1183-1186.
282. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
283. Liu YJ, Kadowaki N, Rissoan MC, Soumelis V. T cell activation and polarization by DC1 and DC2. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 251:149-159.
284. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, Huang L, Levy JA, Liu YJ. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001; 98:906-912.
285. Pulendran B, Banchereau J, Burkeholder S, Kraus E, Guinet E, Chalouni C, Caron D, Maliszewski C, Davoust J, Fay J, Palucka K. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol* 2000; 165:566-572.

286. Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med* 2000; 192:F39-F44.
287. Baum LL, Cassutt KJ, Knigge K, Khattri R, Margolick J, Rinaldo C, Kleeberger CA, Nishanian P, Henrard DR, Phair J. HIV-1 gp120-specific antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity correlates with rate of disease progression. *J Immunol* 1996; 157:2168-2173.
288. Szalc CM, Mitcheltree C, Roberts RL, Stiehm ER. Deficient polymorphonuclear cell and mononuclear cell antibody-dependent cellular cytotoxicity in pediatric and adult human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1992; 166:486-493.
289. Fehniger TA, Herbein G, Yu H, Para MI, Bernstein ZP, O'Brien WA, Caligiuri MA. Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. *J Immunol* 1998; 161:6433-6438.
290. Nixon DF, McMichael AJ. Cytotoxic T-cell recognition of HIV proteins and peptides. *AIDS* 1991; 5:1049-1059.
291. Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells. *Immunol Today* 1996; 17:217-224.
292. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986; 234:1563-1566.
293. Truong MJ, Darcissac EC, Hermann E, Dewulf J, Capron A, Bahr GM. Interleukin-16 inhibits human immunodeficiency virus type 1 entry and replication in macrophages and in dendritic cells. *J Virol* 1999; 73:7008-7013.

294. Mackewicz CE, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity: nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8:1039-1050.
295. Landay AL, Mackewicz CE, Levy JA. An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69:106-116.
296. Cocchi F, Devico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995; 270:1811-1815.
297. Baier M, Werner A, Bannert N, Metzner K, Kurth R. HIV suppression by interleukin-16. *Nature* 1995; 378:563-563.
298. Chase MJ, Klebanoff SJ. Viricidal effect of stimulated human mononuclear phagocytes on human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:5582-5585.
299. Klebanoff SJ, Coombs RW. Viricidal effect of polymorphonuclear leukocytes on human immunodeficiency virus-1. Role of the myeloperoxidase system. *J Clin Invest* 1992; 89:2014-2017.
300. Knight SC. Bone-marrow-derived dendritic cells and the pathogenesis of AIDS. *AIDS* 1996; 10:807-817.
301. Wallace M, Bartz SR, Chang WL, Mackenzie DA, Pauza CD, Malkovsky M. Gamma delta T lymphocyte responses to HIV. *Clin Exp Immunol* 1996; 103:177-184.
302. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994; 68:6103-6110.

303. Moore JP, Cao Y, Ho DD, Koup RA. Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994; 68:5142-5155.
304. Reimann KA, Tenner-Racz K, Racz P, Montefiori DC, Yasutomi Y, Lin W, Ransil BJ, Letvin NL. Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Virol* 1994; 68:2362-2370.
305. Pantaleo G, Fauci AS. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:487-512.:487-512.
306. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, Cohen OJ, Vaccarezza M, Gantt K, Muro-Cacho C, Fauci AS. Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol Rev* 1994; 140:105-130.
307. Pantaleo G, Cohen OJ, Schacker T, Vaccarezza M, Graziosi C, Rizzardì GP, Kahn J, Fox CH, Schnittman SM, Schwartz DH, Corey L, Fauci AS. Evolutionary pattern of human immunodeficiency virus (HIV) replication and distribution in lymph nodes following primary infection: implications for antiviral therapy. *Nat Med* 1998; 4:341-345.
308. Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS* 1999; 13 Suppl A:S137-62.:S137-S162.
309. Poignard P, Sabbe R, Picchio GR, Wang M, Gulizia RJ, Katinger H, Parren PW, Mosier DE, Burton DR. Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* 1999; 10:431-438.
310. Igarashi T, Brown C, Azadegan A, Haigwood N, Dimitrov D, Martin MA, Shibata R. Human immunodeficiency virus type 1 neutralizing

antibodies accelerate clearance of cell-free virions from blood plasma. *Nat Med* 1999; 5:211-216.

311. Shibata R, Igarashi T, Haigwood N, Buckler-White A, Ogert R, Ross W, Willey R, Cho MW, Martin MA. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat Med* 1999; 5:204-210.

312. Dimmock NJ. Neutralization of animal viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1993; 183:1-149.:1-149.

313. Broder CC, Earl PL, Long D, Abedon ST, Moss B, Doms RW. Antigenic implications of human immunodeficiency virus type 1 envelope quaternary structure: oligomer-specific and -sensitive monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:11699-11703.

314. Laal S, Burda S, Gorny MK, Karwowska S, Buchbinder A, Zolla-Pazner S. Synergistic neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by combinations of human monoclonal antibodies. *J Virol* 1994; 68:4001-4008.

315. McKeating J, Balfe P, Clapham P, Weiss RA. Recombinant CD4-selected human immunodeficiency virus type 1 variants with reduced gp120 affinity for CD4 and increased cell fusion capacity. *J Virol* 1991; 65:4777-4785.

316. Montefiori DC, Graham BS, Zhou J, Zhou J, Bucco RA, Schwartz DH, Cavacini LA, Posner MR. V3-specific neutralizing antibodies in sera from HIV-1 gp160-immunized volunteers block virus fusion and act synergistically with human monoclonal antibody to the conformation-dependent CD4 binding site of gp120. NIH-NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *J Clin Invest* 1993; 92:840-847.

317. Sattentau QJ, Moore JP. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J Exp Med* 1995; 182:185-196.
318. Sullivan N, Sun Y, Li J, Hofmann W, Sodroski J. Replicative function and neutralization sensitivity of envelope glycoproteins from primary and T-cell line-passaged human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol* 1995; 69:4413-4422.
319. Evans DT, Jing P, Allen TM, O'Connor DH, Horton H, Venham JE, Piekarczyk M, Dzuris J, Dykhuzen M, Mitchen J, Rudersdorf RA, Pauza CD, Sette A, Bontrop RE, DeMars R, Watkins DI. Definition of five new simian immunodeficiency virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes and their restricting major histocompatibility complex class I molecules: evidence for an influence on disease progression. *J Virol* 2000; 74:7400-7410.
320. Evans DT, O'Connor DH, Jing P, Dzuris JL, Sidney J, da Silva J, Allen TM, Horton H, Venham JE, Rudersdorf RA, Vogel T, Pauza CD, Bontrop RE, DeMars R, Sette A, Hughes AL, Watkins DI. Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses select for amino-acid variation in simian immunodeficiency virus Env and Nef. *Nat Med* 1999; 5:1270-1276.
321. Brodie SJ, Lewinsohn DA, Patterson BK, Jiyamapa D, Krieger J, Corey L, Greenberg PD, Riddell SR. In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic T cells [see comments]. *Nat Med* 1999; 1999 Jan;5:34-41.
322. Chun TW, Justement JS, Moir S, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, McLaughlin M, Dybul M, Mican JM, Fauci AS. Suppression of HIV replication in the resting CD4+ T cell reservoir by autologous CD8+ T cells: implications for the development of therapeutic strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:253-258.

323. Yang OO, Kalams SA, Trocha A, Cao H, Luster A, Johnson RP, Walker BD. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells:evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol* 1997; 71:3120-3128.
324. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994; 68:8056-8063.
325. Rosenberg ES, Walker BD. HIV type 1-specific helper T cells: a critical host defense. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14 Suppl 2:S143-7.:S143-S147.
326. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998; 188:2205-2213.
327. Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, Billingsley JM, Colbert DS, Jones NG, Shea AK, Trocha AK, Walker BD. Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999; 73:6715-6720.
328. Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, Jones NG, Trocha AK, Ogg GS, Walker BD. Levels of human immunodeficiency virus type-1-specific cytotoxic T-lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 1999; 73:6721-6728.
329. Pitcher C, Quittner C, Peterson D. HIV-1 specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* 1999; 5:518.
330. Wasik TJ, Wierzbicki A, Whiteman VE, Trinchieri G, Lischner HW, Kozbor D. Association between HIV-specific T helper responses and CTL activities in pediatric AIDS. *Eur J Immunol* 2000; 30:117-127.



331. Yang OO, Kalams SA, Rosenzweig M, Trocha A, Jones N, Koziel M, Walker BD, Johnson RP. Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1996; 70:5799-5806.
332. Berke G. Killing mechanisms of cytotoxic lymphocytes. *Curr Opin Hematol* 1997; 4:32-40.
333. Berke G. Unlocking the secrets of CTL and NK cells. *Immunol Today* 1995; 16:343-346.
334. Yang OO, Walker BD. CD8+ cells in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: cytolytic and noncytolytic inhibition of viral replication. *Adv Immunol* 1997; 66:273-311.
335. Severino ME, Sipsas NV, Nguyen PT, Kalams SA, Walker BD, Johnson RP, Yang OO. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary CD4(+) T lymphocytes, monocytes, and dendritic cells by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 2000; 74:6695-6699.
336. Goulder PJ, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, Walker BD. Anti-HIV cellular immunity: recent advances towards vaccine design. *AIDS* 1999; 13 Suppl:S121-S136.
337. Brander C, Walker BD. T lymphocyte responses in HIV-1 infection: implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol* 1999; 11:451-459.
338. Goulder PJ, Altfeld MA, Rosenberg ES, Nguyen T, Tang Y, Eldridge RL, Addo MM, He S, Mukherjee JS, Phillips MN, Bunce M, Kalams SA, Sekaly RP, Walker BD, Brander C. Substantial differences in specificity of HIV-specific cytotoxic T cells in acute and chronic HIV infection. *J Exp Med* 2001; 193:181-194.

