
***FACTORES DEL HUÉSPED QUE AFECTAN A LA
PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL
VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA
DE TIPO 1 (VIH-1)***

Tesis Doctoral presentada para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Barcelona
Diciembre, 2004

Anuska Llano Montero

El Dr. José A. Esté, Investigador Senior en el Laboratorio de Retrovirología de la
Fundación IrsiCaixa

Certifica:

Que la tesis titulada Factores del huésped que afectan a la progresión de la infección por el virus de la Inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), ha sido realizada por Anuska Llano Montero bajo su dirección y considera que es apta para ser presentada y para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Badalona, 10 de Diciembre de 2004

Dr. José A. Esté

La Dra. Paz Martínez, profesora del Departamento de Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona,

Certifica:

Que la tesis titulada Factores del huésped que afectan a la progresión de la infección por el virus de la Inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1), ha sido realizada por Anuska Llano Montero bajo su tutoría y considera que es apta para ser presentada y para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Bellaterra, 10 de Diciembre de 2004

Dra. Paz Martínez

Agradecimientos

Gracias a la Fundación Irsicaixa y al Doc. José A. Esté por darme la oportunidad de conocer de cerca el mundo de la ciencia.

La realización de esta tesis también ha sido posible gracias a la beca concedida por el Fondo de Investigación Sanitaria.

Gracias a Arantxa y a Jordi por su ayuda en el laboratorio y por hacerme un poco más fácil los primeros pasos.

Gracias al resto de los compañeros de laboratorio que, de una manera u otra, también han aportado su granito de arena en la realización de esta tesis.

Y por supuesto, gracias a todos los que en la distancia siempre me han acompañado.

A mis padres

A Urko

A Carlos

PUBLICACIONES

STROMAL-CELL-DERIVED FACTOR 1 PREVENTS THE EMERGENCE OF THE SYNCYTIUM-INDUCING PHENOTYPE OF HIV-1 IN VIVO.

Llano A, Barretina J, Blanco J, Gutiérrez A, Clotet B and Esté JA.

AIDS, 15 (14): 1890-1892, 2001.

INTERLEUKIN-7 IN PLASMA CORRELATES WITH CD4 T-CELL DEPLETION AND MAY BE ASSOCIATED WITH EMERGENCE OF SYNCYTIUM-INDUCING VARIANTS IN HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1-POSITIVE INDIVIDUALS.

Llano A, Barretina J, Gutiérrez A, Blanco J, Cabrera C Clotet B and Esté JA. Esté.

Journal of Virology, 75 (21): 10319–10325, 2001.

INTERLEUKIN-7-DEPENDENT PRODUCTION OF RANTES THAT CORRELATES WITH HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS DISEASE PROGRESSSION.

Llano A, Barretina J, Gutiérrez A, Clotet B and Esté JA.

Journal of Virology, 77 (7): 4389-4395, 2003.

CXCR4 AND SDF-1 EXPRESSION IN B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AND STAGE OF THE DISEASE.

Barretina J, Junca J, **Llano A**, Gutierrez A, Flores A, Blanco J, Clotet B, Este JA.

Ann Hematol. Aug;82(8):500-5, 2003.

IMMUNOLOGICAL AND VIROLOGICAL STUDY OF ENFUVIRTIDE-TREATED HIV-POSITIVE PATIENTS.

Barretina J, Blanco J, Bonjoch A, **Llano A**, Clotet B, Este JA.

AIDS, Aug 20;18(12):1673-82, 2004.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleótido

CAF: *CD8 T cell antiviral factor*

CDC: *Centres for Disease Control*

CV: Carga viral

CTL: Cytotoxic T-cell lymphocytes

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

Env gp: *Envelope glycoproteins* (glicoproteínas de la envuelta)

FDA: *Food and Drug Administration*

GM-CSF: *Granulocyte macrophage-colony stimulating factor*

HLA: *Human leucocytes antigen* (Antígeno de leucocitos humanos)

HAART: *Highly active antiretroviral therapy* (Terapia antiretroviral altamente activa)

IL: Interleuquina

IL-7R α : cadena *alpha* del receptor IL-7

IN: integrasa

IFN- γ : Interferón *gamma*

KD: Kilodalton

LGP: Linfadenopatías generalizadas persistentes

LTNPs: *Long-Term nonprogressors*

LTR: *Long terminal repeats* (Repeticiónesternales largas)

MIP-1 α : *Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha*

MIP-1 β : *Macrophage Inflammatory Protein 1 beta*

M-trópicos: macrofagotrópicos

NC-IUPHAR: *Nomenclature Committee of International Union of Pharmacology*

NNRTIs: *non-nucleosidereverse transcriptase inhibitors* (Inhibidores no-nucleósidos de la retrotranscriptasa)

NK: *Natural killer*

NRTIs: *Nucleoside reverse transcriptase inhibitors* (Inhibidores análogos de nucleósidos de la retrotranscriptasa)

NSI: *Non syncytium inducing* (No inductores de sincitios)

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

PCR: *Polimerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)

PHA: Phytohemagglutinin (fitohemaglutina)

PR: Proteasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa mediante retrotranscripción

RANTES: *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted*

RT: Retrotranscriptasa

SCF: *Stem cell factor*

SDF-1: *Stromal cell derived factor 1*

SI: *Syncytium inducing* (Inductores de sincitios)

SIDA: Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

TGF- β : *Transforming growth factor-beta*

Th: *T helper*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

T-trópicos: linfotrópicos

TRECs: *T cell rearrangement excision circles*

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

VIS: Virus de la inmunodeficiencia simia

γ c: Cadena *gamma*

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	ESTRUCTURA GENÓMICA VIRAL.....	2
1.2	ESTRUCTURA DEL VIRIÓN	3
1.3	CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL	4
1.3.1	Mecanismo de entrada.....	4
1.3.1.1	Unión y fusión del virión y la célula.....	4
1.3.1.2	CD4, receptor primario del VIH-1	4
1.3.1.3	Receptores de quimiocinas como co-receptores para la entrada del VIH-1	4
1.3.1.4	Las quimiocinas como factores inhibidores de la entrada viral.....	6
1.3.2	Eventos post-entrada	9
1.3.2.1	Síntesis del ADN viral.....	9
1.3.2.2	Integración del ADN viral.....	9
1.3.2.3	Síntesis de proteínas	9
1.3.2.4	Ensamblaje y diseminación del virión.....	9
1.4	INFECCIÓN POR VIH-1 <i>IN VIVO</i>.....	11
1.4.1	Etapas de la infección <i>in vivo</i> del VIH-1	11
1.4.1.1	Fase aguda	11
1.4.1.2	Fase crónica	11
1.4.1.3	Fase crítica o SIDA	12
1.4.2	Marcadores de la progresión de la infección por VIH-1 en pacientes....	14
1.4.3	Clasificación clínica de los pacientes infectados por VIH-1.....	15
1.4.4	Tratamiento antiretroviral.....	16
1.4.5	Dinámica de las células T en la infección por VIH-1.....	18
1.4.5.1	Dinámica de células T CD4.....	18
1.4.5.2	Dinámica de las células T CD8	20
1.4.5.3	Homeostasis de las células T: IL-7.....	21

1.5	FACTORES QUE AFECTAN A LA PROGRESIÓN DE LA	
	INFECCIÓN POR VIH-1	23
1.5.1	Factores virales	23
1.5.1.1	Tropismo viral	23
1.5.1.2	Escape viral	24
1.5.1.3	Atenuación viral	24
1.5.1.4	Subtipo viral	24
1.5.2	Factores del huésped.....	25
1.5.2.1	Respuesta inmune humoral y celular.....	25
1.5.2.2	Citocinas	26
1.5.2.3	Quimiocinas y sus receptores	27
1.5.2.4	Otros factores.....	30
2	<i>OBJETIVOS</i>	31
3	<i>EFFECTO DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS CITOCINAS SOBRE LA</i>	
	<i>PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1</i>	33
3.1	EFFECTO DE LA CXC-QUIMIOCINA SDF-1 SOBRE LA	
	PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1	35
3.2	EFFECTO DE LA INTERLEUCINA-7 (IL-7) SOBRE LA PROGRESIÓN	
	DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1	41
3.3	INTERACCIÓN ENTRE IL-7 Y RANTES Y SU EFFECTO CONJUNTO	
	SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.....	59
4	<i>DISCUSIÓN</i>	81
5	<i>CONCLUSIONES</i>	93
6	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	95

1 INTRODUCCIÓN

La definición del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) implica el desarrollo de diversas enfermedades infecciosas o neoplasias que se traducen en déficit de la inmunidad celular. Los primeros casos de SIDA se describieron al final de la década de los 70 en homosexuales que presentaban enfermedades oportunistas, especialmente neumonía y sarcoma de Kaposi.

El virus causante del SIDA fue aislado en 1983 a partir de células de nódulo linfático de un paciente con linfadenopatía [1]. La gran homología en la secuencia nucleotídica así como las similitudes morfológicas, demostraron que los virus aislados de pacientes con SIDA eran evolutivamente similares a miembros del género lentivirus de la familia *Retroviridae* [2], donde hoy se clasifican. Otros lentivirus han sido aislados en primates no humanos [3], así como en otros mamíferos [4]. La designación de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y virus de la inmunodeficiencia simia (VIS) se adoptó para los lentivirus humanos y los lentivirus de primates no humanos, respectivamente [5]. El VIH tipo 1 (VIH-1) hace referencia a los virus genéticamente relacionados encontrados en varias regiones de África, Asia, Europa y del continente americano. El VIH tipo 2 (VIH-2) prevalece en determinados países del oeste de África [6]. Ambos virus causan el SIDA, sin embargo, los individuos infectados con VIH-2 presentan una menor mortalidad, ya que el virus presenta una menor patogenicidad y menor transmisibilidad [7, 8]. Análisis filogenéticos de varios genes virales indican que el origen de los lentivirus humanos se encuentra en una transmisión zoonótica; siendo el reservorio del VIH-1 el VIS del chimpancé (*Pan troglodytes*) y reservorio del VIH-2 el VIS del mono gris africano, sooty mangabeys, (*Cercocebus atys*) [9-11].

1.1 ESTRUCTURA GENÓMICA VIRAL

El VIH, al igual que todos los retrovirus, tiene dos formas genómicas diferentes. En la fase extracelular del ciclo de vida el virus presenta dos copias idénticas de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, forma denominada virión; mientras que en la fase intracelular presenta una doble cadena de ADN integrada dentro del genoma celular con repeticiones terminales largas (*Long Terminal Repeats* [LTR]) flanqueando los genes virales, forma denominada provirus. Ambas formas presentan una longitud de aproximadamente 9.2 kilobases (kb) [12].

Los genes que codifican para las proteínas virales se dividen en genes estructurales, reguladores y accesorios o auxiliares. Los genes estructurales son: el gen *gag*, que codifica para los precursores de las proteínas de la cápside del virión, el gen *pol* que codifica para precursores de distintas enzimas del virión como la proteasa (PR), la retrotranscriptasa (RT), RNasa H y la integrasa (IN) y el gen *env* que codifica para los precursores de las glicoproteínas de la envuelta (Env gp). Los genes reguladores esenciales son, el gen transactivador transcripcional (*tat*) y el gen regulador de la expresión viral (*rev*), ambos genes codifican para pequeñas proteínas esenciales para la replicación viral que no aparecen en la partícula viral. Finalmente los genes accesorios o auxiliares (*vif*, *vpr*, *vpu* y *nef*) no son esenciales para la replicación viral de células en cultivo tisular, pero *in vivo* condicionan la patogenia de la enfermedad [13, 14].

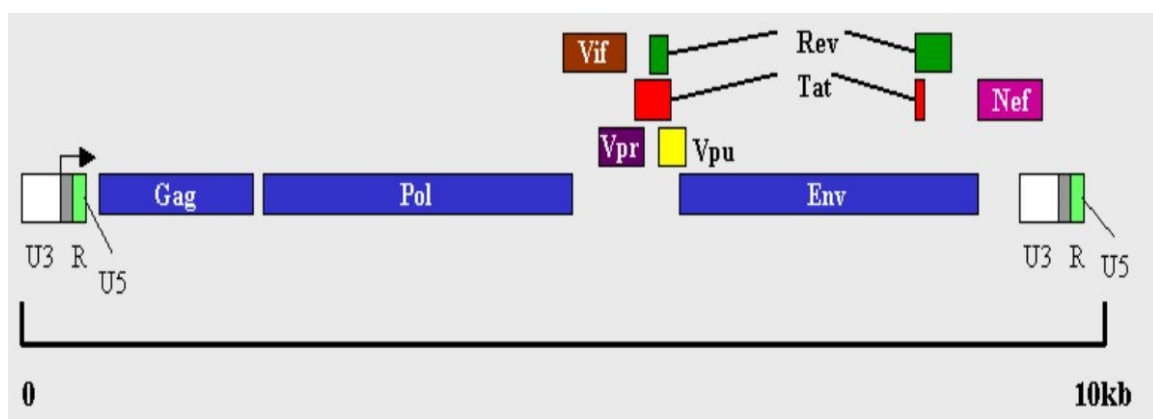


Figura 1. Organización del genoma del ADN proviral del VIH-1.

1.2 ESTRUCTURA DEL VIRIÓN

El virión es una partícula icosaédrica, de 80 a 100 nm, que consta de una envuelta o membrana lipídica y una nucleocápside [15, 16]. La nucleocápside está compuesta por dos moléculas de ARN y un primer de ARN, por proteínas estructurales, procesadas proteolíticamente a partir de un precursor polipeptídico del gen *gag*: p17, p24, ... cuya función principal es empaquetar el ARN viral, [17] y por enzimas virales derivadas de un precursor polipeptídico del gen *pol*: PR (p9), RT (p66) y IN (p32). La membrana o envuelta consta de aproximadamente 72 complejos glucoproteicos, cada uno de ellos constituido por trimeros de Env gp. Cada trímero está constituido por una subunidad de superficie que interactúa con una subunidad transmembrana, estas subunidades son designadas gp120 y gp40, respectivamente [18, 19]. La subunidad gp120 contiene un dominio de unión al receptor celular CD4. La membrana viral también posee proteínas celulares como fosfolípidos, microglobulinas y antígenos de histocompatibilidad [20-23].