339. Jassoy C, Harrer T, Rosenthal T, Navia BA, Worth J, Johnson RP, Walker BD. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes release gamma interferon, tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), and TNF-beta when they encounter their target antigens. *J Virol* 1993; 67:2844-2852.
340. Bollinger RC, Quinn TC, Liu AY, Stanhope PE, Hammond SA, Viveen R, Clements ML, Siliciano RF. Cytokines from vaccine-induced HIV-1 specific cytotoxic T lymphocytes: effects on viral replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9:1067-1077.
341. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, STAPRANS SI, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD, Yilma T, Caliendo AM, Johnson RP, Buchbinder SP, Walker BD. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:585-592.
342. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE. Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected Macaques. *J Exp Med* 1999; 189:991-998.
343. Dorrell L, Willcox BE, Jones EY, Gillespie G, Njai H, Sabally S, Jaye A, DeGleria K, Rostron T, Lepin E, McMichael A, Whittle H, Rowland-Jones S. Cytotoxic T lymphocytes recognize structurally diverse, clade-specific and cross-reactive peptides in human immunodeficiency virus type-1 gag through HLA-B53. *Eur J Immunol* 2001; 31:1747-1756.
344. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274:94-96.
345. Kaul R, Dong T, Plummer FA, Kimani J, Rostron T, Kiama P, Njagi E, Irungu E, Farah B, Oyugi J, Chakraborty R, MacDonald KS, Bwayo JJ, McMichael A, Rowland-Jones SL. CD8(+) lymphocytes respond to different

HIV epitopes in seronegative and infected subjects. *J Clin Invest* 2001; 107:1303-1310.

346. Kaul R, Rowland-Jones SL, Kimani J, Dong T, Yang HB, Kiama P, Rostron T, Njagi E, Bwayo JJ, MacDonald KS, McMichael AJ, Plummer FA. Late seroconversion in HIV-resistant Nairobi prostitutes despite pre-existing HIV-specific CD8+ responses. *J Clin Invest* 2001; 107:341-349.

347. Riviere Y, Tanneau-Salvadori F, Regnault A, Lopez O, Sansonetti P, Guy B, Kieny MP, Fournel JJ, Montagnier L. Human immunodeficiency virus-specific cytotoxic responses of seropositive individuals: distinct types of effector cells mediate killing of targets expressing gag and env proteins. *J Virol* 1989; 63:2270-2277.

348. Bevan MJ, Braciale TJ. Why can't cytotoxic T cells handle HIV? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:5765-5767.

349. Hoffenbach A, Langlade-Demoyen P, Dadaglio G, Vilmer E, Michel F, Mayaud C, Autran B, Plata F. Unusually high frequencies of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in humans. *J Immunol* 1989; 142:452-462.

350. Joly P, Guillon JM, Mayaud C, Plata F, Theodorou I, Denis M, Debre P, Autran B. Cell-mediated suppression of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1989; 143:2193-2201.

351. Pantaleo G, De Maria A, Koenig S, Butini L, Moss B, Baseler M, Lane HC, Fauci AS. CD8+ T lymphocytes of patients with AIDS maintain normal broad cytolytic function despite the loss of human immunodeficiency virus-specific cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:4818-4822.

352. Walker BD, Plata F. Cytotoxic T lymphocytes against HIV. *AIDS* 1990; 4:177-184.

353. Carmichael A, Jin X, Sissons P, Borysiewicz L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T

lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med* 1993; 177:249-256.

354. Rinaldo CR, Jr., Beltz LA, Huang XL, Gupta P, Fan Z, Torpey DJ, III. Anti-HIV type 1 cytotoxic T lymphocyte effector activity and disease progression in the first 8 years of HIV type 1 infection of homosexual men. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11:481-489.

355. Klein MR, Baalen CA, Horverda AM, Kerkhoff G, Bende RJ, Keet IPGD, Eeftinck JK, Osterhaus AD, Miedema F. Kinetics of gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med* 1995; 181:1365-1372.

356. Newman MJ, Munroe KJ, Anderson CA, Murphy CI, Panicali DL, Seals JR, Wu JY, Wyand MS, Kensil CR. Induction of antigen-specific killer T lymphocyte responses using subunit SIVmac251 gag and env vaccines containing QS-21 saponin adjuvant. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10:853-861.

357. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987; 328:345-348.

358. Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debre P. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* 1987; 328:348-351.

359. Harrer T, Harrer E, Barbosa P, Kaufmann F, Wagner R, Bruggemann S, Kalden JR, Feinberg M, Johnson RP, Buchbinder S, Walker BD. Recognition of two overlapping CTL epitopes in HIV-1 p17 by CTL from a long-term nonprogressing HIV-1-infected individual. *J Immunol* 1998; 161:4875-4881.

360. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Barbosa P, Trocha A, Johnson RP, Elbeik T, Feinberg MB, Buchbinder SP, Walker BD. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J Immunol* 1996; 156:2616-2623.
361. Rowland-Jones SL, McMichael A. Immune responses in HIV-exposed seronegatives: have they repelled the virus? *Curr Opin Immunol* 1995; 7:448-455.
362. Rowland-Jones SL, Dong T, Fowke KR, Kimani J, Krausa P, Newell H, Blanchard T, Ariyoshi K, Oyugi J, Ngugi E, Bwayo J, MacDonald KS, McMichael AJ, Plummer FA. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J Clin Invest* 1998; 102:1758-1765.
363. Herr W, Protzer U, Lohse AW, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH, Wolfel T. Quantification of CD8+ T lymphocytes responsive to human immunodeficiency virus (HIV) peptide antigens in HIV-infected patients and seronegative persons at high risk for recent HIV exposure. *J Infect Dis* 1998; 178:260-265.
364. Mackewicz CE, Yang LC, Lifson JD, Levy JA. Non-cytolytic CD8 T-cell anti-HIV responses in primary HIV-1 infection. *Lancet* 1994; 344:1671-1673.
365. Riddell SR, Reusser P, Greenberg PD. Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients. *Rev Infect Dis* 1991; 13:S966-S973.
366. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone

marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991; 78:1373-1380.

367. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333:1038-1044.

368. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR. Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 1995; 346:1006-1007.

369. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98:706-714.

370. Eyster ME, Fried MW, Diseglie AM. Increasing hepatitis C virus RNA levels in hemophiliacs: relationship to HIV infection and liver disease. *Blood* 1994; 84:1020-1023.

371. Valentine FT, Paolino A, Saito A, Holzman RS. Lymphocyte-proliferative responses to HIV antigens as a potential measure of immunological reconstitution in HIV disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:S161-S166.

372. Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992; 175:331-340.

373. Cottrez F, Manca F, Dalgleish AG, Arenzana-Seisdedos F, Capron A, Groux H. Priming of human CD4<sup>+</sup> antigen-specific T cells to undergo

apoptosis by HIV-infected monocytes. A two-step mechanism involving the gp120 molecule. *J Clin Invest* 1997; 99:257-266.

374. Dybul M, Mercier G, Belson M, Hallahan CW, Liu S, Perry C, Herpin B, Ehler L, Davey RT, Metcalf JA, Mican JM, Seder RA, Fauci AS. CD40 ligand trimer and IL-12 enhance peripheral blood mononuclear cells and CD4+ T cell proliferation and production of IFN-gamma in response to p24 antigen in HIV-infected individuals: potential contribution of anergy to HIV-specific unresponsiveness. *J Immunol* 2000; 165:1685-1691.

375. Musey LK, Krieger JN, Hughes JP, Schacker TW, Corey L, McElrath MJ. Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T helper dysfunction in blood and lymph nodes following acute HIV-1 infection. *J Infect Dis* 1999; 180:278-284.

376. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease [see comments]. *Science* 1997; 277:112-116.

377. Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA. Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus infected subjects treated with and HIV specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996; 173:321-329.

378. Connors M, Kovacs JA, Krevat S, Gea-Banacloche JC, Sneller MC, Flanigan M, Metcalf JA, Walker RE, Falloon J, Baseler M, Feuerstein I, Masur H, Lane HC. HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies [see comments]. *Nat Med* 1997; 3:533-540.

379. Zaunders JJ, Cunningham PH, Kelleher AD, Kaufmann GR, Jaramillo AB, Wright R, Smith D, Grey P, Vizzard J, Carr A, Cooper DA. Potent

antiretroviral therapy of primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: partial normalization of T lymphocyte subsets and limited reduction of HIV-1 DNA despite clearance of plasma viremia. *J Infect Dis* 1999; 180:320-329.

380. Markowitz M, Vesanen M, Tenner-Racz K, Cao Y, Binley JM, Talal A, Hurley A, JX, Chaudhry MR, Yaman M, Frankel S, Heath-Chiozzi M, Leonard JM, Moore JP, Racz P, Nixon DF, Ho DD, Ji X. The effect of commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses [published erratum appears in *J Infect Dis* 1999 May; 179(5):1315]. *J Infect Dis* 1999; 1999 Mar;179:527-537.

381. Zaunders JJ, Kaufmann GR, Cunningham PH, Smith D, Grey P, Suzuki K, Carr A, Goh LE, Cooper DA. Increased turnover of CCR5+ and redistribution of CCR5- CD4 T lymphocytes during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2001; 183:736-743.

382. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon S, Phillips M, Wilkes B, Eldridge R, Robbins G, D'Aquila R, Goulder PJ, Walker BD. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000; 407:523-526.

383. Kumar A, Buch S, Foresman L, Bischofberger N, Lifson JD, Narayan O. Development of virus-specific immune responses in SHIV(KU)-infected macaques treated with PMPA. *Virology* 2001; 279:97-108.

384. Oxenius A, Easterbrook P, Easterbrook P, O'Callaghan C, Kelleher A, Whelan J, Sontag G, Sewell A, Phillips R. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8+ and CD4+ T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:3382-3387.

385. Malhotra U, Berrey MM, Huang Y, Markee J, Brown D, Ap S, Musey L, Schacker T, Corey L, McElrath M. Effect of combination antiretroviral



therapy on T-cell immunity in acute immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000; 181:121-131.

386. Haase AT, Stowring L, Narayan P, Griffin D, Price D. Slow persistent infection caused by visna virus: role of host restriction. *Science* 1977; 195:175-177.

387. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. *Science* 1996; 271:1582-1586.

388. Zinkernagel RM, Hengartner H. T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS. *Immunol Today* 1994; 15:262-268.

389. Gulizia RJ, Collman RG, Levy JA, Trono D, Mosier DE. Deletion of nef slows but does not prevent CD4-positive T-cell depletion in human immunodeficiency virus type 1-infected human-PBL-SCID mice. *J Virol* 1997; 71:4161-4164.

390. Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in HIV infection. *Immunology Today* 1988; 5:150-155.

391. Fuchs D, Jager H, Popescu M, Reibnegger G, Werner ER, Dierich MP, Kaboth W, Tilz GP, Wachter H. Immune activation markers to predict AIDS and survival in HIV-1 seropositives. *Immunol Lett* 1990; 26:75-79.

392. Ameisen JC, Capron A. Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol Today* 1991; 12:102-105.

393. Heeney JL. Aids: a disease of impaired th-cell renewal? *Immunol Today* 1995; 16:515-520.

394. Gozlan M. Update on hiv transmission and pathogenesis [news]. Lancet 1995; 346:1290-1290.
395. Tenner-Rácz K, Rácz P, Dietrich M, si. Altered follicular dendritic cells and virus-like particles in AIDS-related lymphadenopathy. Lancet 1985; 1:105-105.
396. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. Semin Immunol 1993; 5:157-163.
397. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. AIDS 1993; 7 Suppl 1:S19-23.:S19-S23.
398. Lane HC, Masur H, Gelmann E, si. Correlation between immunologic dysfunction and clinical subpopulations of patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Am J Med 1985; 78:417-422.
399. Krowka jf, Stites DP, Jain S, et al. Lymphocyte proliferative responses to human immunodeficiency virus antigens in vitro. J Clin Invest 1989; 83:1198-1203.
400. Bird AG. Clinical and immunological assessment of HIV infection. J Clin Pathol 1992; 45:850-854.
401. Gottlieb MS, Fahey JL. Immunologic alterations in acquired immune deficiency syndrome. Antibiot Chemother 1983; 32:99-104.:99-104.
402. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). Immunology 1985; 56:351-358.
403. Smith CA, Williams GT, Kingston R, Jenkinson EJ, Owen JJ. Apoptosis. Nature 1989; 338:10.

404. Newell MK, Haughn LJ, Maroun CR, Julius MH. Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 1990; 347:286-289.
405. Meyaard L, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV infection: result of immune activation? *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 200:213-21.:213-221.
406. Fauci AS. The human immunodeficiency virus: infectivity and mechanisms of pathogenesis. *Science* 1988; 239:617-622.
407. Golding H, Robey FA, Gates FT, III, Linder W, Beining PR, Hoffman T, Golding B. Identification of homologous regions in human immunodeficiency virus I gp41 and human MHC class II beta 1 domain. I. Monoclonal antibodies against the gp41-derived peptide and patients' sera react with native HLA class II antigens, suggesting a role for autoimmunity in the pathogenesis of acquired immune deficiency syndrome. *J Exp Med* 1988; 167:914-923.
408. Golding H, Shearer GM, Hillman K, Lucas P, Manischewitz J, Zajac RA, Clerici M, Gress RE, Boswell RN, Golding B. Common epitope in human immunodeficiency virus (HIV) I-GP41 and HLA class II elicits immunosuppressive autoantibodies capable of contributing to immune dysfunction in HIV I-infected individuals. *J Clin Invest* 1989; 83:1430-1435.
409. Lanzavecchia A. Immunology. Licence to kill. *Nature* 1998; 393:413-414.
410. Oyaizu N, Chirmule N, Kalyanaraman VS, Hall WW, Pahwa R, Shuster M, Pahwa S. Human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120 produces immune defects in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes by inhibiting interleukin 2 mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87:2379-2383.

411. Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Meteleev V, Pardee AB. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science* 1995; 268:429-431.
412. Giorgi JV, Ho HN, Hirji K, Chou CC, Hultin LE, O'Rourke S, Park L, Margolick JB, Ferbas J, Phair JP. CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38- CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. *J Infect Dis* 1994; 170:775-781.
413. Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999; 179:859-870.
414. Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; 262:1011-1018.
415. Rinaldo C, Huang XL, Fan ZF, Ding M, Beltz L, Logar A, Panicali D, Mazzara G, Liebmann J, Cottrill M. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J Virol* 1995; 69:5838-5842.
416. Bedini JL, Garcia F, Miro JM, Aznar E, Serrano J, Lozano L, Mallolas J, Filella X, Vidal J, Latorre X, Gatell JM. Serum levels of B2-microglobulin, neopterin, TNF- $\alpha$  and soluble receptors of TNF- $\alpha$  and interleukin-2 in intravenous drug abusers according to HIV-1 status and stage of the HIV-1 infec. *Clin Microb Infec* 1998; 4:4-10.
417. Shearer GM, Clerici M. Protective immunity against HIV infection: has nature done the experiment for us? *Immunol Today* 1996; 17:21-24.

418. Beretta A, Furci L, Burastero S, Cosma A, Dinelli ME, Lopalco L, DeSantis C, Tambussi G, Carrow E, Sabbatani S, Clerici M, Lazzarin A, Siccardi AG. HIV-1-specific immunity in persistently seronegative individuals at high risk for HIV infection. *Immunol Lett* 1996; 51:39-43.
419. Beretta A, Weiss SH, Rappocciolo G, Mayur R, De Santis C, Quirinale J, Cosma A, Robbioni P, Shearer GM, Berzofsky JA. Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-seronegative injection drug users at risk for HIV exposure have antibodies to HLA class I antigens and T cells specific for HIV envelope. *J Infect Dis* 1996; 173:472-476.
420. Paul WE. Reexamining AIDS research priorities. *Science* 1995; 267:633-636.
421. Clerici M, Berzofsky JA, Shearer GM, Tacket CO. Exposure to human immunodeficiency virus (HIV) type I indicated by HIV-specific T helper cell responses before detection of infection by polymerase chain reaction and serum antibodies [corrected]. *J Infect Dis* 1991; 164:178-182.
422. Langlade-Demoyen P, Ngo-Giang-Huong N, Ferchal F, Oksenhendler E. Human immunodeficiency virus (HIV) nef-specific cytotoxic T lymphocytes in noninfected heterosexual contact of HIV-infected patients. *J Clin Invest* 1994; 93:1293-1297.
423. Mazzoli S, Trabattoni D, Lo CS, Piconi S, Ble C, Meacci F, Ruzzante S, Salvi A, Semplici F, Longhi R, Fusi ML, Tofani N, Biasin M, Villa ML, Mazzotta F, Clerici M. HIV-specific mucosal and cellular immunity in HIV-seronegative partners of HIV-seropositive individuals. *Nat Med* 1997; 3:1250-1257.
424. Bernard NF, Yannakis CM, Lee JS, Tsoukas CM. Human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T lymphocyte activity in HIV-exposed seronegative persons. *J Infect Dis* 1999; 179:538-547.

425. Goh WC, Markee J, Akridge RE, Meldorf M, Musey L, Karchmer T, Krone M, Collier A, Corey L, Emerman M, McElrath MJ. Protection against human immunodeficiency virus type 1 infection in persons with repeated exposure: evidence for T cell immunity in the absence of inherited CCR5 coreceptor defects. *J Infect Dis* 1999; 179:548-557.
426. Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Sninsky J, Ferrari G, Weinhold K, LINDQUIST C, Levy JA. Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:1030-1035.
427. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, Dong T, Gotch F, McAdam S, Whitby D, Sabally S, Gallimore A, Corrah T. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med* 1995; 1:59-64.
428. Plummer FA, Ball TB, Kimani J, Fowke KR. Resistance to HIV-1 infection among highly exposed sex workers in Nairobi: what mediates protection and why does it develop? *Immunol Lett* 1999; 66:27-34.
429. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, Simonsen JN, Anzala AO, Bwayo JJ, MacDonald KS, Ngugi EN, Plummer FA. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet* 1996; 348:1347-1351.
430. Barcellini W, Rizzardì GP, Velati C, Borghi MO, Fain C, Lazzarin A, Meroni PL. In vitro production of type 1 and type 2 cytokines by peripheral blood mononuclear cells from high-risk HIV-negative intravenous drug users. *AIDS* 1995; 9:691-694.
431. Clerici M, Levin JM, Kessler HA. HIV-specific T-helper activity in seronegative health care workers exposed to contaminated blood. *JAMA* 1994; 271:42-46.
432. Pinto LA, Sullivan J, Berzofsky JA, Clerici M, Kessler HA, Landay AL, Shearer GM. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV

seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J Clin Invest* 1995; 96:867-876.

433. De Maria A, Cirillo C, Moretta L. Occurrence of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytolytic T cell activity in apparently uninfected children born to HIV-1-infected mothers. *J Infect Dis* 1994; 170:1296-1299.

434. Rowland-Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, Gotch F, Ariyoshi K, Hallam N, Kroll JS, Froebel K, McMichael A. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* 1993; 341:860-861.

435. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 1: cellular and humoral immune responses. *Ann Intern Med* 2001; 134:761-776.

436. Hogan CM, Hammer SM. Host determinants in HIV infection and disease. Part 2: genetic factors and implications for antiretroviral therapeutics. *Ann Intern Med* 2001; 134:978-996.

437. Shin HD, Winkler C, Stephens JC, Bream J, Young H, Goedert JJ, O'Brien TR, Vlahov D, Buchbinder S, Giorgi J, Rinaldo C, Donfield S, Willoughby A, O'Brien SJ, Smith MW. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:14467-14472.

438. Norris PJ, Rosenberg ES. Cellular immune response to human immunodeficiency virus. *AIDS* 2001; 15 Suppl 2:S16-21.:S16-S21.

439. Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA. CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual. *J Clin Invest* 1991; 87:1462-1466.

440. Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Teran G, Sato A, Stranford SA, Fujimura SH, Christopherson C, Chang SY, Levy JA. Virological and

immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 1998; 92:3105-3114.

441. Gomez AM, Smaill FM, Rosenthal KL. Inhibition of HIV replication by CD8+ T cells correlates with CD4 counts and clinical stage of disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:68-75.

442. Ennen J, Findelee H, Dittmar MT, Norley S, Ernst M, Kurth R. CD8+ T lymphocytes of African green monkeys secrete an immunodeficiency virus-suppressing lymphokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:7207-7211.

443. Jeng CR, English RV, Childers T, Tompkins MB, Tompkins WA. Evidence for CD8+ antiviral activity in cats infected with feline immunodeficiency virus. *J Virol* 1996; 70:2474-2480.

444. Choi IS, Hokanson R, Collisson EW. Anti-feline immunodeficiency virus (FIV) soluble factor(s) produced from antigen-stimulated feline CD8(+) T lymphocytes suppresses FIV replication. *J Virol* 2000; 74:676-683.

445. Clerici M, Landay AL, Kessler HA, Phair JP, Venzon DJ, Hendrix CW, Lucey DRSGM. Reconstitution of long-term T helper cell function after zidovudine therapy in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1992; 166:723-730.