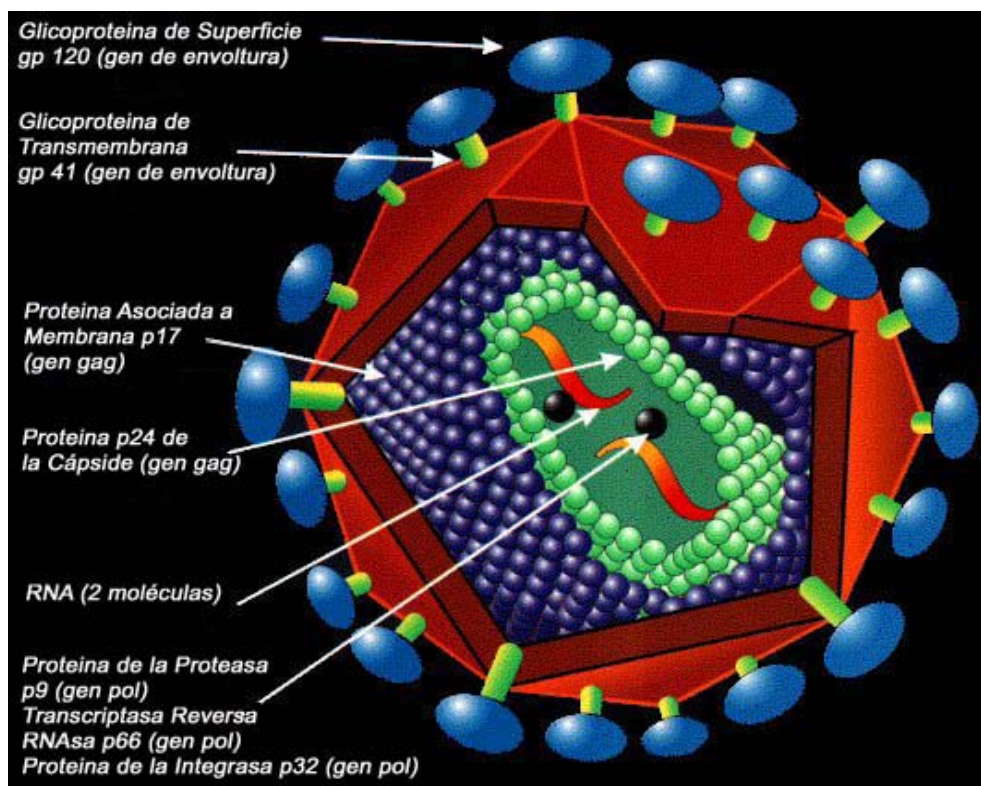


Figura 2. Estructura de un virión de VIH-1.

1.3 CICLO DE REPLICACIÓN VIRAL

El ciclo de replicación de los lentivirus de primates se puede dividir, a grandes rasgos, en dos fases: temprana y tardía. La fase temprana comienza con la unión del virus a la célula y continúa con la formación del provirus integrado en el genoma celular. La fase tardía comienza, tras un período de latencia, con la transcripción del ARN viral a partir del ADN proviral y acaba con la liberación de los viriones de la célula (Figura 3).

1.3.1 Mecanismo de entrada

1.3.1.1 Unión y fusión del virión y la célula

La unión del VIH-1 a la célula viene mediada por la interacción del dominio transmembrana de Env gp (gp120) y el antígeno CD4, que posee un dominio de alta afinidad por gp120 [24, 25]. Esta unión causa un cambio conformacional en el complejo gp120/CD4 que lleva a la interacción de gp120 con el correceptor apropiado (generalmente CCR5 o CXCR4) [26-28].

Tras la interacción gp120/correceptor se produce un cambio conformacional en gp41, concretamente en el péptido de fusión que posee en su extremo amino-terminal, que genera la unión y fusión de la membrana del virión y de la célula [29].

1.3.1.2 CD4, receptor primario del VIH-1

El antígeno CD4 es una inmunoglobulina de unos 55 KD, localizada principalmente en la membrana plasmática de los linfocitos T [30, 31] y en menor medida en otros tipos celulares como macrófagos, monocitos, células de la microglia y células dendríticas, que incluyen a las células de Langerhans y a las células de las mucosas rectal, vaginal e intestinal [30, 32, 33]. Su función es la de iniciar la activación de las células T CD4.

CD4 es el principal receptor utilizado por el virus para entrar en la célula [34], aunque se han descrito infecciones *in vitro* independientes de CD4 a través de la molécula galactosilceramida [35, 36].

1.3.1.3 Receptores de quimiocinas como co-receptores para la entrada del VIH-1

La presencia única de CD4 no permite la entrada del virus en la célula [37, 38], sino que se requiere la presencia de otro correceptor. En 1996 fue descubierto el primer

correceptor del VIH, llamado inicialmente “*fusin*” y en la actualidad CXCR4. Este correceptor es miembro de la superfamilia de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G. Posteriormente fue descubierto otro correceptor del VIH-1 denominado CCR5 y perteneciente a la misma superfamilia que CXCR4.

Los receptores de quimiocinas pueden estar expresados en la superficie celular constitutivamente o pueden ser inducidos. Además, un solo receptor puede señalizar para varias quimiocinas, sin embargo esta promiscuidad no es generalizada, ya que existen receptores que señalizan para un único ligando. La nomenclatura de los receptores se basa en la clasificación de la superfamilia de las quimiocinas (Tabla 1).

Los primeros virus aislados de pacientes fueron clasificados en función de su tropismo, o capacidad de infectar un determinado tipo celular, y de su capacidad de formar sincitios cuando eran cultivados *in vitro*. Los virus SI (inductores de sincitios) o virus T- trópicos infectaban la línea linfóide MT2 e inducían la formación de sincitios en estas células y los virus NSI (no inductores de sincitios) o virus M-trópicos que infectaban macrófagos y no infectaban ni inducían la formación de sincitios en la línea celular MT2 [39, 40]. Los aislados capaces de replicar tanto en células T como en macrófagos se denominaron dual-trópicos. Sin embargo, esta clasificación es confusa, ya que las cepas M-trópicas o NSI también infectan linfocitos T CD4 activados, y además inducen la formación de sincitios en otras líneas celulares distintas a la MT-2.

El descubrimiento de los correceptores llevó a una nueva nomenclatura de las cepas de VIH-1 basada en el uso de los mismos. Los aislados que utilizan CXCR4 como correceptor se denominan cepas X4 y se identificaron con las cepas SI o T-trópicas [41] y los aislados que utilizan como correceptor CCR5 se denominan cepas R5, identificándose con las cepas NSI o M-trópicas. Cuando un aislado es capaz de usar ambos correceptores se denominará cepa R5X4 [42].

Por lo tanto, los dos principales correceptores del VIH-1 que determinan el tropismo viral son CCR5 y CXCR4, que pertenecen a las familias de receptores CC y CXC, respectivamente. Los ligandos naturales de CCR5 son las quimiocinas *Regulated on Activation Normal T-cell Expressed and Secreted* (RANTES o CCL-5), *Macrophage Inflammatory Protein 1 α* (MIP-1 α o CCL-3) y *1 β* (MIP-1 β o CCL-4), y el único ligando natural conocido de CXCR4 es *Stromal Cell Derived Factor 1* (SDF-1 o CXCL12). Sin embargo, existen otras moléculas que también pueden actuar como correceptores, aunque de manera menos eficaz que los anteriores. Algunas de estas moléculas son otros receptores de quimiocinas: CCR3, CCR2b, CCR8, CX₃CR1 o

CCR9 [43-45], otros son receptores huérfanos con similitud a los receptores de quimiocinas: Bonzo [46]. También ha sido descrita infección independiente de CD4 y de correceptor, a través del receptor CD8 [47].

1.3.1.4 Las quimiocinas como factores inhibidores de la entrada viral

Las quimiocinas constituyen una larga familia dentro de las citocinas. Son pequeños péptidos de 8 a 14 KD, que presentan en su estructura 4 cisteínas unidas por puentes disulfuro. Se pueden clasificar estructuralmente en 4 subfamilias en función de la posición de las dos primeras cisteínas. Los nombres empleados en la nomenclatura sistemática son: CXC, CC, C y CX₃C, aunque también se las denomina con las letras griegas α , β , γ y δ , respectivamente. Las quimiocinas CXC, CC y CX₃C poseen las cuatro cisteínas conservadas, mientras que las quimiocinas C únicamente conservan 2 cisteínas. Las pertenecientes a la subfamilia CXC y CX₃C se distinguen por la presencia de uno (CXC) o tres aminoácidos (CX₃C) entre la primera y la segunda cisteína, mientras que las dos primeras cisteínas de la subfamilia CC se encuentran adyacentes [48]. Desde su descubrimiento en 1996, la descripción de nuevas quimiocinas ha sido muy rápida y la nomenclatura inicial era aleatoria, esto llevó a que una misma molécula se la denominase con varios nombres. En el 2000 Zlotnik y colaboradores [49] propusieron la nomenclatura actual, que fue oficialmente aprobada el mismo año por el *Nomenclature Committee of International Union of Pharmacology* (NC-IUPHAR) [50] (Tabla 1).

Las quimiocinas poseen funciones quimiotácticas y están involucradas en el tráfico normal de leucocitos tanto a órganos linfoides como a no linfoides, en el reclutamiento de los leucocitos a los lugares donde se producen heridas e infección, en la metástasis y en la angiogénesis [51-54]. A parte de la función quimiotáctica, las quimiocinas también presentan una función homeostática, ya que tienen un importante papel mediando la activación, coestimulación y diferenciación de células T y monocitos en la respuesta inmune [55, 56]. La actividad biológica de las quimiocinas está mediada vía su interacción con un grupo de receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G [57].

Tabla 1. Familias de quimiocinas y sus receptores.

<i>Familia</i>	<i>Nombre sistemático</i>	<i>Otros Nombres</i>	<i>Receptor/es</i>
CXC	CXCL1	GRO α /MGSA α	CXCR2/1
CXC	CXCL2	GRO β /MGSA β	CXCR2
CXC	CXCL3	GRO γ /MGSA γ	CXCR2
CXC	CXCL4	PF4	desconocido
CXC	CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXC	CXCL6	GCP-2	CXCR1/2
CXC	CXCL7	NAP-2	CXCR2
CXC	CXCL8	IL-8	CXCR1/2
CXC	CXCL9	Mig	CXCR3
CXC	CXCL10	IP-10	CXCR3
CXC	CXCL11	I-TAC	CXCR3
CXC	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4
CXC	CXCL13	BLC/BCA-1	CXCR5
CXC	CXCL14	BRAK/bolekine	desconocido
C	XCL1	Lymphotoctin/SCM-1 α /ATAC	XCR1
C	XCL2	SCM-1 β	XCR2
CX ₃ C	CX ₃ CL1	Fractalkina	CX ₃ CR1
CC	CCL1	I-309	CCR8
CC	CCL2	MCP-1/MCAF	CCR2
CC	CCL3	MIP-1 α /LD78 α	CCR1/5
CC	CCL4	MIP-1 β	CCR5
CC	CCL5	RANTES	CCR1/3/5
CC	CCL7	MCP-3	CCR1/2/5
CC	CCL8	MCP-2	CCR3
CC	CCL11	Eotaxin	CCR3
CC	CCL13	MCP-4	CCR2/3
CC	CCL14	HCC-1	CCR1
CC	CCL15	HCC-2/Lkn-1/MIP-1 δ	CCR1/3
CC	CCL16	HCC-4/LEC	CCR1
CC	CCL17	TARC	CCR4
CC	CCL18	DC-CK1/PARC AMAC-1	desconocido
CC	CCL19	MIP-3 β /ELC/exodus-3	CCR7
CC	CCL20	MIP-3 α /LARC/exodus-1	CCR6
CC	CCL21	6Ckine/SLC/exodus-2	CCR7
CC	CCL22	MDC/STCP-1	CCR4
CC	CCL23	MPIF-1	CCR1
CC	CCL24	MPIF-2/Eotaxin-2	CCR3
CC	CCL25	TECK	CCR9
CC	CCL26	Eotaxin-3	CCR3
CC	CCL27	CTACK/ILC	CCR10

Las CC quimiocinas RANTES (CCL-5), MIP-1 α (CCL-3) y MIP-1 β (CCL-4) fueron las primeras en ser identificadas como ligandos naturales de CCR5 y como inhibidores de la entrada de las cepas R5/NSI *in vitro* [58-60]. Las CC-quimiocinas tienen un amplio espectro de acción, actúan sobre monocitos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y células *natural killer* (NK). Entre sus funciones se encuentran: regular el tráfico linfocitario, inflamación, hematopoyesis y la inmunidad antitumoral [61]. Son producidas por varios tipos celulares que incluyen monocitos y varias subpoblaciones de linfocitos entre los que se encuentran linfocitos T CD4 y CD8 [62, 63].

Posteriormente se identificó la CXC quimiocina SDF-1 (CXCL12) como el ligando natural del receptor CXCR4, siendo capaz de inhibir *in vitro* la entrada de los virus X4/SI en las células [28, 64]. SDF-1 actúa como quimioatrayente para linfocitos T, macrófagos y células hematopoiéticas progenitoras (CD34+) [65, 66]. El ARN mensajero de SDF-1 se expresa constitutivamente en varios tejidos, pero no en células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cells* [PBMCs]), y su función es mediar el tráfico de linfocitos desde y hacia los tejidos [67-69].

Las quimiocinas interfieren *in vitro* con la entrada del VIH-1 en la célula mediante dos posibles mecanismos: uno denominado estérico, que consiste en el bloqueo competitivo por unión de la quimiocina a su receptor, y otro por internalización del receptor tras la unión de la quimiocina [70-73].