446. Clerici M, SEMINARI E, Suter F, Castelli F, Pan A, Biasin M, Colombo F, Trabattoni D, Maggiolo F, Carosi G, Maserati R. Different immunologic profiles characterize HIV infection in highly active antiretroviral therapy-treated and antiretroviral-naive patients with undetectable viremia. *AIDS* 2000; 14:109-116.

447. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, Arienti D, Zagliani A, Mwangi FM, Kariuki C, Ngugi EN, MacDonald KS, Ball TB, Clerici M, Plummer FA. HIV-



1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* 1999; 13:23-29.

448. Kuhn L, Coutoudis A, Moodley D, Trabattoni D, Mngqundaniso N, Shearer GM, Clerici M, Coovadia HM, Stein Z. T-helper cell responses to HIV envelope peptides in cord blood: protection against intrapartum and breast-feeding transmission. *AIDS* 2001; 15:1-9.

449. Loomis-Price LD, Cox JH, Mascola JR, VanCott TC, Michael NL, Fouts TR, Redfield RR, Robb ML, Wahren B, Sheppard HW, Birx DL. Correlation between humoral responses to human immunodeficiency virus type 1 envelope and disease progression in early-stage infection. *J Infect Dis* 1998; 178:1306-1316.

450. Dalgleish A, Sinclair A, Steel M, Beatson D, Ludlam C, Habeshaw J. Failure of ADCC to predict HIV-associated disease progression or outcome in a haemophilic cohort. *Clin Exp Immunol* 1990; 81:5-10.

451. Musey L, Hu Y, Eckert L, Christensen M, Karchmer T, McElrath MJ. HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women. *J Exp Med* 1997; 185:293-303.

452. Nielsen K, Boyer P, Dillon M, Wafer D, Wei LS, Garratty E, Dickover RE, Bryson YJ. Presence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 and HIV-1-specific antibodies in cervicovaginal secretions of infected mothers and in the gastric aspirates of their infants. *J Infect Dis* 1996; 173:1001-1004.

453. Moss PA, Rosenberg WM, Bell JI. The human T cell receptor in health and disease. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:71-96.:71-96.

454. Malhotra U, Spielman R, Concannon P. Variability in T cell receptor V beta gene usage in human peripheral blood lymphocytes. Studies of identical twins, siblings, and insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Immunol* 1992; 149:1802-1808.

455. Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Pergolizzi R, Bigler RD, Silver J. Influence of HLA genes on T cell receptor V segment frequencies and expression levels in peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150:2761-2773.
456. Moss PA, Rowland-Jones SL, Frodsham PM, McAdam S, Giangrande P, McMichael AJ, Bell JI. Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:5773-5777.
457. Manca F, Fenoglio D, Valle MT, Li PG, Kunkl A, Ferraris A, Saverino D, Lancia F, Mortara L, Lozzi L. Human CD4+ T cells can discriminate the molecular and structural context of T epitopes of HIV gp120 and HIV p66. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995; 9:227-237.
458. Manca F, Fenoglio D, Valle MT, Li PG, Kunkl A, Balderas RS, Baccala RG, Kono DH, Ferraris A, Saverino D. Human T helper cells specific for HIV reverse transcriptase: possible role in intrastructural help for HIV envelope-specific antibodies. *Eur J Immunol* 1995; 25:1217-1223.
459. Cossarizza A, Ortolani C, Mussini C, Borghi V, Guaraldi G, Mongiardo N, Bellesia E, Franceschini MG, De Rienzo B, Franceschi C. Massive activation of immune cells with an intact t cell repertoire in acute human immunodeficiency virus syndrome. *J Infect Dis* 1995; 172:105-112.
460. Cossarizza A, Ortolani C, Mussini C, Guaraldi G, Mongiardo N, Borghi V, Barbieri D, Bellesia E, Franceschini MG, De Rienzo B. Lack of selective V beta deletion in CD4+ or CD8+ T lymphocytes and functional integrity of T-cell repertoire during acute HIV syndrome. *AIDS* 1995; 9:547-553.
461. Kaslow RA, Carrington M, Apple R, Park L, Munoz A, Saah AJ, Goedert JJ, Winkler C, O'Brien SJ, Rinaldo C, Detels R, Blattner W, Phair J, Erlich H, Mann DL. Influence of combinations of human major

histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat Med* 1996; 2:405-411.

462. Keet IP, Tang J, Klein MR, LeBlanc S, Enger C, Rivers C, Apple RJ, Mann D, Goedert JJ, Miedema F, Kaslow RA. Consistent associations of HLA class I and II and transporter gene products with progression of human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men. *J Infect Dis* 1999; 180:299-309.

463. Itescu S, Rose S, Dwyer E, Winchester R. Certain HLA-DR5 and -DR6 major histocompatibility complex class II alleles are associated with a CD8 lymphocytic host response to human immunodeficiency virus type 1 characterized by low lymphocyte viral strain heterogeneity and slow disease progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:11472-11476.

464. Kroner BL, Goedert JJ, Blattner WA, Wilson SE, Carrington MN, Mann DL. Concordance of human leukocyte antigen haplotype-sharing, CD4 decline and AIDS in hemophilic siblings. *Multicenter Hemophilia Cohort and Hemophilia Growth and Development Studies. AIDS* 1995; 9:275-280.

465. Rowland-Jones S, Pinheiro S, Kaul R. New insights into host factors in HIV-1 pathogenesis. *Cell* 2001; 104:473-476.

466. O'Brien SJ, Nelson GW, Winkler CA, Smith MW. Polygenic and multifactorial disease gene association in man: Lessons from AIDS. *Annu Rev Genet* 2000; 34:563-591.:563-591.

467. Steel M. IVth international AIDS conference. *Lancet* 1988; 2:54-55.

468. Cameron PU, Mallal SA, French MA, Dawkins RL. Major histocompatibility complex genes influence the outcome of HIV infection. Ancestral haplotypes with C4 null alleles explain diverse HLA associations. *Hum Immunol* 1990; 29:282-295.

469. Kaplan C, Muller JY, Doinel C, Lefrere JJ, Paquez F, Rouger P, Salmon D, Salmon C. HLA-associated susceptibility to acquired immune deficiency syndrome in HIV-1-seropositive subjects. *Hum Hered* 1990; 40:290-298.
470. Kaslow RA, Duquesnoy R, VanRaden M, Kingsley L, Marrari M, Friedman H, Su S, Saah AJ, Detels R, Phair J. A1, Cw7, B8, DR3 HLA antigen combination associated with rapid decline of T-helper lymphocytes in HIV-1 infection. A report from the Multicenter AIDS Cohort Study. *Lancet* 1990; 335:927-930.
471. Itescu S, Rose S, Dwyer E, Winchester R. Grouping HLA-B locus serologic specificities according to shared structural motifs suggests that different peptide-anchoring pockets may have contrasting influences on the course of HIV-1 infection. *Hum Immunol* 1995; 42:81-89.
472. Itescu S, Mathur-Wagh U, Skovron ML, Brancato LJ, Marmor M, Zeleniuch-Jacquotte A, Winchester R. HLA-B35 is associated with accelerated progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:37-45.
473. Sahnoud T, Laurian Y, Gazengel C, Sultan Y, Gautreau C, Costagliola D. Progression to AIDS in French haemophiliacs: association with HLA-B35. *AIDS* 1993; 7:497-500.
474. Raffoux C, David V, Couderc LD, Rabian C, Clauvel JP, Seligmann M, Colombani J. HLA-A, B and DR antigen frequencies in patients with AIDS-related persistent generalized lymphadenopathy (PGL) and thrombocytopenia. *Tissue Antigens* 1987; 29:60-62.
475. Tomiyama H, Miwa K, Shiga H, Moore YI, Oka S, Iwamoto A, Kaneko Y, Takiguchi M. Evidence of presentation of multiple HIV-1 cytotoxic T lymphocyte epitopes by HLA-B\*3501 molecules that are associated with the accelerated progression of AIDS. *J Immunol* 1997; 158:5026-5034.

476. Klein MR, van der Burg SH, Hovenkamp E, Holwerda AM, Drijfhout JW, Melief CJ, Miedema F. Characterization of HLA-B57-restricted human immunodeficiency virus type 1 Gag- and RT-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Gen Virol* 1998; 79:2191-2201.
477. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgan B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S. Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* 1997; 3:212-217.
478. Goulder PJ, Bunce M, Krausa P, McIntyre K, Crowley S, Morgan B, Edwards A, Giangrande P, Phillips RE, McMichael AJ. Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:1691-1698.
479. Hendel H, Caillat-Zucman S, Lebuanec H, Carrington M, O'Brien S, Andrieu JM, Schachter F, Zagury D, Rappaport J, Winkler C, Nelson GW, Zagury JF. New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J Immunol* 1999; 162:6942-6946.
480. Tang J, Costello C, Keet IP, Rivers C, LeBlanc S, Karita E, Allen S, Kaslow RA. HLA class I homozygosity accelerates disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15:317-324.
481. Carrington M, Nelson GW, Martin MP, Kissner T, Vlahov D, Goedert JJ, Kaslow R, Buchbinder S, Hoots K, O'Brien SJ. HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B\*35-Cw\*04 disadvantage. *Science* 1999; 283:1748-1752.
482. Enlow RW, Nunez RA, LoGalbo P, Mildvan D, Mathur U, Winchester RJ. Increased frequency of HLA-DR5 in lymphadenopathy stage of AIDS. *Lancet* 1983; 2:51-52.

483. Kuntz BM, Bruster HT. Time-dependent variation of HLA-antigen-frequencies in HIV-1-infection (1983-1988). *Tissue Antigens* 1989; 34:164-169.
484. Louie LG, Newman B, King MC. Influence of host genotype on progression to AIDS among HIV-infected men. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4:814-818.
485. Mann DL, Garner RP, Dayhoff DE, Cao K, Fernandez-Vina MA, Davis C, Aronson N, Ruiz N, Birx DL, Michael NL. Major histocompatibility complex genotype is associated with disease progression and virus load levels in a cohort of human immunodeficiency virus type 1-infected Caucasians and African Americans. *J Infect Dis* 1998; 178:1799-1802.
486. Mann DL, Carrington M, O'Donnell M, Miller T, Goedert J. HLA phenotype is a factor in determining rate of disease progression and outcome in HIV-1-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8:1345-1346.
487. Westby M, Manca F, Dalgleish AG. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996; 17:120-126.
488. Oxenius A, Price DA, Dawson SJ, Tun T, Easterbrook PJ, Phillips RE, Sewell AK. Cross-staining of cytotoxic T lymphocyte populations with peptide-MHC class I multimers of natural HIV-1 variant antigens. *AIDS* 2001; 15:121-122.
489. Hill AV, Elvin J, Willis AC, Aidoo M, Allsopp CE, Gotch FM, Gao XM, Takiguchi M, Greenwood BM, Townsend AR. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature* 1992; 360:434-439.
490. Arthur LO, Bess JW, Jr., Sowder RC, Benveniste RE, Mann DL, Chermann JC, Henderson LE. Cellular proteins bound to immunodeficiency

viruses: implications for pathogenesis and vaccines. *Science* 1992; 258:1935-1938.

491. Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, Kuroda MJ, Fu TM, Wagner W, Biliska M, Craiu A, Zheng XX, Krivulka GR, Beaudry K, Lifton MA, Nickerson CE, Trigena WL, Punt K, Freed DC, Guan L, Dubey S, Casimiro D, Simon A, Davies ME, Chastain M, Strom TB, Gelman RS, Montefiori DC, Lewis MG. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 2000; 290:486-492.

492. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338:436-445.

493. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301-314.

494. Deuel TF, Keim PS, Farmer M, Heinrikson RL. Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:2256-2258.

495. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 1985; 315:672-676.

496. Oppenheim JJ, Matsushima K, Yoshimura T, Leonard EJ. The activities of cytokines are pleiotropic and interdependent. *Immunol Lett* 1987; 16:179-183.

497. Mukaida N, Shiroo M, Matsushima K. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 1989; 143:1366-1371.

498. Wolpe SD, Davatelis G, Sherry B, Beutler B, Hesse DG, Nguyen HT, Moldawer LL, Nathan CF, Lowry SF, Cerami A. Macrophages secrete a

novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* 1988; 167:570-581.

499. Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:617-648.

500. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol* 1994; 55:97-179.

501. Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:675-705.:675-705.

502. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392:565-568.

503. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997; 90:909-928.

504. Schall TJ, Bacon KB. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:865-873.

505. Horuk R. Molecular properties of the chemokine receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15:159-165.

506. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven- transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 1996; 272:872-877.

507. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 1996; 272:1955-1958.



508. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, Wu L, Mackay CR, LaRosa G, Newman W, Gerard N, Gerard C, Sodroski J. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996; 85:1135-1148.
509. Deng HK, Liu R, Ellmeier W. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 1996; 381:667-673.
510. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-127.
511. Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nat Med* 1996; 2[11], 1174-1178.
512. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:217-242.
513. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000; 95:3032-3043.
514. Wang JM, Deng X, Gong W, Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J Immunol Methods* 1998; 220:1-17.
515. Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; 19:568-574.
516. Sallusto F, Palermo B, Hoy A, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in directing traffic of naive, type 1 and type 2 T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 246:123-8.
517. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998; 187:129-134.

518. Cairns JS, D'Souza MP. Chemokines and HIV-1 second receptors: the therapeutic connection. *Nat Med* 1998; 4:563-568.
519. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Martinez A. Chemokine control of HIV-1 infection. *Nature* 1999; 400:723-724.
520. Amara A, Gall SL, Schwartz O, Salamero J, Montes M, Loetscher P, Baggiolini M, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. HIV coreceptor downregulation as antiviral principle: SDF-1alpha-dependent internalization of the chemokine receptor CXCR4 contributes to inhibition of HIV replication. *J Exp Med* 1997; 186:139-146.
521. Mack M, Luckow B, Nelson PJ, Cihak J, Simmons G, Clapham PR, Signoret N, Marsh M, Stangassinger M, Borlat F, Wells TN, Schlondorff D, Proudfoot AE. Aminooxypentane-RANTES induces CCR5 internalization but inhibits recycling: a novel inhibitory mechanism of HIV infectivity. *J Exp Med* 1998; 187:1215-1224.
522. Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Rousset D, Clark-Lewis I, Loetscher P, Moser B, Baggiolini M. HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature* 1996; 383:400.
523. Simmons G, Clapham PR, Picard L, Offord RE, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Buser R, Wells TNC, Proudfoot AEI. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science* 1997; 276:276-279.
524. Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, Klasse PJ, Tran T, Brass LF, Rosenkilde MM, Schwartz TW, Holmes W, Dallas W, Luther MA, Wells TN, Hoxie JA, Marsh M. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol* 1997; 139:651-664.
525. Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence

from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology* 1997; 234:340-348.

526. Vila-Coro AJ, Mellado M, Martin dA, Martinez A, Rodriguez-Frade JM. Characterization of RANTES- and aminooxypentane-RANTES-triggered desensitization signals reveals differences in recruitment of the G protein-coupled receptor complex. *J Immunol* 1999; 163:3037-3044.

527. Vila-Coro AJ, Mellado M, Martin dA, Lucas P, del Real G, Martinez A, Rodriguez-Frade JM. HIV-1 infection through the CCR5 receptor is blocked by receptor dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:3388-3393.

528. Paxton WA, Liu R, Kang S, Wu L, Gingeras TR, Landau NR, Mackay CR, Koup RA. Reduced HIV-1 infectability of CD4+ lymphocytes from exposed-uninfected individuals: association with low expression of CCR5 and high production of beta-chemokines. *Virology* 1998; 244:66-73.

529. Horuk R. The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria. *Immunol Today* 1994; 15:169-174.

530. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 1995; 377:435-438.

531. D'Souza MP, Harden VA. Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat Med* 1996; 2:1293-1300.

532. Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. G protein-coupled receptors in HIV and SIV entry: new perspectives on lentivirus-host interactions and on the utility of animal models. *Semin Immunol* 1998; 10:225-236.

533. Horuk R. Chemokine receptors and HIV-1: the fusion of two major research fields. *Immunol Today* 1999; 20:89-94.

534. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today* 2000; 21:418-420.
535. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:593-633.
536. Gerard C, Gerard NP. The pro-inflammatory seven-transmembrane segment receptors of the leukocyte. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:140-145.
537. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991; 67:1033-1036.
538. Homey B, Wang W, Soto H, Buchanan ME, Wiesenborn A, Catron D, Muller A, McClanahan TK, Dieu-Nosjean MC, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Oldham E, Zlotnik A. Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC). *J Immunol* 2000; 164:3465-3470.
539. Loetscher P, Seitz M, Baggiolini M, Moser B. Interleukin-2 regulates CC chemokine receptor expression and chemotactic responsiveness in T lymphocytes. *J Exp Med* 1996; 184:569-577.
540. Sica A, Sacconi A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med* 1997; 185:969-974.
541. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cell. *Science* 1997; 277:2005-2007.
542. Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, Gronenborn AM, Clore GM. High-resolution solution structure

of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science* 1994; 263:1762-1767.

543. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382:829-833.

544. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382:833-835.

545. Samson M, Labbe O, Mollereau C, Vassart G, Parmentier M. Molecular cloning and functional expression of a new human CC-chemokine receptor gene. *Biochemistry* 1996; 35:3362-3367.

546. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384:179-183.

547. Lapham CK, Ouyang J, Chandrasekhar B, Nguyen NY, Dimitrov DS, Golding H. Evidence for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 1996; 274:602-605.

548. Trkola A, Dragic T, Arthos J, Binley JM, Olson WC, Allaway GP, Cheng-Mayer C, Robinson J, Maddon PJ, Moore JP. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 1996; 384:184-187.

549. Boring L, Gosling J, Monteclaro FS, Lulis AJ, Tsou CL, Charo IF. Molecular cloning and functional expression of murine JE (monocyte chemoattractant protein 1) and murine macrophage inflammatory protein

1alpha receptors: evidence for two closely linked C-C chemokine receptors on chromosome 9. *J Biol Chem* 1996; 271:7551-7558.

550. Meyer A, Coyle AJ, Proudfoot AE, Wells TN, Power CA. Cloning and characterization of a novel murine macrophage inflammatory protein-1 alpha receptor. *J Biol Chem* 1996; 271:14445-14451.

551. Raport CJ, Gosling J, Schweickart VL, Gray PW, Charo IF. Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha. *J Biol Chem* 1996; 271:17161-17166.

552. Wu L, Paxton WA, Kassam N, Ruffing N, Rottman JB, Sullivan N, Choe H, Sodroski J, Newman W, Koup RA, Mackay CR. CCR5 levels and expression pattern correlate with infectability by macrophage-tropic HIV-1, in vitro. *J Exp Med* 1997; 185:1681-1691.

553. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86:367-377.

554. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals in bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382:722-725.

555. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, Neumann AU, Zhang L, He T, Kang S, Ceradini D, Jin Z, Yazdanbakhsh K, Kunstman K, Erickson D, Dragon E, Landau NR, Phair J, Ho DD, Koup RA. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996; 2:1240-1243.

556. Michael NL, Louie LG, Rohrbaugh AL, Schultz KA, Dayhoff DE, Wang CE, Sheppard HW. The role of CCR5 and CCR2 polymorphisms in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1997; 3:1160-1162.

557. Doranz BJ, Lu ZH, Rucker J, Zhang TY, Sharron M, Cen YH, Wang ZX, Guo HH, Du JG, Accavitti MA, Doms RW, Peiper SC. Two distinct CCR5 domains can mediate coreceptor usage by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1997; 71:6305-6314.
558. Edinger AL, Amedee A, Miller K, Doranz BJ, Endres M, Sharron M, Samson M, Lu ZH, Clements JE, Murphey-Corb M, Peiper SC, Parmentier M, Broder CC, Doms RW. Differential utilization of CCR5 by macrophage and T cell tropic simian immunodeficiency virus strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:4005-4010.
559. Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R. Impaired macrophage function and enhanced T cell-dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 1998; 160:4018-4025.
560. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1998; 273:4282-4287.
561. Vassiliadou N, Tucker L, Anderson DJ. Progesterone-induced inhibition of chemokine receptor expression on peripheral blood mononuclear cells correlates with reduced HIV-1 infectability in vitro. *J Immunol* 1999; 162:7510-7518.
562. BreLOT A, Heveker N, Pleskoff O, Sol N, Alizon M. Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *J Virol* 1997; 71:4744-4751.
563. Farzan M, Choe H, Martin KA, Sun Y, Sidelko M, Mackay CR, Gerard NP, Sodroski J, Gerard C. HIV-1 entry and macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ -mediated signaling are independent functions of the chemokine receptor CCR5. *J Biol Chem* 1997; 272:6854-6857.

564. Gosling J, Monteclaro FS, Atchison RE, Arai H, Tsou CL, Goldsmith MA, Charo IF. Molecular uncoupling of C-C chemokine receptor 5-induced chemotaxis and signal transduction from HIV-1 coreceptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:5061-5066.
565. Aramori I, Ferguson SS, Bieniasz PD, Zhang J, Cullen B, Cullen MG. Molecular mechanism of desensitization of the chemokine receptor CCR-5: receptor signaling and internalization are dissociable from its role as an HIV-1 co-receptor. *EMBO J* 1997; 16:4606-4616.
566. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382:635-638.
567. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development [see comments]. *Nature* 1998; 393:595-599.
568. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:1925-1930.
569. Stanley S, Ostrowski MA, Justement JS, Gantt K, Hedayati S, Mannix M, Roche K, Schwartzentruber DJ, Fox CH, Fauci AS. Effect of immunization with a common recall antigen on viral expression in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1996; 334:1222-1230.
570. STAPRANS SI, Hamilton BL, Follansbee SE. Activation of virus replication after vaccination of HIV 1- infected individuals. *J Exp Med* 1995; 182:1727-1737.



571. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990; 61:213-222.
572. Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J* 1990; 9:1551-1560.
573. Wang W, Soto H, Oldham ER, Buchanan ME, Homey B, Catron D, Jenkins N, Copeland NG, Gilbert DJ, Nguyen N, Abrams J, Kershenovich D, Smith K, McClanahan T, Vicari AP, Zlotnik A. Identification of a novel chemokine (CCL28), which binds CCR10 (GPR2). *J Biol Chem* 2000; 275:22313-22323.
574. Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, Bizzini B, Gringeri A, Santagostino E, Rappaport J, Feldman M, O'Brien SJ, Burny A, Gallo RC. C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3857-3861.
575. Garzino-Demo A, Devico AL, Cocchi F, Gallo RC. Beta-chemokines and protection from HIV type 1 disease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:S177-S184.
576. Garzino-Demo A, Moss RB, Margolick JB, Cleghorn F, Sill A, Blattner WA, Cocchi F, Carlo DJ, Devico AL, Gallo RC. Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta-chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:11986-11991.
577. Paxton WA, Martin SR, Tse D, O'Brien TR, Skurnick J, Vandevanter NL, Padiam N, Brain JF, Kotler D, Wolinsky SM, Koup RA. Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected multiple high risk sexual exposures. *Nature Medicine* 1996; 2:412-417.

578. Furci L, Scarlatti G, Burastero S, Tambussi G, Colognesi C, Quillent C, Longhi R, Loverro P, Borgonovo B, Gaffi D, Carrow E, Malnati M, Lusso P, Siccardi AG, Lazzarin A, Beretta A. Antigen-driven C-C chemokine-mediated HIV-1 suppression by CD4(+) T cells from exposed uninfected individuals expressing the wild-type CCR-5 allele. *J Exp Med* 1997; 186:455-460.

579. Furci L, Polo S, Lusso P. CD8+ T lymphocyte-derived chemokines and other HIV-suppressive factors: mini-review. *J Chemother* 1998; 10:146-149.

580. Wasik TJ, Bratosiewicz J, Wierzbicki A, Whiteman VE, Rutstein RR, Starr SE, Douglas SD, Kaufman D, Sison AV, Polansky M, Lischner HW, Kozbor D. Protective role of beta-chemokines associated with HIV-specific Th responses against perinatal HIV transmission. *J Immunol* 1999; 162:4355-4364.

581. Saha K, Volsky DJ. Are beta-chemokines innocent bystanders in HIV type 1 disease progression? *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:1-2.

582. Saha K, Bentsman G, Chess L, Volsky DJ. Endogenous production of beta-chemokines by CD4+, but not CD8+, T-cell clones correlates with the clinical state of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals and may be responsible for blocking infection with non-syncytium-inducing HIV-1 in vitro. *J Virol* 1998; 72:876-881.

583. Scala E, D'Offizi G, Rosso R, Turriziani O, Ferrara R, Mazzone AM, Antonelli G, Aiuti F, Paganelli R. C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J Immunol* 1997; 158:4485-4492.

584. Ullum H, Cozzi LA, Victor J, Aladdin H, Phillips AN, Gerstoff J, Skinhoj P, Pedersen BK. Production of beta-chemokines in human immunodeficiency virus (HIV) infection: evidence that high levels of

macrophage inflammatory protein-1beta are associated with a decreased risk of HIV disease progression. *J Infect Dis* 1998; 177:331-336.

585. Fransen S, Copeland KF, Smieja M, Smaill F, Rosenthal KL. RANTES production by T cells and CD8-mediated inhibition of human immunodeficiency virus gene expression before initiation of potent antiretroviral therapy predict sustained suppression of viral replication. *J Infect Dis* 2000; 181:505-512.

586. Ferbas J, Giorgi JV, Amini S, Grovit-Ferbas K, Wiley DJ, Detels R, Plaeger S. Antigen-specific production of RANTES, macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, and MIP-1beta in vitro is a correlate of reduced human immunodeficiency virus burden in vivo. *J Infect Dis* 2000; 182:1247-1250.

587. Lehner T, Wang Y, Cranage M, Bergmeier LA, Mitchell E, Tao L, Hall G, Dennis M, Cook N, Brookes R, Klavinskis L, Jones I, Doyle C, Ward R. Protective mucosal immunity elicited by targeted iliac lymph node immunization with a subunit SIV envelope and core vaccine in macaques. *Nat Med* 1996; 2:767-775.

588. Lehner T, Wang Y, Cranage M, Tao L, Mitchell E, Bravery C, Doyle C, Pratt K, Hall G, Dennis M, Villinger L, Bergmeier L. Up-regulation of beta-chemokines and down-modulation of CCR5 co-receptors inhibit simian immunodeficiency virus transmission in non-human primates. *Immunology* 2000; 99:569-577.

589. Wang Y, Tao L, Mitchell E, Bogers WM, Doyle C, Bravery CA, Bergmeier LA, Kelly CG, Heeney JL, Lehner T. Generation of CD8 suppressor factor and beta chemokines, induced by xenogeneic immunization, in the prevention of simian immunodeficiency virus infection in macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:5223-5228.

590. Heeney JL, Teeuwesen VJ, van Gils M, Bogers WM, De Giuli MC, Radaelli A, Barnett S, Morein B, Akerblom L, Wang Y, Lehner T, Davis D. beta-chemokines and neutralizing antibody titers correlate with sterilizing immunity generated in HIV-1 vaccinated macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:10803-10808.
591. Aleman S, Pehrson P, Sonnerborg A. Kinetics of beta-chemokine levels during anti-HIV therapy. *Antivir Ther* 1999; 4:109-115.
592. Ahmed RK, Nilsson C, Wang Y, Lehner T, Biberfeld G, Thorstensson R. Beta-chemokine production in macaques vaccinated with live attenuated virus correlates with protection against simian immunodeficiency virus (SIVsm) challenge. *J Gen Virol* 1999; 80:1569-1574.
593. Bisset LR, Rothen M, Joller-Jemelka HI, Dubs RW, Grob PJ, Opravil M. Change in circulating levels of the chemokines macrophage inflammatory proteins 1 alpha and 11 beta, RANTES, monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-16 following treatment of severely immunodeficient HIV-infected individuals with indinavir. *AIDS* 1997; 11:485-491.
594. Paxton WA, Neumann AU, Kang S, Deutch L, Brown RC, Koup RA, Wolinsky SM. RANTES production from CD4+ lymphocytes correlates with host genotype and rates of human immunodeficiency virus type 1 disease progression. *J Infect Dis* 2001; 183:1678-1681.
595. Polo S, Veglia F, Malnati MS, Gobbi C, Farci P, Raiteri R, Sinicco A, Lusso P. Longitudinal analysis of serum chemokine levels in the course of HIV-1 infection. *AIDS* 1999; 13:447-454.
596. Gordon CJ, Muesing MA, Proudfoot AE, Power CA, Moore JP, Trkola A. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection by the CC-chemokine RANTES is independent of the mechanism of virus-cell fusion. *J Virol* 1999; 73:684-694.

597. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J* 1997; 16:6996-7007.
598. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* 1998; 279:381-384.
599. Fauci AS. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* 1996; 384:529-534.
600. Hesselgesser J, Liang M, Hoxie J, Greenberg M, Brass LF, Orsini MJ, Taub D, Horuk R. Identification and characterization of the CXCR4 chemokine receptor in human T cell lines: ligand binding, biological activity, and HIV-1 infectivity. *J Immunol* 1998; 160:877-883.
601. O'Brien SJ, Moore JP. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol Rev* 2000; 177:99-111.
602. Zimmerman PA, Buckler-White A, Alkhatib G, Spalding T, Kubofcik J, Combadiere C, Weissman D, Cohen O, Rubbert A, Lam G, Vaccarezza M, Kennedy PE, Kumaraswami V, Giorgi JV, Detels R, Hunter J, Chopek M, Berger EA, Fauci AS, Nutman TB, Murphy PM. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in CC chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol Med* 1997; 3:23-36.
603. Benkirane M, Jin DY, Chun RF, Koup RA, Jeang KT. Mechanism of transdominant inhibition of CCR5-mediated HIV-1 infection by *ccr5delta32*. *J Biol Chem* 1997; 272:30603-30606.

604. Moore JP. Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 1997; 276:51-52.
605. Michael NL, Moore JP. Viral phenotype and CCR5 genotype. *Nat Med* 1999; 5:1330.
606. Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med* 1997; 3:252-253.
607. Balotta C, Bagnarelli P, Violin M, Ridolfo AL, Zhou D, Berlusconi A, Corvasce S, Corbellino M, Clementi M, Clerici M, Moroni M, Galli M. Homozygous delta 32 deletion of the CCR-5 chemokine receptor gene in an HIV-1-infected patient. *AIDS* 1997; 11:F67-F71.
608. Theodorou I, Meyer L, Magierowska M, Katlama C, Rouzioux C. HIV-1 infection in an individual homozygous for CCR5 delta 32. Seroco Study Group. *Lancet* 1997; 349:1219-1220.
609. Hoffman TL, MacGregor RR, Burger H, Mick R, Doms RW, Collman RG. CCR5 genotypes in sexually active couples discordant for human immunodeficiency virus type 1 infection status. *J Infect Dis* 1997; 176:1093-1096.
610. Malo A, Rommel F, Bogner J, Gruber R, Schramm W, Goebel FD, Riethmuller G, Wank R. Lack of protection from HIV infection by the mutant HIV coreceptor CCR5 in intravenously HIV infected hemophilia patients. *Immunobiology* 1998; 198:485-488.
611. Mangano A, Prada F, Roldan A, Picchio G, Bologna R, Sen L. Distribution of CCR-5 delta32 allele in Argentinian children at risk of HIV-1 infection: its role in vertical transmission. *AIDS* 1998; 12:109-110.
612. Smith MW, Dean M, Carrington M, Huttley GA, O'Brien SJ. CCR5-delta 32 gene deletion in HIV-1 infected patients. *Lancet* 1997; 350:741.