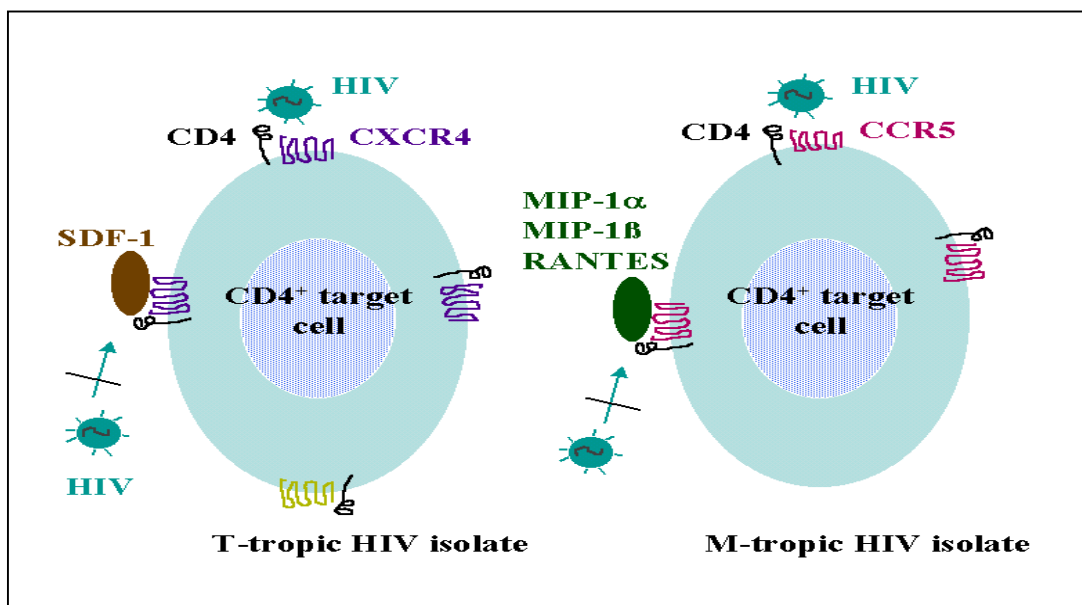


Figura 3. Tropismo de las distintas cepas del VIH-1 (T-tropica/SI/X4 o M-tropicas/NSI/R5) y el bloqueo de su entrada mediante sus ligandos naturales.

1.3.2 Eventos post-entrada

1.3.2.1 Síntesis del ADN viral

Tras producirse la fusión de las membranas, la nucleocápside viral es liberada al citoplasma celular donde se lleva a cabo la síntesis del ADN viral por la RT. En primer lugar se sintetiza una hebra de ADN a partir del ARN viral, formándose un híbrido ADN/ARN, posteriormente el ARN es degradado por la ARNasa H y finalmente se sintetiza la hebra de ADN complementaria a la hebra anterior [74, 75].

1.3.2.2 Integración del ADN viral

Una vez sintetizada la doble hebra de ADN se produce la translocación del complejo de intergración, constituido por la doble hebra de ADN y varias proteínas virales, al núcleo donde se produce la integración por acción de la IN [76, 77]. La integración en el genoma viral no es totalmente aleatoria, el ADN viral preferentemente se inserta dentro o cerca de los elementos L1 o Alu [78].

1.3.2.3 Síntesis de proteínas

Tras el período de latencia la síntesis del ARN viral se produce a partir del ADN proviral en el núcleo, posteriormente es transportado al citoplasma donde tiene lugar la expresión de los genes virales. Dicha expresión tiene lugar en dos fases: en la fase temprana se produce la síntesis de las proteínas que no se incluirán dentro del virión (Tat, Rev y Nef) y en la fase tardía se sintetizan las proteínas que se incorporarán en el virión (Gag, Pol y Env). Ese mismo ARN será el ARN viral genómico presente en la progenie viral [79]. La transcripción del ARN viral está regulada por complejos mecanismos tanto virales como celulares que influirán tanto en la latencia clínica como en la patogenicidad del virus.

1.3.2.4 Ensamblaje y diseminación del virión

En primer lugar se produce una asociación de los precursores de Gag y Gag/Pol con la membrana plasmática celular y con el ARN viral genómico, posteriormente la proteasa viral genera las proteínas funcionales maduras a partir de los precursores polipeptídicos y finalmente se produce el ensamblaje y la liberación de las partículas virales.

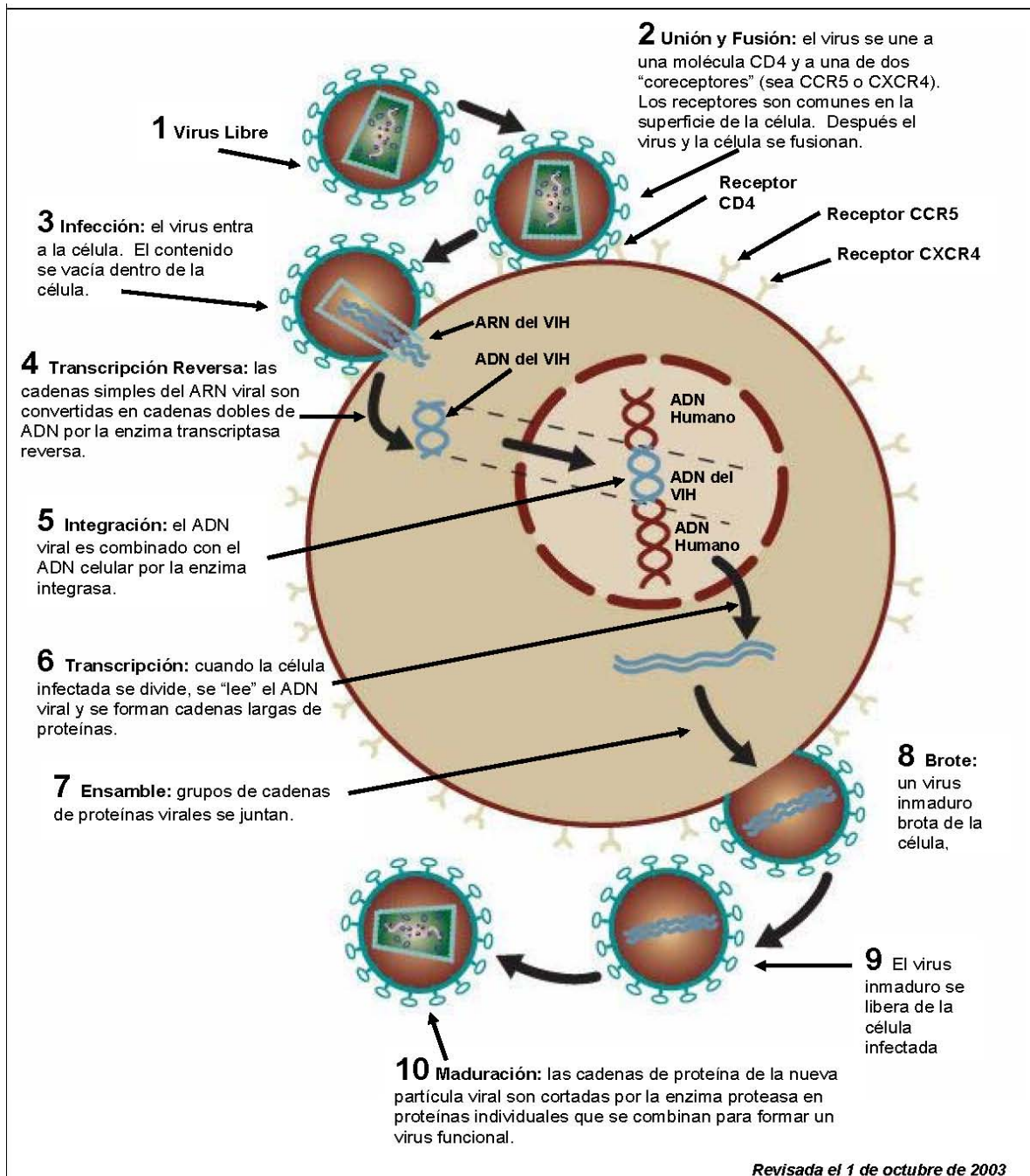


Figura 3. Ciclo de replicación del VIH.

1.4 INFECCIÓN POR VIH-1 *IN VIVO*

1.4.1 Etapas de la infección *in vivo* del VIH-1

La progresión de la infección del VIH-1 *in vivo* se divide en tres etapas: fase aguda, crónica y crítica o SIDA (Figura 5).

1.4.1.1 *Fase aguda*

Corresponde a la evolución a partir de la primoinfección y es independiente del mecanismo de transmisión (transmisión sexual o vía parenteral) [80], siendo la dosis infectante, la virulencia intrínseca de la cepa y la capacidad de respuesta del huésped [81-83] los determinantes de la evolución de la infección. En esta fase el virus se disemina principalmente por el tejido linfoide, ganglios linfáticos y otros tejidos como el sistema nervioso [84-86]. El individuo infectado permanece asintomático, salvo en algunos casos en los que se observa un síndrome clínico agudo, con una duración media de 1 a 2 semanas, caracterizado por fiebre, letargia, astenia, faringitis, etc [87]. A los 10-20 días aparece el antígeno p24 circulante, en esta fase la carga viral y la proporción de linfocitos T CD4 infectados es muy elevada [88, 89]. Al cabo de varias semanas o meses, aparecerá la respuesta inmune inespecífica (activación de la producción de interferón, actividad citotóxica natural). Posteriormente, se genera la respuesta inmune específica (anticuerpos frente a casi todas las proteínas reguladoras y estructurales, también llamado seroconversión y la expansión clonal de linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica). Finalmente se produce un descenso drástico de la carga viral y de la proporción de linfocitos T CD4 infectados.

1.4.1.2 *Fase crónica*

Esta fase dura varios años y durante ella la replicación viral persiste alcanzándose un equilibrio dinámico, por lo tanto pese a considerarse una fase de latencia no existe un verdadero estado de latencia virológica. La replicación viral se produce en los órganos linfoides, donde la carga viral es entre 10 y 100000 veces superior a la presente en plasma [90]. Durante esta fase existe una latencia clínica, ya que los pacientes suelen permanecer asintomáticos. En adultos el 50% progresa hacia estadios más avanzados a los 7-10 años de haberse producido la infección.

1.4.1.3 Fase crítica o SIDA

En esta fase se produce un incremento de la actividad replicativa del virus, igualándose la carga viral circulante y la de los órganos linfoides y generándose una depleción de linfocitos T CD4 circulantes en sangre periférica. Clínicamente aparece una grave alteración del estado general del paciente, infecciones oportunistas y trastornos neurológicos.

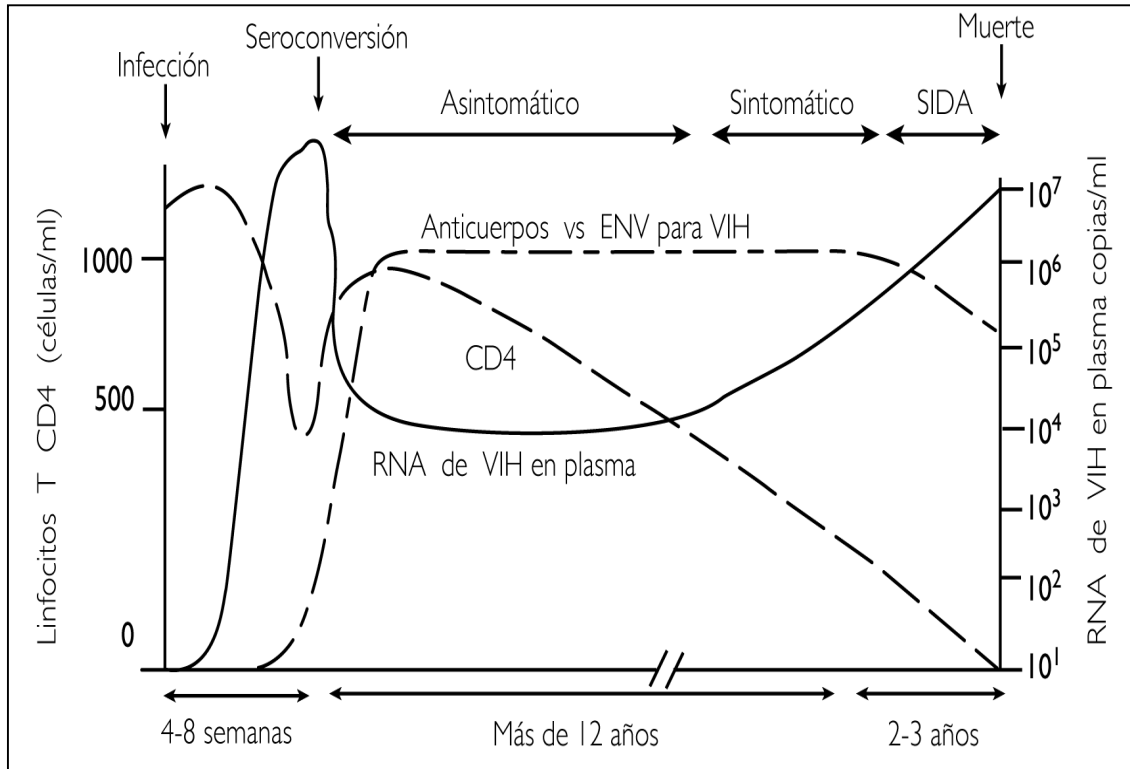


Figura 5 . Historia natural de la infección por VIH-1.

Las dos primeras fases de la infección se caracterizan por la presencia de las cepas R5/NSI, ya que son estas cepas las que se transmiten entre individuos y las que prevalecen durante la fase crónica [91]. No se conocen con exactitud los factores que determinan la restricción de cepas R5/NSI en la infección. Varios autores han sugerido que estas cepas son preferentemente transmitidas debido al patrón de expresión de los coreceptores y de sus ligandos en las mucosas de las zonas de exposición al virus [92]. El epitelio de los tejidos genital y rectal está densamente poblado con células dendríticas, macrófagos y células T que expresan CD4, CCR5 y en menor grado

CXCR4 [93]. Las células dendríticas inmaduras presentes en el epitelio expresan 10 veces más CCR5 que CXCR4 [94], y en ellas selectivamente replican las cepas R5/NSI [95, 96]. También se ha sugerido que el nivel de expresión de CCR5 en las células de Langerhans, pertenecientes a la familia de las células dendríticas, es determinante en la transmisión sexual y por lo tanto sería un factor importante en la transmisión preferencial de las cepas R5/NSI [97]. Por otro lado, la expresión de CCR5 también es elevada en el epitelio intestinal, lo que puede ser relevante en la transmisión vía rectal de las cepas R5/NSI [92]. Además, los elevados niveles de SDF-1 presentes en el intestino podrían ser un factor supresor de la transmisión de las cepas X4/SI [98]. De acuerdo a este modelo, el nivel de expresión de CCR5 tiene una influencia principal en la eficiencia de la transmisión del VIH-1, y la mayor abundancia de la expresión local de CCR5 respecto a CXCR4 explicaría la transmisión preferencial de las cepas R5/NSI.

Sin embargo, este modelo no sería válido para explicar la presencia única de las cepas R5/NSI en las infecciones verticales (de madre a hijo) y en las intravenosas, ya que en estos casos las cepas X4/SI podrían ser satisfactoriamente transmitidas al no haber un epitelio que actúe de barrera donde se seleccionarían las cepas R5/NSI. Se ha planteado otro modelo en el que miembros de la familia de las células dendríticas pueden unir partículas virales eficientemente mediante mecanismos CCR5-dependientes y CXCR4-independiente. Las células dendríticas internalizan el virus en vacuolas endocíticas intracelulares sin ser productivamente infectadas ellas mismas. Después de la internalización, las partículas víricas permanecen infecciosas durante 5 días. Posteriormente, las células transportan las partículas virales al nódulo linfático donde las presentaría a las células T y B, iniciándose la respuesta inmune adaptativa. En las zonas T de los nódulos linfáticos, las cepas R5/NSI, transportadas por las células dendríticas, se verían altamente favorecidas debido a la elevada expresión de CCR5 en las células T CD4 activadas presentes en estas zonas. Por lo tanto, la amplificación selectiva de las cepas R5/NSI en el tejido linfoide se podría estar produciendo independientemente de la vía de transmisión [99, 100].

En la última fase de la infección emergen las cepas SI/X4, la aparición de estas cepas, que son más patogénicas [40, 101], está correlacionada con una rápida caída en el número de linfocitos T CD4, una acelerada progresión de la enfermedad y la aparición de SIDA [102, 103]. Tampoco se conocen los factores que determinan este cambio de tropismo, siendo este otro de los enigmas hoy en día estudiados.

1.4.2 Marcadores de la progresión de la infección por VIH-1 en pacientes

Algunos de los marcadores biológicos empleados para determinar el grado de progresión de la infección por VIH-1 en un paciente son: el antígeno p24, que se detecta por ELISA y ha sido desplazado por técnicas de PCR con mayor sensibilidad; el recuento de linfocitos T CD4 en valor absoluto o también puede utilizarse el porcentaje respecto a la cifra de linfocitos totales; el ADN-VIH cualitativo o carga proviral, que se detecta mediante PCR a partir de linfocitos de sangre periférica del paciente, y que es un marcador imprescindible para diagnosticar el periodo ventana (período en el que hay una ausencia de positividad para el resto de los marcadores); y finalmente el ARN-VIH cuantitativo, también llamado carga viral o viremia plasmática ya que determina el número de copias de ARN viral por mililitro de plasma, se detecta mediante las técnicas de PCR y ELISA.

Aproximadamente entre un 50 y un 70 % de los pacientes infectados por VIH-1 evolucionan a SIDA entre los 7-10 años después de la primoinfección [104, 105]. Existen, sin embargo, grandes variaciones individuales, habiéndose descrito pacientes que han evolucionado en menos de 6 meses y otros que, tras 10-12 años, permanecen estables y con una inmunidad relativamente preservada. Existen algunos marcadores que predicen una rápida evolución cuando se identifican en la primoinfección como son: primoinfección sintomática, recuento de linfocitos T CD4 bajos, detección de antígeno p24, retraso en la positivación de las pruebas de ELISA, detección de cepas virales SI/X4, virus que escapan a la acción de los anticuerpos neutralizantes o carga viral > 100000 copias/ml. En un paciente asintomático en fase crónica, los marcadores que predicen una peor evolución son: rápida disminución de los linfocitos T CD4, carga viral alta e infección por cepas X4/SI.

La asociación de un marcador con una evolución más desfavorable no indica necesariamente una relación de causalidad, de hecho, la aparición de algunos marcadores es consecuencia de la progresión y no causa. El nivel de viremia plasmática o carga viral es el mejor marcador, hasta el momento descrito, para predecir la progresión a SIDA y la supervivencia. El recuento de linfocitos T CD4 tiene menor valor predictivo, probablemente porque los cambios se producen con retraso con respecto a la carga viral [106]. Viremias plasmáticas por debajo de 3000-10000 copias/ml indican un buen pronóstico, mientras que cifras por encima de 3000-10000

predicen una evolución más rápida. Sin embargo, hay que destacar, que no existe un tope inferior por debajo del cual no haya progresión, y que para cualquier nivel de linfocitos T CD4 hay una gran dispersión de viremias plasmáticas.

1.4.3 Clasificación clínica de los pacientes infectados por VIH-1

El principal sistema de clasificación empleado para pacientes infectados por VIH-1 fue propuesto por los *Centres for Disease Control* (CDC) [107] en 1986 y revisado posteriormente en 1993 [108]. El objetivo fundamental de la nueva clasificación y definición de SIDA fue reflejar la importancia clínica de un recuento de linfocitos T CD4 inferior a $200/\text{mm}^3$, con independencia de que existan manifestaciones clínicas. Las categorías clínicas para adultos o adolescentes (>13años) son las presentes en la Tabla 2.

Tabla 2. Categorías clínicas según el recuento de células T CD4

<i>Recuento de CD4</i> \ <i>Categoría</i>	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
$500/\text{mm}^3$ (>29%)	A1	B1	C1
$200-499/\text{mm}^3$ (14-28%)	A2	B2	C2
$< 199 \text{ mm}^3$ (<14%)	A3	B3	C3

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 relacionados con la infección por VIH-1 o cuyo tratamiento y cuidado puedan complicarse debido a la presencia de la infección por VIH.

La categoría clínica C se aplica a pacientes que presenten o hayan presentado algunas de las complicaciones pertenecientes a esta categoría.

Los pacientes incluidos en las categorías **C1**, **C2**, **C3**, **A3** y **B3** se consideran afectados por SIDA. Las dos últimas categorías (A3 y B3) representan la ampliación de la definición de SIDA en la clasificación propuesta en 1993, basada exclusivamente en el recuento de linfocitos T CD4.

1.4.4 Tratamiento antiretroviral

El espectro de drogas antiretrovirales descubiertas para el VIH-1 se centra en dianas vulnerables del ciclo de replicación del virus. En la primera terapia antiretroviral se empleó el inhibidor de la retrotranscriptasa *azidobudine* (o AZT), que es un análogo de nucleósidos, aprobado por el *Food and Drug Administration* (FDA) en 1987 [109]. Los análogos de nucleósidos de la RT, *nucleoside reverse transcriptase inhibitors* (NRTIs), interfieren en la replicación del VIH-1 inhibiendo de forma competitiva esta enzima. Sin embargo esta monoterapia posee una limitada actividad contra el VIH-1 [110]. Posteriormente, al avanzarse en los conocimientos acerca del virus, aparecieron dianas adicionales a la RT, como la proteasa. Los inhibidores de la proteasa se unen a su centro activo inhibiendo la formación de proteínas virales maduras y haciendo que la partícula viral no sea infecciosa.

Es en 1995 cuando se llevan a cabo los primeros ensayos clínicos usando un inhibidor de la proteasa en combinación con dos NRTIs, esta triple terapia combinada se denominó terapia antiretroviral altamente activa (*highly active antiretroviral therapy* [HAART]). Con esta nueva estrategia la historia natural de la infección por VIH-1 cambia de forma brusca y radical; por un lado el número de linfocitos T CD4 se recupera, y por otro se consigue reducir la cantidad de carga viral por debajo de 20-80 copias/ml en más del 50-80% de los pacientes y mantener este efecto durante periodos superiores a 1 año, alcanzándose respuestas superiores a los 4 años [111].

Otras triples terapias antiretrovirales fueron posibles con la introducción de los inhibidores no-nucleósidos de la retrotranscriptasa (*non-nucleosid reverse transcriptase inhibitors* [NNRTIs]). Los NNRTIs constituyen un grupo estructuralmente diverso que se unen a una región distante del centro activo generando cambios conformacionales en el centro activo de la retrotranscriptasa e inhibiendo su actividad.

El desarrollo de nuevos fármacos continúa y nuevas drogas son introducidas paulatinamente. El ejemplo más reciente es *enfuvirtide* (T-20), un inhibidor de fusión

aprobado por el FDA en el 2003 [112]. T-20 es un péptido sintético de 36 aminoácidos que inhibe la entrada del VIH-1 en la célula al unirse al péptido de fusión de gp41 [113].

Tabla 3. Drogas antiretrovirales aprobadas por el FDA

Droga	Tipo de inhibidor	Fecha de aprobación por el FDA
<i>Azidovudine (AZT)</i>	NRTI	Marzo 1987
<i>Didanosine (ddI)</i>	NRTI	Octubre 1991
<i>Zalcitabine (ddC)</i>	NRTI	Junio 1992
<i>Stavudine (d4T)</i>	NRTI	Junio 1994
<i>Lamivudine (3TC)</i>	NRTI	Noviembre 1995
<i>Saquinavir-HGC</i>	Inhibidor de proteasa	Diciembre 1995
<i>Ritonavir</i>	Inhibidor de proteasa	Marzo 1996
<i>Indinavir</i>	Inhibidor de proteasa	Marzo 1996
<i>Nevirapine</i>	NNRTI	Junio 1996
<i>Nelfinavir</i>	Inhibidor de proteasa	Marzo 1997
<i>Delavirdine</i>	NNRTI	Abril 1997
<i>3TC + AZT</i>	2 NRTIs	Septiembre 1997
<i>Saquinavir-SGC</i>	Inhibidor de proteasa	Noviembre 1997
<i>Efavirenz</i>	NNRTI	Septiembre 1998
<i>Abacavir</i>	NRTI	Diciembre 1998
<i>Amprenavir</i>	Inhibidor proteasa	Abril 1999
<i>Lopinavir + Ritonavir</i>	Inhibidor proteasa	Septiembre 2000
<i>AZT + 3TC + abacavir</i>	3 NRTIs	Noviembre 2000
<i>Tenofovir</i>	NRTI	Octubre 2001
<i>Enfuvirtide (T-20)</i>	Inhibidor fusión	Marzo 2003

1.4.5 Dinámica de las células T en la infección por VIH-1

1.4.5.1 Dinámica de células T CD4

La pérdida de células T CD4, observada en sangre periférica en individuos infectados por el VIH-1, es esencialmente bifásica, con una rápida y masiva depleción de células T durante la infección aguda, seguida de una suave caída que caracteriza a la fase crónica. Los linfocitos T CD4 son una población heterogénea que en términos muy generales se puede dividir en función del fenotipo en células *naive* o células de memoria. Las células *naive* expresan el receptor CD45RA, CD62L (L-selectina, esencial para la entrada de las células en el nódulo linfático) y no expresan marcadores de activación celular, mientras que las células de memoria expresan CD45RO y marcadores de activación celular [114, 115]. La expresión de los correceptores del VIH-1 en las células T CD4 también es diferente en función del fenotipo celular; la expresión del correceptor CCR5 está restringida a las células de memoria, mientras que el correceptor CXCR4 se expresa tanto en las células *naive* como en las de memoria, siendo la expresión mucho mayor en las células *naive* [116, 117]. Ambos tipos celulares son infectados *in vivo*, sin embargo las células de memoria son las dianas principales del virus. Este subtipo celular presenta una mayor cantidad de provirus y una mayor capacidad de producir virus en cultivo de tejido tras activación con interleuquina 2 (IL-2) o estimulación con anti-CD3 y anti-CD28 [118-122].

Son varias las hipótesis que han sido propuestas para explicar la depleción de células T mediada por el VIH-1, algunas de ellas son totalmente opuestas, mientras que otras son compatibles.

En la fase crónica de la infección, la población de células T CD4 de memoria es la primera en perderse, posteriormente se observa una reducción de la población de células T CD4 *naive* [123, 124]. Además, la caída en el número de células T CD4, que caracteriza a la fase crítica, correlaciona con la frecuencia de células *naive* infectadas con cepas X4/SI, y no con la frecuencia de las células de memoria o las totales infectadas por dichas cepas virales [125]. La depleción por efecto citopático directo del virus sobre la célula representa la causa de destrucción más evidente, sin embargo, la baja frecuencia de los linfocitos T CD4 infectados *in vivo*, entre un 0.01-1 % [126-128], no explicaba la profunda depleción observada *in vivo*, lo que llevó a la búsqueda de otras posibles causas de destrucción (Tabla 3) [129-136].

Tabla 3. Causas de destrucción de células T.

<i>Destrucción directa de células infectadas</i>	<i>Destrucción indirecta de células no infectadas</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Apoptosis mediada por envelope • Apoptosis mediada por Vpr • Formación de sincitios • Acumulación de ADN viral no integrado o ARN viral. 	<ul style="list-style-type: none"> • Citólisis mediada por células T citotóxicas específicas o por células natural killer • Reacciones autoinmunes (homología entre gp120 y moléculas HLA) • Incorporación a sincitios • Apoptosis mediada por activación • <i>cross-linking</i> de CD4 unido a gp120

En la infección por VIH-1, el paciente presenta un estado crónico de activación de su sistema inmune. Esta activación crónica es otra de las hipótesis que intentan explicar la depleción periférica de las células T CD4 y se apoya en las siguientes evidencias: 1) el VIH-1 preferentemente infecta células T CD4 activadas, 2) el agotamiento del pool de células T de memoria es debido al continuo estado de activación y 3) las células T *naive* que son activadas entran al pool de células T de memoria [137-140].

Además, tanto en la fase aguda como en la crónica, se produce una redistribución de las células T de la sangre a los órganos linfoides debido a que el estado de activación del sistema inmune afecta a los patrones de expresión de los receptores de *homing* y a sus ligandos endoteliales e induce la producción de moléculas de adhesión, de citocinas y de quimiocinas. Estos cambios en la distribución de células T podrían ser la causa de la “aparente” depleción en el número de células T CD4 en sangre periférica [114, 141-145].

Las mucosas de los tractos intestinal, respiratorio y reproductor presentan grandes cantidades de células T CD4 de memoria [141, 146, 147], en modelos de macacos

infectados con VIS, vía intravenosa o a través de mucosa, se produce una rápida (2 a 3 semanas) y casi completa pérdida de las células T CD4 de la mucosa intestinal y de la rectal [148-151]. Recientemente, se ha descrito que en humanos la depleción más severa de células T CD4+ se produce en el tracto gastrointestinal durante todas las fases de la infección por el VIH-1, dicha depleción se produce preferentemente en las células CD4+ CCR5+ [152, 153].