613. Martin MP, Dean M, Smith MW, Winkler C, Gerrard B, Michael NL, Lee B, Doms RW, Margolick J, Buchbinder S, Goedert JJ, O'Brien TR, Hilgartner MW, Vlahov D, O'Brien SJ, Carrington M. Genetic acceleration of AIDS progression by a promoter variant of CCR5. *Science* 1998; 282:1907-1911.
614. Roda Husman AM, Koot M, Cornelissen M, Keet IP, Brouwer M, Broersen SM, Bakker M, Roos MT, Prins M, de Wolf F, Coutinho RA, Miedema F, Goudsmit J, Schuitemaker H. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 127:882-890.
615. Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, Theodorou I, van Rij R, Prins M, Roda Husman AM, Coutinho R, Schuitemaker H. CC-chemokine receptor variants, SDF-1 polymorphism, and disease progression in 720 HIV-infected patients. SEROCO Cohort. Amsterdam Cohort Studies on AIDS. *AIDS* 1999; 13:624-626.
616. Ioannidis JP, O'Brien TR, Rosenberg PS, Contopoulos-Ioannidis DG, Goedert JJ. Genetic effects on HIV disease progression. *Nat Med* 1998; 4:536.
617. Garred P, Eugen-Olsen J, Iversen AK, Benfield TL, Svejgaard A, Hofmann B. Dual effect of CCR5 delta 32 gene deletion in HIV-1-infected patients. Copenhagen AIDS Study Group. *Lancet* 1997; 349:1884.
618. Carrington M, Kissner T, Gerrard B, Ivanov S, O'Brien SJ, Dean M. Novel alleles of the chemokine-receptor gene CCR5. *Am J Hum Genet* 1997; 61:1261-1267.
619. Quillent C, Oberlin E, Braun J, Rousset D, Gonzalez-Canali G, Metais P, Montagnier L, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Beretta A. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998; 351:14-18.

620. Garred P. Chemokine-receptor polymorphisms: clarity or confusion for HIV-1 prognosis? *Lancet* 1998; 351:2-3.

621. Mummidi S, Ahuja SS, McDaniel BL, Ahuja SK. The human CC chemokine receptor 5 (CCR5) gene. Multiple transcripts with 5'-end heterogeneity, dual promoter usage, and evidence for polymorphisms within the regulatory regions and noncoding exons. *J Biol Chem* 1997; 272:30662-30671.

622. An P, Martin MP, Nelson GW, Carrington M, Smith MW, Gong K, Vlahov D, O'Brien SJ, Winkler CA. Influence of CCR5 promoter haplotypes on AIDS progression in African-Americans. *AIDS* 2000; 14:2117-2122.

623. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS). *Lancet* 1998; 352:866-870.

624. Kostrikis LG, Neumann AU, Thomson B, Korber BT, McHardy P, Karanickolas R, Deutsch L, Huang Y, Lew JF, McIntosh K, Pollack H, Borkowsky W, Spiegel HM, Palumbo P, Oleske J, Bardeguez A, Luzuriaga K, Sullivan J, Wolinsky SM, Koup RA, Ho DD, Moore JP. A polymorphism in the regulatory region of the CC-chemokine receptor 5 gene influences perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 to African-American infants. *J Virol* 1999; 73:10264-10271.

625. Adje CA, Bile CE, Kestens L, Koblavi-Deme S, Ghys PD, Maurice C, Kalou-Badirou M, Kabran N, Ekpini RE, Roels TH, Wiktor SZ, Nkengasong JN. Lack of effect of chemokine receptor CCR2b gene polymorphism (64I) on HIV-1 plasma RNA viral load and immune activation among HIV-1 seropositive female workers in Abidjan, Cote d'Ivoire. *J Med Virol* 2001; 64:398-401.



626. Anzala AO, Ball TB, Rostron T, O'Brien SJ, Plummer FA, Rowland-Jones SL. CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research. *Lancet* 1998; 351:1632-1633.
627. Kostrikis LG, Huang Y, Moore JP, Wolinsky SM, Zhang L, Guo Y, Deutsch L, Phair J, Neumann AU, Ho DD. A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation. *Nat Med* 1998; 4:350-353.
628. Rizzardì GP, Morawetz RA, Vicenzi E, Ghezzi S, Poli G, Lazzarin A, Pantaleo G. CCR2 polymorphism and HIV disease. Swiss HIV Cohort. *Nat Med* 1998; 4:252-253.
629. Hendel H, Henon N, Lebuanec H, Lachgar A, Poncelet H, Caillat-Zucman S, Winkler CA, Smith MW, Kenefic L, O'Brien S, Lu W, Andrieu JM, Zagury D, Schachter F, Rappaport J, Zagury JF. Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 19:381-386.
630. Mariani R, Wong S, Mulder LC, Wilkinson DA, Reinhart AL, LaRosa G, Nibbs R, O'Brien TR, Michael NL, Connor RI, Macdonald M, Busch M, Koup RA, Landau NR. CCR2-64I polymorphism is not associated with altered CCR5 expression or coreceptor function. *J Virol* 1999; 73:2450-2459.
631. Lee B, Doranz BJ, Rana S, Yi Y, Mellado M, Frade JM, Martinez A, O'Brien SJ, Dean M, Collman RG, Doms RW. Influence of the CCR2-V64I polymorphism on human immunodeficiency virus type 1 coreceptor activity and on chemokine receptor function of CCR2b, CCR3, CCR5, and CXCR4. *J Virol* 1998; 72:7450-7458.
632. Eugen-Olsen J, Iversen AK, Benfield TL, Koppelhus U, Garred P. Chemokine receptor CCR2b 64I polymorphism and its relation to CD4 T-

cell counts and disease progression in a Danish cohort of HIV-infected individuals. Copenhagen AIDS cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 18:110-116.

633. Schinkel J, Langendam MW, Coutinho RA, Krol A, Brouwer M, Schuitemaker H. No evidence for an effect of the CCR5 delta32/+ and CCR2b 64I/+ mutations on human immunodeficiency virus (HIV)-1 disease progression among HIV-1-infected injecting drug users. *J Infect Dis* 1999; 179:825-831.

634. van Rij RP, Broersen S, Goudsmit J, Coutinho RA, Schuitemaker H. The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection. *AIDS* 1998; 12:F85-F90.

635. Magierowska M, Theodorou I, Debre P, Sanson F, Autran B, Riviere Y, Charron D, Costagliola D. Combined genotypes of CCR5, CCR2, SDF1, and HLA genes can predict the long-term nonprogressor status in human immunodeficiency virus-1-infected individuals. *Blood* 1999; 93:936-941.

636. Brambilla A, Villa C, Rizzardì G, Veglia F, Ghezzi S, Lazzarin A, Cusini M, Muratori S, Santagostino E, Gringeri A, Louie LG, Sheppard HW, Poli G, Michael NL, Pantaleo G, Vicenzi E. Shorter survival of SDF1-3'A/3'A homozygotes linked to CD4+ T cell decrease in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2000; 182:311-315.

637. McDermott DH, Beecroft MJ, Kleeberger CA, Al Sharif FM, Ollier WE, Zimmerman PA, Boatman BA, Leitman SF, Detels R, Hajeer AH, Murphy PM. Chemokine RANTES promoter polymorphism affects risk of both HIV infection and disease progression in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 2000; 14:2671-2678.

638. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 1997; 16:100-103.

639. Stephens JC, Reich DE, Goldstein DB, Shin HD, Smith MW, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Allikmets R, Schriml L, Gerrard B, Malasky M, Ramos MD, Morlot S, Tzetis M, Oddoux C, di Giovine FS, Nasioulas G, Chandler D, Aseev M, Hanson M, Kalaydjieva L, Glavac D, Gasparini P, Dean M. Dating the origin of the CCR5-Delta32 AIDS-resistance allele by the coalescence of haplotypes. *Am J Hum Genet* 1998; 62:1507-1515.
640. Martinson JJ, Hong L, Karanickolas R, Moore JP, Kostrikis LG. Global distribution of the CCR2-64I/CCR5-59653T HIV-1 disease-protective haplotype. *AIDS* 2000; 14:483-489.
641. Goedert JJ, Eyster ME, Biggar RJ, Blattner WA. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus: association with severe depletion of T-helper lymphocytes in men with hemophilia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1987; 3:355-361.
642. Luscher MA, Choy G, Njagi E, Bwayo JJ, Anzala AO, Ndinya-Achola JO, Ball TB, Wade JA, Plummer FA, Barber BH, MacDonald KS. Naturally occurring IgG anti-HLA alloantibody does not correlate with HIV type 1 resistance in Nairobi prostitutes. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:109-115.
643. Kroner BL, Rosenberg PS, Aledort LM, Alvord WG, Goedert JJ. HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978-1990. Multicenter Hemophilia Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1994; 7:279-286.
644. Clerici M, Giorgi JV, Chou CC, Gudeman VK, Zack JA, Gupta P, Ho HN, Nishanian PG, Berzofsky JA, Shearer GM. Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1. *J Infect Dis* 1992; 165:1012-1019.

645. Liu SL, Schacker T, Musey L, Shriner D, McElrath MJ, Corey L, Mullins JI. Divergent patterns of progression to AIDS after infection from the same source: human immunodeficiency virus type 1 evolution and antiviral responses. *J Virol* 1997; 71:4284-4295.
646. Sheppard HW, Ascher MS, McRae B, Anderson RE, Lang W, Allain JP. The initial immune response to HIV and immune system activation determine the outcome of HIV disease. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1991; 4:704-712.
647. Learmont J, Tindall B, Evans L, et al. Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donors. *Lancet* 1992; 340:863-867.
648. Phair J, Jacobson L, Detels R, Rinaldo C, Saah A, Schragger L, Munoz A. Acquired immune deficiency syndrome occurring within 5 years of infection with human immunodeficiency virus type-1: the Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:490-496.
649. Simmons G, Wilkinson D, Reeves JD, Dittmar MT, Beddows S, Weber J, Carnegie G, Desselberger U, Gray PW, Weiss RA, Clapham PR. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virol* 1996; 70:8355-8360.
650. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp 120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing antibody. *Nature* 1998; 393:648-659.
651. Tersmette M, De Goede RE, Al BJ, Winkel IN, Gruters RA, Cuypers HT, Huisman HG, Miedema F. Differential syncytium-inducing capacity of human immunodeficiency virus isolates: frequent detection of syncytium-inducing isolates in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J Virol* 1988; 62:2026-2032.

652. Koot M, Keet IPM, Vos AHV, de GREY, Roos MTL, Coutinho RA, Miedema F. Prognostic value of HIV-1 syncytium- inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993; 118:681-688.
653. Tersmette M, Lange JM, De Goede RE, de Wolf F, Eeftink-Schattenkerk JK, Schellekens PT, Coutinho RA, Huisman JG, Goudsmit J, Miedema F. Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989; 1:983-985.
654. Richman DD. Zidovudine resistance of human immunodeficiency virus. *Rev Infect Dis* 1990;-70.
655. Zagury D, Lachgar A, Chams V, Fall LS, Bernard J, Zagury JF, Bizzini B, Gringeri A, Santagostino E, Rappaport J, Feldman M, Burny A, Gallo RC. Interferon alpha and Tat involvement in the immunosuppression of uninfected T cells and C-C chemokine decline in AIDS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:3851-3856.
656. Conlon K, Lloyd A, Chattopadhyay U, Lukacs N, Kunkel S, Schall T, Taub D, Morimoto C, Osborne J, Oppenheim J. CD8+ and CD45RA+ human peripheral blood lymphocytes are potent sources of macrophage inflammatory protein 1 alpha, interleukin-8 and RANTES. *Eur J Immunol* 1995; 25:751-756.
657. Zanussi S, D'Andrea M, Simonelli C, Tirelli U, De Paoli P. Serum levels of RANTES and MIP-1 alpha in HIV-positive long-term survivors and progressor patients. *AIDS* 1996; 10:1431-1432.
658. McKenzie SW, Dallalio G, North M, Frame P, Means RT, Jr. Serum chemokine levels in patients with non-progressing HIV infection. *AIDS* 1996; 10:F29-F33.

659. Weiss L, Si-Mohamed A, Giral P, Castiel P, Ledur A, Blondin C, Kazatchkine MD, Haeffner-Cavaillon N. Plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 but not those of macrophage inhibitory protein-1alpha and RANTES correlate with virus load in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1997; 176:1621-1624.
660. Cocchi F, Devico AL, Yarchoan R, Redfield R, Cleghorn F, Blattner WA, Garzino-Demo A, Colombini-Hatch S, Margolis D, Gallo RC. Higher macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta levels from CD8+ T cells are associated with asymptomatic HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13812-13817.
661. Clerici M, Balotta C, Trabattoni D, Papagno L, Ruzzante S, Rusconi S, Fusi ML, Colombo MC, Galli M. Chemokine production in HIV-seropositive long-term asymptomatic individuals. *AIDS* 1996; 10:1432-1433.
662. Vicenzi E, Bagnarelli P, Santagostino E, Ghezzi S, Alfano M, Sinnone MS, Fabio G, Turchetto L, Moretti G, Lazzarin A, Mantovani A, Mannucci PM, Clementi M, Gringeri A, Poli G. Hemophilia and nonprogressing human immunodeficiency virus type 1 infection. *Blood* 1997; 89:191-200.
663. Mackewicz CE, Barker E, Greco G, Reyes-Teran G, Levy JA. Do beta-chemokines have clinical relevance in HIV infection? *J Clin Invest* 1997; 100:921-930.
664. Kreuzer KA, Rockstroh JK, Kupfer B, Spengler U. Endogenous levels of C-C chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES do not reflect the disease course in HIV-seropositive individuals. *Int J Clin Lab Res* 2000; 30:163-168.
665. Fowke KR, Dong T, Rowland-Jones SL, Oyugi J, Rutherford WJ, Kimani J, Krausa P, Bwayo J, Simonsen JN, Shearer GM, Plummer FA. HIV type 1 resistance in Kenyan sex workers is not associated with altered

cellular susceptibility to HIV type 1 infection or enhanced beta-chemokine production. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14:1521-1530.

666. Barretina J, Blanco J, Gutierrez A, Puig L, Altisent C, Espanol T, Caragol I, Clotet B, Este JA. Evaluation of the putative role of C-C chemokines as protective factors of HIV-1 infection in seronegative hemophiliacs exposed to contaminated hemoderivatives. *Transfusion* 2000; 40:461-467.

667. Krowka JF, Gesner ML, Ascher MS, Sheppard HW. Lack of associations of chemotactic cytokines with viral burden, disease progression, or lymphocyte subsets in HIV-infected individuals. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 85:21-27.

668. Muller P, Engelstadter M, Werner A, Braner J, Staszewski S, Miller V, Doerr HW, Kurth R, Cichutek K. Increased serum and mRNA levels of RANTES associated with elevated levels of activated CD8+CD38+ T cells in HIV-1 infected individuals. *Intervirology* 1997; 40:263-270.

669. Kakkanaiiah VN, Ojo-Amaize EA, Peter JB. Concentrations of circulating beta-chemokines do not correlate with viral load in human immunodeficiency virus-infected individuals. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 5:499-502.

670. Bubel S, Wilhelm D, Entelmann M, Kirchner H, Kluter H. Chemokines in stored platelet concentrates. *Transfusion* 1996; 36:445-449.

671. Klinger MH, Wilhelm D, Bubel S, Sticherling M, Schroder JM, Kuhnel W. Immunocytochemical localization of the chemokines RANTES and MIP-1 alpha within human platelets and their release during storage. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 107:541-546.

672. Kameyoshi Y, Dorschner A, Mallet AI, Christophers E, Schroder JM. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J Exp Med* 1992; 176:587-592.

673. Malnati MS, Tambussi G, Clerici E, Polo S, Algeri M, Nardese V, Furci L, Lazzarin A, Lusso P. Increased plasma levels of the C-C chemokine RANTES in patients with primary HIV-1 infection. *J Biol Regul Homeost Agents* 1997; 11:40-42.
674. Malnati MS, Tambussi G, Fischetti L, Algeri M, Veglia F, Capiluppi B, Lazzarin A, Lusso P. Analysis of serum and plasma beta chemokines in primary HIV infection (PHI). *J Biol Regul Homeost Agents* 2000; 14:75-78.
675. Carter LM, Peters BS, Ellis BA, Wolstencroft RA. Highly active antiretroviral therapy normalizes the potential for MIP-1alpha production in HIV infection. *J Infect* 2000; 41:252-255.
676. Fauci AS. Resistance to HIV-1 infection: it's in the genes. *Nat Med* 1996; 2:966-967.
677. Hughes WT, Kennedy W, Dugdale M. Prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients with weekly dapsone. *Lancet* 1990; 336:1066-1066.
678. Paxton WA, Kang S, Koup RA. The HIV type 1 coreceptor CCR5 and its role in viral transmission and disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998; 14 Suppl 1:S89-92.:S89-S92.
679. Marmor M, Sheppard HW, Donnell D, Bozeman S, Celum C, Buchbinder S, Koblin B, Seage GR, III. Homozygous and heterozygous CCR5-Delta32 genotypes are associated with resistance to HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 27:472-481.
680. Salkowitz JR, Purvis SF, Meyerson H, Zimmerman P, O'Brien TR, Aledort L, Eyster ME, Hilgartner M, Kessler C, Konkle BA, White GC, Goedert JJ, Lederman MM. Characterization of high-risk HIV-1 seronegative hemophiliacs. *Clin Immunol* 2001; 98:200-211.



681. Husman AMR, Koot M, Cornelissen M, Keet IPM, Brouwer M, Broersen SM, et al. Association between CCR5 genotype and the clinical course of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997; 127:882-890.
682. Meyer L, Magierowska M, Hubert JB, Rouzioux C, Deveau C, Sanson F, Debre P, Delfraissy JF, Theodorou I. Early protective effect of CCR-5 delta 32 heterozygosity on HIV-1 disease progression: relationship with viral load. The SEROCO Study Group. *AIDS* 1997; 11:F73-F78.
683. Stewart GJ, Ashton LJ, Biti RA, Ffrench RA, Bennetts BH, Newcombe NR, Benson EM, Carr A, Cooper DA, Kaldor JM. Increased frequency of CCR-5 delta 32 heterozygotes among long-term non-progressors with HIV-1 infection. The Australian Long-Term Non-Progressor Study Group. *AIDS* 1997; 11:1833-1838.
684. Reynes J, Portales P, Segondy M, Baillat V, Andre P, Avinens O, Picot MC, Clot J, Eliaou JF, Corbeau P. CD4 T cell surface CCR5 density as a host factor in HIV-1 disease progression. *AIDS* 2001; 15:1627-1634.
685. Signoret N, Rosenkilde MM, Klasse PJ, Schwartz TW, Malim MH, Hoxie JA, Marsh M. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J Cell Sci* 1998; 111:2819-2830.
686. Dezzutti CS, Guenthner PC, Green TA, Cohen OJ, Spira TJ, Lal RB. Stromal-derived factor-1 chemokine gene variant is associated with the delay of HIV-1 disease progression in two longitudinal cohorts. *AIDS* 2000; 14:894-896.
687. Ikegawa M, Yuan J, Matsumoto K, Herrmann S, Iwamoto A, Nakamura T, Matsushita S, Kimura T, Honjo T, Tashiro K. Elevated plasma stromal cell-derived factor 1 protein level in the progression of HIV type 1 infection/AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001; 17:587-595.

688. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995; 28:495-500.
689. Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, Kunstman KJ, Stanton JL, Macken CA, Perelson AS, Wolinsky SM. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy [see comments]. *N Engl J Med* 1999; 340:1614-1622.
690. Center DM, Kornfeld H, Cruikshank WW. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. *Immunol Today* 1996; 17:476-481.
691. Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DT, Cruikshank WW, Kornfeld H, Center DM, Weller PF. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol* 1996; 156:2566-2570.
692. Shieh B, Yan YP, Ko NY, Liao YE, Liu YC, Lin HH, Chen PP, Li C. Detection of elevated serum beta-chemokine levels in seronegative Chinese individuals exposed to human immunodeficiency virus type 1. *Clin Infect Dis* 2001; 33:273-279.