Por otra parte, hay autores que apoyan la hipótesis de que la destrucción directa o indirecta de las células T CD4 no es la causa principal de la depleción celular, sino el bloqueo de la regeneración linfocitaria tanto a nivel central (timo y médula ósea) como a nivel periférico (nódulo linfático). La infección por VIH-1 genera trastornos en la médula ósea, en el timo y en los nódulos linfáticos. Estudios clínicos han demostrado que el timo de niños y de adultos infectados por VIH-1 sufre cambios morfológicos que incluyen la depleción de timocitos y la involución del órgano [154-157]. Los timocitos son dianas para el VIH-1 prácticamente en todas las fases de su maduración ya que expresan CD4 y CXCR4, también expresan CCR5 pero únicamente en timocitos maduros y a niveles bajos [158-160]. En estudios hechos *in vitro* en modelos de ratón se ha visto que las cepas X4/SI infectan principalmente timocitos, mientras que las cepas virales R5/NSI infectan células estromales y macrófagos, sugiriendo que *in vivo* las cepas X4/SI son las responsables de la depleción de timocitos y las cepas R5/NSI son las responsables del trastorno de la arquitectura del timo [160]. La infección por VIH-1 también inhibe la producción de células hematopoiéticas, mediante supresión directa de la maduración de las células progenitoras hematopoiéticas (CD34+) por infección de las mismas o indirectas por destrucción de la arquitectura de la médula [161-163]. La replicación viral también causa daños en la arquitectura del nódulo linfático y depleción de las subpoblación de células T CD4, siendo esencial la integridad estructural del nódulo linfático para mantener el pool de células T *naive* y de memoria [164-166].

1.4.5.2 Dinámica de las células T CD8

En individuos sanos el coeficiente CD4/CD8 en PBMCs tiene un valor aproximado de 2/1, sin embargo tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección por VIH-1 se produce una inversión en el coeficiente alcanzándose el valor de 0.5. Esto es debido a que en la fase aguda se produce una gran expansión clonal de células T CD8 en respuesta a la infección, que se mantiene posteriormente durante la

fase crónica como consecuencia de la activación crónica del sistema inmune. En realidad, durante la fase crónica, a pesar de que el número total de células T CD8 no disminuye, la subpoblación de células CD8 *naive* se depleciona de forma paralela a los CD4, y es la expansión de células T CD8 de memoria, la que mantiene el pool celular [124]. En los estadios finales de la infección también se observa la depleción de las células T CD8 + [167, 168].

1.4.5.3 Homeostasis de las células T: IL-7

Durante la fase crónica el tamaño del pool de células T CD4 periféricas se mantiene constante, ya que el sistema inmune tiene la capacidad de reconstituirse de la depleción celular tanto a través de la vía timo-dependiente (producción *de novo* de células T *naive* procedentes del timo) como de la timo-independiente (expansión periférica de células T maduras) [169-171] mediante un mecanismo homeostático que permite mantener constante el número de células T CD4.

La interleuquina 7 (IL-7) es una citocina única en su capacidad homeostática de aumentar la generación de células T mediante ambas vías, tanto en el ámbito de la linfopenia general como en la linfopenia causada por la infección del VIH-1 en particular. Se ha descrito que los niveles de IL-7 incrementan durante la linfopenia en individuos infectados con el VIH-1 [172, 173].

IL-7 es una citocina miembro de la familia de las hematopoyetinas, que incluye a IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), IL-9, IL-13, IL-15, M-CSF y *stem cell factor* (SCF). Señaliza a través de un receptor con dos componentes, la cadena *gamma* (γc), que comparte con otras citocinas de su familia, y la cadena *alpha* del receptor IL-7 (IL-7R α) [174-176]. IL-7 es producida por las células estromales del timo y de la médula ósea [177-179], otros lugares de producción incluyen el epitelio intestinal, queratinocitos, hígado y células dendríticas [180-185]. Esta citocina juega un papel esencial en varias etapas del desarrollo de células B y T no maduras (tanto CD4+ como CD8+) [186-189]. Se ha descrito que mutaciones que impiden la expresión de IL-7R α dan lugar a inmunodeficiencias severas en ratones [190] y que IL-7 exógeno aumenta el reordenamiento del TCR induciendo la generación *de novo* de células T *naive* [191]. A pesar de que se conocen mejor los efectos sobre las poblaciones de células B y T no maduras, IL-7 también modula la función de las células T maduras: 1) actúa como coestimulador de la activación de células T induciendo la proliferación y la producción de citocinas [192-194], 2) induce

la expresión de CXCR4 en células T CD4 de memoria [195], 3) inhibe la muerte celular programada (apoptosis) a través de la producción de moléculas de la familia Bcl-2 [196-198] e 4) interviene en el mantenimiento de la homeostasis de las células T tanto a través de la vía tímica como de la extratímica [172, 186, 199, 200].

Existen evidencias que apoyan ambas teorías, por un lado se ha descrito que aproximadamente un 50% de los individuos infectados con VIH-1 presentan abundante tejido tímico [201]. En niños infectados se ha observado, tras la terapia antiretroviral, un aumento del tejido tímico y de los niveles de *T cell rearrangement excision circles* (TREC), marcador de células T que han emigrado recientemente del timo [202-204]. *In vitro* se ha descrito un aumento en la proliferación de timocitos y de los niveles de TREC tras la adición exógena de IL-7 en cultivo de tejido tímico humano [205]. Por otro lado, en modelos humanos y en macacos se ha visto un aumento en la proliferación de células T en la periferia, medida como un aumento en la expresión de Ki-67, y de la incorporación *ex vivo* de bromodesoxihuridona (análogo de la timidina que se emplea como marcador de la división celular) en respuesta a IL-7 [206, 207]. En ratones, timectomizados y deplecionados de células T, el tratamiento con IL-7 reconstituye el sistema inmune por proliferación periférica del inóculo de células T injertado [198].

Independientemente de la vía de regeneración de células T CD4, *in vivo* los niveles de IL-7 incrementan como parte de una respuesta homeostática a la linfopenia, bien sea causada por el VIH-1 o por otras condiciones como son la leucemia linfocitaria severa o la linfopenia causada por la quimioterapia entre otras [173, 208, 209]. En pacientes infectados con VIH-1 la correlación más fuerte se observa entre los niveles circulantes de IL-7 y el número de células T CD4, la correlación es mucho menor entre IL-7 y las células T CD8 y las células B. También se ha observado la correlación inversa en individuos con cáncer tratados con quimioterapia, cuyos niveles de IL-7 han vuelto a su nivel basal tras la recuperación de las células T CD4 después de la terapia [172]. Hasta la fecha no se sabe si los niveles de IL-7 aumentan porque al disminuir el número de células que expresan IL-7R con la linfopenia aumentan los niveles de IL-7 libre en plasma, o si es debido a un aumento en la producción de la citocina.

1.5 FACTORES QUE AFECTAN A LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1

Existe una gran variación en el curso de la infección por VIH-1 entre los individuos infectados. Los progresores típicos (80%) son aquellos individuos que permanecen asintomáticos durante 8 a 10 años, tras este periodo de latencia desarrollan SIDA. Un pequeño porcentaje (5-10%) de los individuos infectados se denominados *Long-Term nonprogressors* (LTNPs), son individuos que presentan niveles normales de CD4 y carga viral baja o indetectable en ausencia de tratamiento durante incluso 20 años [210, 211]. En tercer lugar, los progresores rápidos (10%) son los individuos que desarrollan SIDA en 3 a 5 años después de la infección. A parte de los tres escenarios típicos, existe un grupo llamado “expuestos no infectados” dentro del cual se incluyen a individuos de alto riesgo en infectarse con el VIH-1, como son usuarios de drogas intravenosas, trabajadores del sexo comercial, parejas discordantes que tienen relaciones sexuales sin protección, niños de madres infectadas y profesionales sanitarios y de laboratorio [212-216]. Estudios inmunológicos y genéticos de los individuos LTNPs y de los expuestos no infectados han permitido determinar los factores del huésped que influyen en la progresión de la infección.

No sólo los factores del huésped, sino también los factores virales influyen en la patogenicidad del virus y por lo tanto en la progresión de la infección. El desarrollo de la enfermedad posiblemente esté determinado por el fino balance entre la habilidad del virus de replicar y la habilidad del huésped de generar una respuesta inmune adecuada.

1.5.1 Factores virales

1.5.1.1 Tropismo viral

Las cepas X4/SI son selectivamente suprimidas durante las primeras fases de la infección [217] y emergen en los estadios más avanzados de la enfermedad en el 50% de los individuos infectados [40, 102]. La aparición de las cepas X4/SI está relacionada con un aumento de la citopatogenicidad, una rápida caída en el número de células T CD4, una rápida progresión de la enfermedad y el establecimiento del SIDA [103, 218, 219]. Sin embargo, este cambio de fenotipo viral asociado a una evolución en el uso de correceptor [220, 221] no es imprescindible para la progresión de la enfermedad.

Experimentalmente, una cepa viral R5/NSI se convierte en X4/SI debido únicamente a dos o tres mutaciones en la región V3 de gp120 [222]. Debido a la elevada

tasa de replicación y de mutación viral [223, 224], así como a la gran disponibilidad de células diana T CD4+ CXCR4+ presentes en sangre periférica, se esperaría que *in vivo* la conversión de cepas R5/NSI a X4/SI ocurriese rápidamente. Por lo tanto, *in vivo* debe de existir una presión selectiva contra la evolución y la dominancia de las cepas X4/SI.

1.5.1.2 Escape viral

La capacidad del virus de replicar a pesar de la respuesta inmune (tanto la respuesta celular específica contra VIH-1 como la humoral) sugieren que el virus debe de usar varios mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped. Estos mecanismos incluyen: la variación antigénica, de manera que los epítopes no reconocibles son presentados a las células T pero no ocurre la activación de las células efectoras [225-227]; la down-regulación de las moléculas MHC en la superficie de las células infectadas mediada por Nef [228]; y la desaparición de las células T CD8 específicas de VIH-1 [229, 230]. Además, el virus persiste en “santuarios inmunológicos” como son el sistema nervioso central, el ojo o los testículos, donde la exposición a las células inmunes efectoras está inhibida. La infección de células no activadas genera un reservorio latente ya que tampoco son reconocidas por las células inmunes efectoras [231, 232].

1.5.1.3 Atenuación viral

Se han asociado defectos en determinados genes virales con la ausencia o la disminución de la progresión de la infección por el VIH-1.

Individuos infectados con cepas de VIH-1 con una delección en el gen *nef* presentan un retraso en la progresión de la enfermedad [233, 234]. Entre las diversas funciones conocidas de Nef se encuentra su capacidad de internalizar la expresión de CD4, aumentar la infectividad de las partículas virales y estimular la replicación del VIH-1 en PBMCs [235-238], por lo que dicha delección podría estar afectando a las funciones de la proteína.

1.5.1.4 Subtipo viral

Los tres principales grupos del VIH-1 son: M, O y N. Dentro del grupo M se agrupan al menos 10 subtipos diferentes genéticamente (clados de la A a la J). El subtipo B es el más común en EEUU y en Europa Occidental, mientras que los subtipos no B (A, C, D y E) predominan en los países en vías de desarrollo. A través de estudios epidemiológicos se han encontrado diferencias en la progresión de la infección en

función del subtipo viral [239-241], sin embargo a menudo los estudios epidemiológicos son contradictorios o no concluyentes [242, 243].

1.5.2 Factores del huésped

1.5.2.1 Respuesta inmune humoral y celular

Los dos aspectos de la respuesta inmune celular a considerar en la patogénesis viral son: la respuesta *T helper* y la respuesta de las células T citotóxicas. Las células *T helper* (Th) son células T CD4 específicas de VIH-1, que tras su activación secretan interleuquina-2 (IL-2) que induce la respuesta humoral y la respuesta T citotóxica. La respuesta T citotóxica es generada por los linfocitos citotóxicos T CD8 específicos de VIH-1 (Cytotoxic T-cell lymphocytes [CTL]) que matan a células infectadas que presentan péptidos virales en su superficie. En la infección primaria, se ha asociado una alta frecuencia de CTLs específicos de VIH-1 con cargas virales bajas y con un menor descenso en el número de células T CD4. Además, los LTNPs presentan una mayor cantidad de CTL específicos de VIH-1 que los progresores normales. También se ha descrito actividad CTL en individuos que no presenta actividad *T helper* detectable, sin embargo, esta actividad CTL no está asociada al control de la replicación viral [244].

Las células infectadas por el VIH-1 son capaces de inducir la formación de anticuerpos (respuesta humoral). Los anticuerpos más efectivos son aquellos que impiden la entrada del virus a la célula al unirse a proteínas de la envuelta viral, llamados anticuerpos neutralizantes. Se han descrito correlaciones entre niveles altos de anticuerpos anti-p24 con una lenta progresión [210, 245, 246], aunque también se han descrito altos niveles de anticuerpos anti-gp120 con una rápida progresión [246]. Los estudios de neutralización de virus con anticuerpos procedentes de suero de individuos infectados son muy contradictorios. Fuertes neutralizaciones observadas *in vitro* correlacionan con progresiones lentas [247] en algunos estudios pero no en todos [248]. También se describió un factor (o factores) soluble producido por células T CD8 no citotóxicas, denominado *CD8 T cell antiviral factor* (CAF) que inhibía la replicación viral en PBMCs *in vitro* [249, 250], sin embargo no se ha identificado esta molécula ni tampoco se conoce su mecanismo exacto de inhibición.

1.5.2.2 Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas de bajo peso molecular, menos de 30KD, que median la comunicación célula a célula. Su actividad biológica viene dada por la unión específica a sus receptores, que se expresan en distintos tipos celulares, por lo cual median numerosas respuestas fisiológicas, que incluyen el desarrollo de la respuesta inmune celular y humoral, inducción de la respuesta inflamatoria, regulación de la hematopoyesis y control de la proliferación y la diferenciación celular. Las citocinas presentan varias formas de acción: de forma paracrina, uniéndose a receptores de membrana de la misma célula que la secretó o de una célula diana cercana o también puede ejercer su función de forma endocrina uniéndose a células diana en otras partes del cuerpo, sin embargo ésta es menos habitual.

Las citocinas son producidas por una gran variedad de células, sin embargo los dos principales productores son las células T CD4 y los macrófagos [251-253]. Las células T CD4 se pueden dividir en dos subtipos en función del tipo de interleucinas que producen; las Th1 secretan IL-2 e INF- γ , mientras que las Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13. Ambos subtipos celulares producen IL-3. Las citocinas producidas por las células Th1 están involucradas en la estimulación de la proliferación de los CTLs, mientras que las producidas por las Th2 son responsables de la activación de la respuesta inmune humoral [254-256]. El patrón de expresión de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR5 también es diferente en ambos tipos celulares, las células Th1 expresan 8 veces más CCR5 que las células Th2, mientras que el receptor CXCR4 se encuentra expresado 4 veces más en las Th2 respecto a las Th1 [257].

Clerici y Shearer presentaron en 1993 la hipótesis del cambio de Th1 a Th2, según esta teoría en individuos infectados con VIH-1 se produce una reducción de la actividad de las células Th1 y un aumento de la actividad de las células Th2. Este cambio de actividad conlleva un cambio en el balance de citocinas que sería crítico para la aparición de SIDA [258]. Sin embargo, no se conocen las causas de este cambio de Th1 a Th2 e incluso hay autores que no observan dicho cambio en estadios moderados y avanzados de la infección por VIH-1 [259].

Hay citocinas que controlan la replicación del VIH-1 *in vitro*; por ejemplo TNF- α , TNF- β , IL-1, IL-6 son citocinas pro-inflamatorias cuyos niveles son más elevados en individuos infectados con el VIH-1 y que inducen la replicación viral [260]. TNF- α e IL-1 actúan activando NF-kB que es un factor de transcripción celular que induce la

expresión de genes del VIH-1 [261, 262]. Por otro lado INF- α , INF- β , e IL-16 inhiben la replicación viral [263]. Otras citocinas como IL-2, IL-4, IL-10, *transforming growth factor*- β (TGF- β) e INF- γ , tienen efectos opuestos, suprimen o inducen la replicación viral [264-266]. La producción de algunas de estas citocinas está inducida por determinadas proteínas virales. Se ha descrito que la proteína reguladora Tat induce la producción de *tumor necrosis factor* α (TNF- α) y la proteína estructural p17 induce la producción de TNF- α y de interferón- γ (IFN- γ), citocinas que favorecen la replicación viral [267, 268].

Entre las citocinas ocurren interacciones importantes, por ejemplo IL-10, que se encuentra sobre-expresado en individuos infectados, inhibe la replicación del VIH-1 mediante el bloqueo de la secreción de TNF- α e IL-6 [269]. Además las citocinas pueden interactuar con las quimiocinas y/o sus receptores, como es el caso de IL-4 que induce una internalización de la expresión de CCR5 y una sobre-expresión de CXCR4, favoreciendo supuestamente la replicación de las cepas X4/SI [264, 270]. También se ha descrito una mutación puntual en la posición 589 (de C a T) en el gen promotor de IL-4 que se ha asociado con un retraso en la aparición de las cepas X4/SI [271].

IL-7, a parte de intervenir en el mantenimiento del pool de células T, también puede interactuar con otras citocinas, quimiocinas o sus receptores regulando la replicación viral. IL-7 induce la expresión de CXCR4 en células T de memoria CD4+ y CXCR4- [195]. Además, se ha descrito que IL-7 sola, o en combinación con IL-4, también induce la expresión de CXCR4 en timocitos maduros generando un aumento significativo en la replicación de las cepas X4 respecto a las R5 *in vitro* [272]. Esto sugiere que un microambiente determinado de citocinas en el timo puede influir en la expresión de receptores y por lo tanto en la replicación del VIH-1 en este órgano. Sin embargo, no se conoce la relevancia exacta de IL-7 en la patogénesis del VIH-1.

1.5.2.3 Quimiocinas y sus receptores

Los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4 son claves en la patogénesis del VIH-1, de hecho la presencia de CCR5 es crítica para que se produzca la infección. Existe una delección de 32 pares de bases en el receptor CCR5 (CCR5- Δ 32), que genera una proteína no funcional que no se expresa en la membrana celular. La presencia en homocigosis de esta delección está asociada con la resistencia a la infección con VIH-1 [273, 274], aunque se ha descrito algún caso de individuos con esta mutación

infectados con cepas X4/SI [275]; la presencia en heterocigosis se asocia a un retraso en la progresión de la infección [276, 277]. Se han descrito otras mutaciones en el gen promotor de CCR5 que también afectan a la transmisión o a la progresión de la infección [278-280], así como una correlación entre la densidad de la expresión de CCR5 en la superficie celular y la carga viral [281].

Otra mutación genética que afecta a la progresión de la infección es la sustitución V64I en el gen que codifica para CCR2, esta mutación retrasa la progresión, a pesar de que CCR2 no es uno de los correceptores principales del VIH-1, esta mutación está relacionada con otra mutación en la región del promotor de CCR5 [282, 283].

No se ha descrito ninguna mutación en CXCR4 que pueda alterar la progresión de la infección, esto puede ser debido a que este receptor es esencial para el desarrollo embrionario, con lo que mutaciones en el gen que codifica para este receptor resultarían letales como sucede en ratones [284].

Ostrowski y colaboradores mostraron que individuos infectados con VIH-1 presentan un porcentaje más elevado de células CD4 + que expresan CCR5 que los individuos no infectados, y una marcada internalización de correceptor CXCR4 en las células T CD4 +, CD8 + y en los monocitos CD14 +. Estos cambios directamente correlacionan con un mayor grado de la activación de las células y un avanzado estadio de la infección [285].

Como ya he dicho previamente, SDF-1 selectivamente bloquea la entrada de las cepas X4/SI, mientras que RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β bloquean la entrada de las cepas R5/NSI *in vitro*. Intuitivamente cabe pensar que las quimiocinas podrían estar modulando la expresión de sus receptores *in vivo*. Por otro lado, alteraciones inmunológicas o genéticas a nivel de la propia quimiocina pueden alterar la susceptibilidad de la infección por VIH-1 o la tasa de progresión de la infección una vez establecida. Sin embargo, aún no está bien definido el papel de las quimiocinas sobre el curso de la infección del VIH-1 *in vivo*.

El nivel plasmático de SDF-1 en individuos sanos oscila en un amplio rango, sin embargo, parece mantenerse estable en el tiempo independientemente del valor absoluto [286]. En individuos infectados con VIH-1 no existe consenso acerca del nivel de SDF-1 presente en plasma. Por un lado, se han asociado bajos niveles de SDF-1 en plasma con un peor pronóstico de la infección [286], otros estudios han descrito niveles de SDF-1 elevados en estadios avanzados de la infección [287], mientras que otros autores proponen que la infección por VIH-1 genera un aumento en la producción de

SDF-1 y que en estadios avanzados de la infección se produce un descenso en el nivel de SDF-1 plasmático [288].

La presencia de algún polimorfismo en el gen que codifica para la quimiocina podría explicar la disparidad existente en los niveles plasmáticos de SDF-1 presentes en los individuos VIH-1 +. Se describió una variante genética, definida como una transición de una G a una A en la región 3' no traducida del gen de SDF-1, que se ha asociado a un retraso en el desarrollo de SIDA cuando se encuentra en homocigosis [289, 290]. El mecanismo de protección de esta mutación no está claro, pero una proposición es que esta alteración puede generar un aumento de la estabilidad o un procesamiento más eficaz del ARN mensajero, de manera que la mutación generaría una sobre-expresión del nivel de SDF-1, lo que estaría retrasando la aparición de las cepas X4/SI por competición de la quimiocina con el receptor CXCR4 o por internalización del mismo. Por el contrario, en otros estudios se ha asociado la presencia en homocigosis con una acelerada progresión de la infección, un aumento en la replicación viral o con un no-efecto sobre la progresión [291-293].

Al igual que con SDF-1, existe controversia acerca del papel que ejercen la CC-quimiocinas en la progresión de la infección por VIH-1. A pesar de que parece bien establecido que los niveles de RANTES en plasma de individuos infectados con VIH-1 son significativamente más elevados que los presentes en individuos sanos [294, 295], algunos autores no han encontrado ninguna relación entre los niveles plasmáticos de RANTES y la evolución de la infección [296, 297], mientras que otros sugieren que elevados niveles de RANTES se asocian con una rápida progresión [298]. En estudios realizados *ex vivo*, se ha descrito que las células T CD4 +, pero las CD8 +, de individuos infectados asintomáticos producen elevadas cantidades de CC-quimiocinas (MIP1- α , MIP1- β y RANTES) capaces de inhibir la replicación de VIH-1 [63, 299, 300]. Otros autores han mostrado que son las células T CD8 + de pacientes asintomáticos las que producen niveles significativamente más elevados de MIP1- α y MIP1- β , pero no de RANTES, que individuos seronegativos o pacientes con progresión rápida [300].

Todos estos antecedentes indican que la expresión de CCR5 y CXCR4 en la superficie celular es compleja y posiblemente está regulada por múltiples factores.

1.5.2.4 Otros factores

A parte de las CC y las CXC-quimiocinas existen otros factores solubles producidos por el propio huésped que también pueden afectar a la progresión de la infección. Uno de estos factores solubles del huésped que se ha descrito como modulador de la replicación viral son las β -defensinas, que son péptidos que protegen al huésped contra invasiones microbianas en la barrera de la mucosa donde se pueden expresar de manera constitutiva o inducida. El VIH-1 induce la expresión de las β -defensinas-2 y 3, estas defensinas inhiben la replicación viral mediante interacción directa con el virión y con la célula y causan una internalización de la expresión de CXCR4 [301, 302].

Varios estudios han sugerido que alelos específicos del loci HLA están asociados a diferentes tasas de progresión y susceptibilidad a la infección por VIH-1 [303-305].

Además de los factores virales y del huésped cabe mencionar también el efecto de los patógenos oportunistas. Se ha descrito que la coinfección con *Mycobacterium tuberculosis*, agente causal de la tuberculosis, aumenta la viremia plasmática asociada a un aumento de la activación celular [306]. También se sabe que el herpesvirus 6 humano inhibe la replicación de las cepas R5/NSI mediante la inducción de la producción de RANTES en tejido linfoide [307].

2 OBJETIVOS

El objetivo general de nuestro trabajo es determinar la influencia de las quimiocinas, los receptores de quimiocinas y de las citocinas en la progresión de la infección por VIH-1.

Los objetivos concretos de nuestro trabajo son los siguientes:

1. Determinar la relación existente *in vivo* entre los niveles plasmáticos de SDF-1, la expresión del receptor CXCR4 y la presencia de las cepas virales X4/SI.
2. Estudiar el papel ejercido por IL-7 en la evolución de la infección del VIH-1 y caracterizarlo como posible marcador de la progresión viral.
3. Caracterizar la interacción entre IL-7 y las CC-quimiocinas tanto *in vitro* como *in vivo*, y determinar su efecto sobre la progresión de la infección y la emergencia de las cepas X4/SI.

3 EFECTO DE LAS QUIMIOCINAS Y LAS CITOCINAS SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1

1. ***EFECTO DE LA CXC-QUIMIOCINA SDF-1 SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1:***

Stromal-cell-derived factor 1 prevents the emergence of the syncytium-inducing phenotype of HIV-1 *in vivo*.

2. ***EFECTO DE LA INTERLEUCINA 7 (IL-7) SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1:***

Interleukin-7 in Plasma Correlates with CD4 T-Cell Depletion and May Be Associated with Emergence of Syncytium-Inducing Variants in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals.

3. ***INTERACCIÓN ENTRE IL-7 Y RANTES Y SU EFECTO CONJUNTO SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1:***

Interleukin-7-Dependent Production of RANTES That Correlates with Human Immunodeficiency Virus Disease Progression.

RANTES (CCL5) and IL-7 promotes the selection of X4 HIV-1 variants *in vitro* (anexo).

3.1 EFECTO DE LA CXC-QUIMIOCINA SDF-1 SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1

Las cepas virales X4/SI aparecen en un alto porcentaje de los individuos infectados por el VIH-1. Se ha sugerido que estas cepas son más patogénicas que las R5/NSI y su aparición se correlaciona con una aceleración en la progresión de la infección. Sin embargo, hay individuos en los que estas cepas nunca llegan a aparecer. Hasta el momento no se conocen con exactitud cuales son los factores virales o del huésped que bien determinan la emergencia de dichas cepas o bien las mantienen selectivamente inhibidas.

Nosotros nos hemos centrado en el estudio de algunos de los factores del huésped que pueden estar influyendo directa o indirectamente en la progresión de la infección por el VIH-1 y que por lo tanto puedan estar determinando el fenotipo viral presente en un individuo.

En este primer capítulo hemos realizado un estudio correlativo, en el que se han evaluado los niveles plasmáticos de SDF-1 y se han determinado los fenotipos virales presentes en cada individuo, encontrando que altos niveles de SDF-1 en plasma se asocian con la presencia de cepas virales R5/NSI.

Stromal-cell-derived factor 1 prevents the emergence of the syncytium-inducing phenotype of HIV-1 in vivo

Anuska Llano, Jordi Barretina, Julià Blanco, Arantxa Gutiérrez, Bonaventura Clotet,
José A Esté.

ABSTRACT

In a correlative study, the mean plasma level of the chemokine stromal-cell-derived factor 1 (SDF-1) was lower in subjects with syncytium-inducing (SI) than in subjects with non-syncytium-inducing (NSI) HIV isolates, regardless of the CD4 cell count or when compared with HIV-negative individuals. Individuals with high SDF-1 had an 81% probability of having an NSI virus phenotype compared with individuals with lower SDF-1. Increased expression of SDF-1 may help explain why the more pathogenic SI HIV-1 variants do not appear in some individuals.

AIDS, September 2001, Vol. 15 No. 14, p. 1890-1892.

Primary HIV-1 infection usually starts with non-syncytium-inducing (NSI) variants that use the chemokine receptor CCR5 (R5 variants). Later during infection, syncytium-inducing (SI) HIV-1 variants, which use CXCR4 as co-receptor (X4 variants), emerge in half the cases. The SI phenotype has been associated with faster T cell decline, immune failure, and the onset of AIDS [308]. These findings suggest that the HIV-1 phenotype switch is a causal factor of AIDS [309], and that host and not viral factors drive and contain the emergence of SI/X4 variants. However, it remains unclear why SI/X4 variants emerge.

We have shown that a CXCR4 antagonist, in cell culture infections, prevents the emergence of SI HIV-1 variants [310]. A polymorphism in the promoter region of the stromal-cell-derived factor 1 (SDF-1) gene has been associated with an effect on disease progression [289, 311], and the constitutive expression of SDF-1 has been thought to be a plausible explanation for the control of HIV-1 X4 transmission and propagation [98, 312]. SDF-1, the natural ligand of CXCR4, may thus have an in-vivo effect on the availability of CXCR4 for HIV-1.

Plasma samples from 42 HIV-negative volunteers (control group) and 172 HIV-positive individuals were evaluated for the levels of SDF-1 in plasma by an in-house enzyme-linked immunosorbent assay performed as described [286, 313]. The expression of CXCR4 in the corresponding peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was followed by flow cytometry in HIV-negative or an available subset of HIV-positive individuals.

The mean SDF-1 concentration in the control group was 419 ± 282 pg/ml whereas the mean CXCR4 expression was $90 \pm 4\%$ of total lymphocytes with a mean fluorescence intensity (MFI) of 75 ± 18 . The level of SDF-1 in the plasma significantly correlated with the percentage of PBMC expressing CXCR4 ($P < 0.05$), although the association was weak ($r = -0.34$).

Standard virological and immunological markers were evaluated in the HIV-1 positive group. An inverse correlation was found between the CD4 cell count and viral load ($r = -0.58$, $P < 0.01$). The mean CD4 and CD8 cell counts were 776 ± 551 and 398 ± 434 , respectively. The mean viral load was 5.25 ± 5.47 -log₁₀ copies/ml.

PBMC from each patient were co-cultured with PBMC from HIV-negative donors to isolate virus. HIV-1 p24 antigen-containing supernatant from each co-culture was then used for evaluation of the SI phenotype in MT-2 cells. A total of 79 virus samples

tested as SI and 93 as NSI. Patients from these two groups had significantly different ($P < 0.001$) mean CD4 and CD8 cell counts (150 ± 178 and 320 ± 223 CD4 cells/ μ l and 663 ± 452 and 849 ± 597 CD8 cells/ μ l for the SI and NSI groups, respectively) despite a little (less than 0.5 log units) but significant difference in viral load (5.45 ± 5.58 and 5.01 ± 5.2 for the SI and NSI groups, respectively).

There were no significant differences in SDF-1 values between the control group and the HIV-positive group (mean SDF-1 419 ± 282 and 398 ± 434 pg/ml, respectively). The group of SI samples had a significantly lower mean SDF-1 ($P < 0.05$) than the NSI group (319 ± 206 and 467 ± 549 pg/ml for the SI and NSI groups, respectively). Fig.1a shows the SDF-1 levels of HIV-positive individuals when plotted in groups according to the CD4 cell count and the SI and NSI phenotype. The NSI subsets always had higher SDF-1 levels than the SI subsets, regardless of the CD4 cell count. However, there were no significant differences between mean SDF-1 concentrations among the NSI subsets or among the SI subsets in the three CD4 cell groups. The mean SDF-1 levels thus remained unchanged despite immunological failure (CD4 cell count < 200 cells/ μ l), but were consistently higher in the NSI subset. Nevertheless, the NSI subsets showed a relatively higher SD, which may reflect the existence of NSI individuals with low SDF-1 that have not yet converted to the SI phenotype. Consistently, individuals with CD4 cell counts lower than 200 cells/ μ l had a 66% probability of having SI variants. This probability decreased to 24 or 17% when the CD4 cell count ranged from 200 to 500 cells/ μ l or over 500 cells/ μ l, respectively.

When HIV-positive individuals were grouped according to SDF-1 levels, of the 26 HIV-positive individuals with high (> 570 pg/ml) SDF-1, 21 (81%) had the NSI and five (19%) the SI phenotype (Fig.1b). The percentage of SI individuals increased to 43 and 56% in the intermediate (SDF-1 250-570 pg/ml) and low (SDF-1 < 250 pg/ml) groups, respectively. When we evaluated the expression of CXCR4 in PBMC from a subset of these high SDF-1 individuals (SDF-1 concentration from the subset: 1671 ± 1338 pg/ml, $n = 8$), a significant ($P < 0.05$) lower mean CXCR4 expression was found (49 ± 24 MFI) when compared with a subset of individuals with low SDF-1 (SDF-1 < 250 pg/ml, CXCR4 MFI 71 ± 39 , $n = 13$) or intermediate SDF-1 (between 250 and 570 pg/ml; CXCR4 MFI 85 ± 50 , $n = 15$).

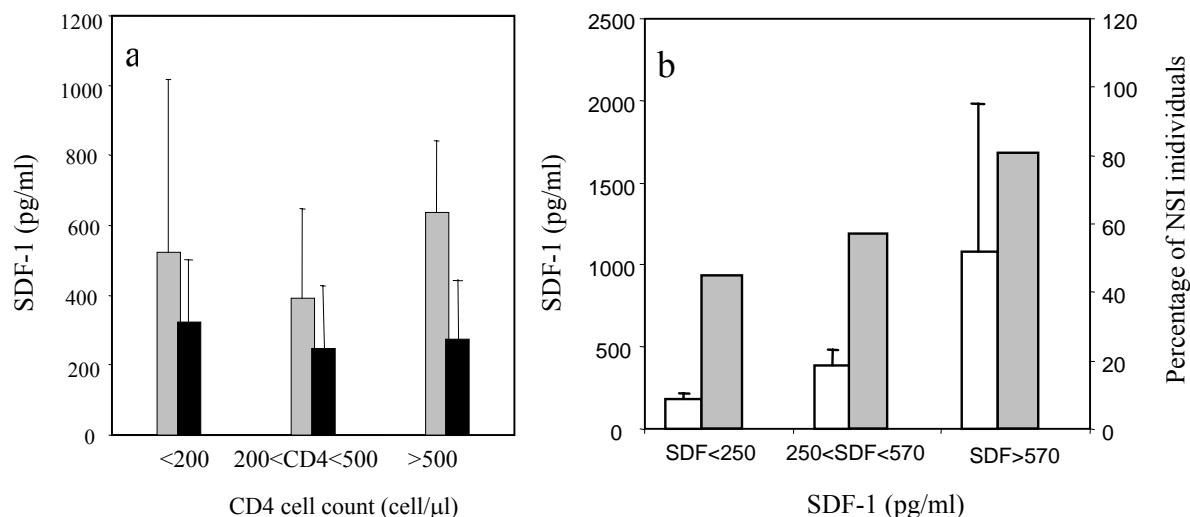


Fig. 1. Expression of stromal-cell-derived factor 1 in plasma and CXCR4 in peripheral blood mononuclear cells of HIV-positive individuals (a) according to CD4 cell count and HIV-1 phenotype. Virus isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was evaluated for syncytium-inducing/non-syncytium-inducing (SI/NSI) phenotype in MT-2 cells. Black and grey bars for stromal-cell-derived factor 1 (SDF-1) represent the mean \pm SD for NSI and SI subsets, respectively. (b) The proportion of individuals who carried HIV-1 variants of NSI phenotype (grey bars) is plotted according to the expression of SDF-1 in the plasma (white bars) as low (< 250 pg/ml), intermediate (250-570 pg/ml) and high (> 570 pg/ml) concentrations.

Our data show a significant number of individuals with NSI isolates having less than 200 CD4 cells/ μ l ($n = 26$). In the NSI subset of less than 200 CD4 cells/ μ l ($n = 26$), 30% (eight patients) had SDF-1 levels greater than 570 pg/ml, whereas the remaining 70% (18 patients) had lower SDF-1. Conversely, in the SI subset of less than 200 CD4 cells/ μ l, only two patients (4%, $n = 51$) had high SDF-1 levels. We have also shown that high SDF-1 in the plasma modified CXCR4 expression in PBMC, supporting the hypothesis that high SDF-1 will limit the emergence of the SI phenotype, and partly explaining why the SI phenotype does not develop in all patients who progress to AIDS.

SDF-1 levels remain unchanged over time in healthy individuals [286]. Our results show that the SDF-1 level in the plasma is an independent factor of CD4 cell count, viral load, immunological status or presence of the SDF-1 3'A variant (data not shown).

Our data suggest that high SDF-1 levels in the plasma will reflect a predisposition for HIV to retain the NSI phenotype *in vivo*.

3.2 EFECTO DE LA INTERLEUCINA-7 (IL-7) SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

La progresión de la infección por el VIH-1 se caracteriza por una pérdida progresiva de células T CD4 durante la fase crónica. Con la aparición de las variantes X4/SI, dicha depleción celular es más rápida y acusada. Por lo tanto otro punto importante en el estudio de la progresión viral es conocer la relación existente entre los factores que regulan la dinámica de las células T en el huésped con la patogénesis viral.

La citocina IL-7 es clave en el desarrollo de células T y además *in vitro* induce la sobre expresión del correceptor CXCR4 en PBMCs. Todo esto nos hace pensar que IL-7 puede estar jugando un papel importante en la progresión de la infección y en la emergencia de las variantes X4/SI.

En este segundo trabajo nos hemos centrado en el estudio de IL-7 y su relación con el fenotipo viral presente en los individuos infectados y con la progresión de la infección. Hemos descrito las diferencias significativas en los niveles plasmáticos de IL-7 entre individuos que presentan cepas R5/NSI o cepas X4/SI, así como la correlación inversa entre los niveles plasmáticos de IL-7 y el número de células T CD4 +, lo que hace que esta citocina pueda ser considerada como un posible marcador de la progresión de la infección por el VIH-1.

Interleukin-7 in Plasma Correlates with CD4 T-Cell Depletion and May Be Associated with Emergence of Syncytium-Inducing Variants in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals

Anuska Llano, Jordi Barretina, Arantxa Gutiérrez, Julià Blanco, Cecilia Cabrera, Bonaventura Clotet, and José A. Esté.

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) primary infection is characterized by the use of CCR5 as a coreceptor for viral entry, which is associated with the non-syncytium-inducing (NSI) phenotype in lymphoid cells. Syncytium-inducing (SI) variants of HIV-1 appear in advanced stages of HIV-1 infection and are characterized by the use of CXCR4 as a coreceptor. The emergence of SI variants is accompanied by a rapid decrease in the number of T cells. However, it is unclear why SI variants emerge and what factors trigger the evolution of HIV from R5 to X4 variants. Interleukin-7 (IL-7), a cytokine produced by stromal cells of the thymus and bone marrow and by keratinocytes, is known to play a key role in T-cell development. We evaluated IL-7 levels in plasma of healthy donors and HIV-positive patients and found significantly higher levels in HIV-positive patients. There was a negative correlation between circulating IL-7 levels and CD4⁺ T-cell count in HIV-positive patients ($r = -0.621$; $P < 0.001$), suggesting that IL-7 may be involved in HIV-induced T-cell depletion and disease progression. IL-7 levels were higher in individuals who harbored SI variants and who had progressed to having CD4 cell counts of lower than 200 cells/ μ l than in individuals with NSI variants at a similar stage of disease. IL-7 induced T-cell proliferation and up-regulated CXCR4 expression in peripheral blood mononuclear cells in vitro. Taken together, our results suggest a role for IL-7 in the maintenance of T-cell regeneration and depletion by HIV in infected individuals and a possible relationship between IL-7 levels and the emergence of SI variants.

Journal of Virology, November 2001, Vol. 75 No. 21, p. 10319-10325.

INTRODUCTION

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) primary infection is characterized by the presence of non-syncytium-inducing (NSI) variants with low replication kinetics, capable of infecting macrophages and CD4⁺ memory T cells, that use the receptor CCR5 as a coreceptor for viral entry [314]. Later, as the disease progresses, the syncytium-inducing (SI) variants emerge [315]. SI variants are characterized by high replication kinetics in vitro and the capacity to infect naive CD4⁺ T cells by using CXCR4 as a coreceptor [125, 316]. The emergence of SI variants is accompanied by an accelerated decrease of CD4⁺ cell count, rapid disease progression, and the establishment of AIDS [308, 309]. However, it remains unclear why SI variants emerge and how this relates to CXCR4 expression in vivo. It is probable that multiple host factors affect HIV-1 coreceptor levels or function; interleukin-4 (IL-4) has been shown to decrease the expression of CCR5 and increase CXCR4 expression, favouring the propagation of X4 strains [264]. Other factors that may induce overexpression of CXCR4 or block the replication of R5-NSI variants may favour the selection of X4-SI HIV variants and could determine when SI variants will arise.

During clinical latency, HIV-1 replicates, inducing the destruction of CD4⁺ T cells and immature cells in the bone marrow, thymus, and lymph nodes, where T cells are produced [317]. The immune system responds by inducing the proliferation of T cells, and hence the CD4⁺ T-cell number is maintained relatively constant during this stage of the infection [81, 87, 223, 318]. The development of AIDS was thought to be caused by exhaustion of the immune system. That is, at a certain point, the immune system cannot maintain the high rate of T-cell production necessary to compensate for HIV-induced T-cell depletion [319]. Nevertheless, HIV-1 infection destroys T-cell supplies in the periphery by direct infection and killing of cells and through hyperactivation of the immune system [320], suggesting that it may be not exhaustion but rather homeostatic inability, along with gradual wasting of T-cell supplies, that leads to T-lymphocyte depletion in HIV-1 infection [321, 322].

It is known that cytokines play an important role in HIV-1 infection. However, determination of their function in viral dynamics, replication, and disease progression is

very complex, because different cytokines have opposite effects on viral replication [63, 262, 264, 299, 323]. IL-7 is a cytokine produced by stromal cells of the thymus and the bone marrow and by keratinocytes [181, 188, 324, 325]. IL-7 has recognized functions in B-cell lymphopoiesis [326] and has been shown to take part in the differentiation of thymocytes into mature T cells that will leave the thymus and move to the periphery [201, 327]. Similarly, IL-7 contributes to the development, proliferation, and homeostatic maintenance of T cells [172, 186, 187, 192, 199]. IL-7 is known to enhance viral replication [328, 329] and may induce CXCR4 expression on resting CD4⁺ memory T cells in vitro [195]. IL-7 production by human stromal cells is induced by IL-1 and by tumor necrosis factor alpha [330], which have been found to also enhance HIV production in vitro [262].

The role of IL-7 as a marker of disease progression has not been well established. Napolitano et al. [173] have shown that increased circulating levels of IL-7 are strongly associated with CD4⁺ T lymphopenia in HIV-1 disease. Nevertheless, the importance of these results to the understanding of HIV pathogenesis requires further confirmation. Furthermore, we need to assess the effect of IL-7 on the evolution of HIV in vivo.

We have evaluated IL-7 levels in plasma of healthy individuals and HIV-1-infected patients and correlated their expression in HIV-positive individuals to CD4⁺ T-cell depletion, disease progression, and emergence of the SI phenotype.

MATERIALS AND METHODS

Patient and donor samples. Blood samples from healthy donors and from HIV-positive individuals were collected from our hospital blood bank and from the HIV unit, respectively. Samples were collected with informed consent and processed immediately after collection. Briefly, 10 to 20 ml of whole blood was collected in EDTA-Vacutainer tubes (Becton Dickinson [BD], Madrid, Spain). Plasma was isolated from each sample after centrifugation of blood samples at $400 \times g$ for 10 min and was immediately cryopreserved and stored at -80°C until use. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by separation on Ficoll-Hypaque density gradient and either used immediately in fractional studies or cryopreserved in liquid

nitrogen for further determinations. Some patients were enrolled in clinical trials with monotherapy (zidovudine [AZT] or dideoxyinosine [ddI]) or dual therapy (AZT plus dideoxycytosine, AZT plus ddI, or AZT plus lamivudine [3TC]) and were later included in triple antiretroviral therapy. These patients usually initiated treatment at a late stage of disease and the treatment options were not efficacious, increasing the possibility selecting SI variants.

T-lymphocyte proliferation. Fresh PBMC (10^6) from two healthy donors were cultured with different antigens as follows: medium control, phytohemagglutinin (PHA) (4 ng/ml) plus IL-2 (4 ng/ml) as a positive control, PHA plus IL-2 plus IL-7 (10 ng/ml), and IL-7 alone (1 and 10 ng/ml). The cultures were maintained at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 5 days. [³H]thymidine was then added to each well and incubated overnight. The cells were harvested, and the amount of incorporated [³H]thymidine was measured in a liquid scintillation counter (1450 Microbeta; Wallac, Turku, Finland). The stimulation index was calculated by dividing the counts per minute of PBMC after specific stimulation by the counts per minute of PBMC incubated with medium control. A stimulation index of >5 was considered to be a positive response in this assay.

CXCR4 expression. Fresh PBMC from healthy donors were cultured with IL-7 at different concentrations and with stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) (500 ng/ml) or medium alone as controls. After 5 days of incubation, PBMC were collected and CXCR4 and CD4 expression was analysed by flow cytometry as described below.

Detection of IL-7 and RANTES levels in plasma. Plasma IL-7 levels were determined by an ultrasensitive commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quantikine HS Human IL-7 Immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, Minn.) according to the manufacturer instructions. RANTES levels were measured by a commercial ELISA (Endogen, Barcelona, Spain).

Viral isolation and phenotype in MT-2 cells. PBMC (10×10^6) from HIV-infected individuals were cocultured with PBMC (5×10^6) from healthy donors stimulated with 3 µg of PHA per ml and 25 IU of IL-2 per ml. Viral replication was quantified by evaluation of antigen p24 production in coculture supernatants, using a

commercial ELISA (Innogenetics, Madrid, Spain). Coculture supernatants that were positive for p24 were collected after centrifugation at $400 \times g$ for 5 min, and the SI or NSI phenotype was determined in MT-2 cells as was previously described [310]. For simplicity, individuals from whom SI or NSI variants were isolated are referred to hereafter as SI or NSI individuals, respectively.

Flow cytometry. CD4⁺ and CXCR4⁺ T-cell subpopulations were determined by flow cytometry analysis. Aliquots of 50 μ l of whole-blood samples were stained with monoclonal antibodies CD4-PerCP and CXCR4-PE (BD) for 15 min, and then the samples were washed twice in phosphate-buffered saline, resuspended in phosphate-buffered saline containing 1% formaldehyde, and analysed in a FACScalibur flow cytometer (BD).

Measurement of viral load. Plasma HIV RNA levels were determined using a commercial assay (Amplicor VIH-1 Monitor Assay; Roche Molecular Systems, Somerville, N.J.) according to the manufacturer's instructions. Undetectable levels of RNA in plasma were considered equivalent to 200 copies/ml.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using parametric and nonparametric tests (Spearman r and Mann-Whitney U tests). P values of <0.05 were considered to have statistical significance. Data were analysed using the SPSS version 9.0 software package.

RESULTS

T-lymphocyte proliferation. IL-7 has been described as an indispensable factor for T-cell development [187]. As can be observed in Fig. 1, IL-7 induced the proliferation of T cells at 10 ng/ml (stimulation index = 11) and boosted PHA- and IL-2-induced cell proliferation activity in vitro, confirming a known property of this cytokine. Our data support previous studies in which IL-7 has been described as an important agent in T-cell proliferation [192].

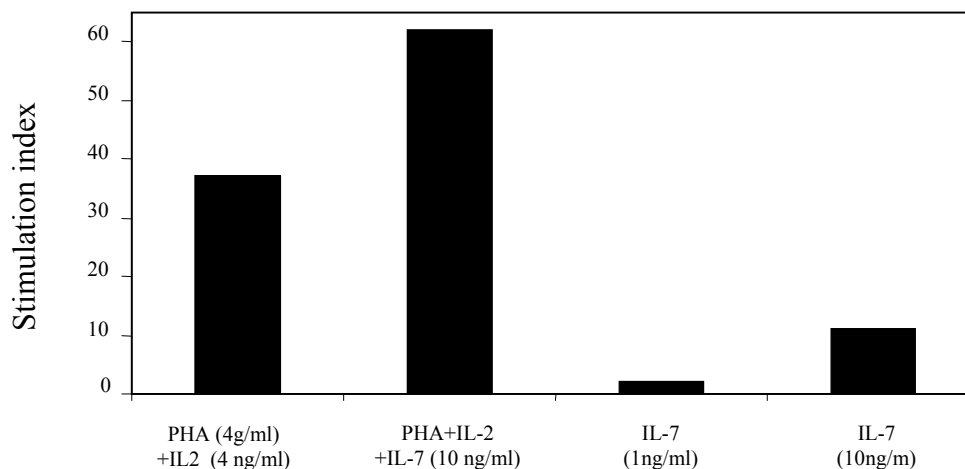


FIG. 1. Lymphocyte proliferative response to PHA (4 μ g/ml) plus IL-2 (4 ng/ml), PHA plus IL-2 plus IL-7 (10 ng/ml), and IL-7 alone (1 or 10 ng/ml). The stimulation index was calculated by dividing the counts per minute of PBMC in stimulated wells by the counts per minute of PBMC in medium alone. The results are from a representative experiment of two performed.

IL-7 up-regulates CXCR4 expression in vitro To determine if IL-7 modulates CXCR4 expression in T cells, we incubated PBMC of two uninfected donors for 5 days with different concentrations of this cytokine. IL-7 up-regulated the expression of the CXCR4 receptor in a dose-dependent manner, whereas SDF-1, the natural ligand of CXCR4, down-regulated CXCR4 expression (Fig. 2A). Although IL-7 caused the greatest up-regulation of CXCR4 expression at 100 ng/ml (Fig. 2B), 0.1 ng/ml was sufficient to up-regulate CXCR4 expression in vitro. However, CD4 expression was not modified by IL-7 (Fig. 2B). This finding suggests a possible role of IL-7 in selection of SI variants in HIV-positive patients with high IL-7 levels in plasma through up-regulation of CXCR4.

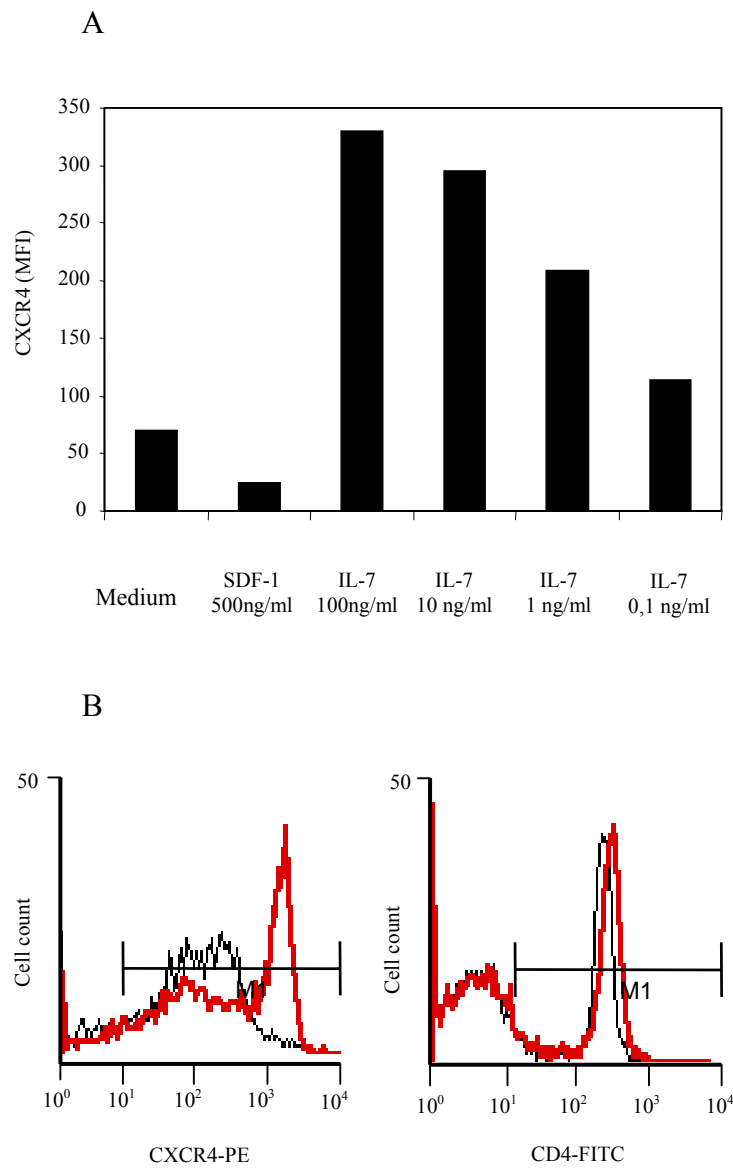


FIG. 2. (A) Effect of IL-7 and SDF-1 on expression of CXCR4 in PBMC. IL-7 was evaluated at concentrations of 100, 10, 1, and 0.1 ng/ml. SDF-1 was evaluated at 500 ng/ml. CXCR4 expression is represented as mean fluorescence intensity (MFI). (B) Comparison of CXCR4 and CD4 expression in PBMC from a healthy donor, either stimulated with 100 ng of IL-7 per ml (red lines) or without stimulation (black lines). The results are from a representative experiment of two performed.

IL-7 levels in HIV-1-infected patients and healthy donors. IL-7 levels in 49 plasma samples from healthy volunteers and in 131 plasma samples from HIV-positive patients were analysed in a cross-sectional study. The HIV-positive group had significantly ($P < 0.001$) higher levels of IL-7 than the healthy donor group (Fig. 3). The IL-7 levels measured in plasma were 3.6 ± 3.05 and 9.4 ± 5.7 pg/ml (means and standard deviations [SD]) for the healthy donor and HIV-positive groups, respectively. Other immunological and virological characteristics were evaluated for HIV-positive patients, with the findings that the means and SD of CD4 and CD8 T-cell counts and the \log_{10} viral load were 243 ± 221 cells/ μ l, 796 ± 586 cells/ μ l, and 5.26 ± 5.5 copies/ml, respectively. RANTES levels were evaluated for healthy donors (12.7 ± 16.1 ng/ml) and HIV-positive patients (27.7 ± 21.2 ng/ml); the differences between the groups were significant ($P < 0.001$), as previously described [295].

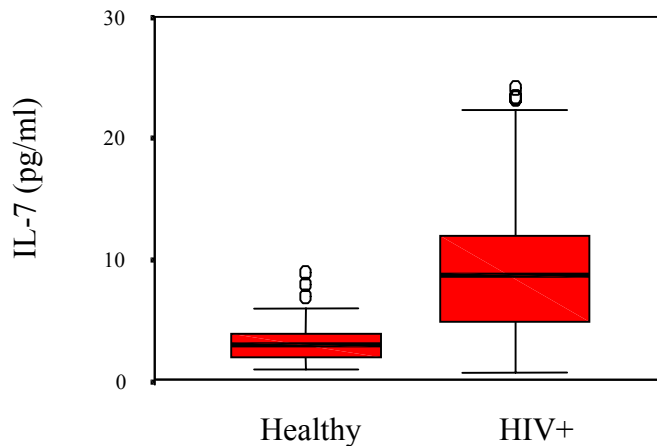


FIG. 3. Expression of IL-7 levels in plasma of healthy donors and HIV-positive patients. Results are depicted in box plot diagrams, where the box represents the 25th and 75th quartiles and the line represents the median value. Bars indicate 5th and 95th percentiles, and circles indicate atypical values. The means \pm SD of IL-7 levels in plasma for the healthy donor group and the HIV-positive patient group were 3.6 ± 3.05 and 9.4 ± 5.7 pg/ml, respectively.

IL-7 as a marker of disease progression. It has been recently shown that increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion [173]. Similarly, we have found a clear negative correlation between IL-7 levels in plasma and absolute CD4⁺ T-cell counts in HIV-positive individuals ($r = -0.621$; $P < 0.001$) (Fig.

4A). A similar but weaker correlation was found between IL-7 levels and CD8⁺ T-cell levels ($r = -0.406$; $P < 0.001$) (Fig. 4B). When we grouped HIV-positive individuals according to their immunological status (that is, stratifying HIV-positive patients according to their CD4⁺ T-cell count) (Fig. 4C), the subset with <200 CD4 cells/ μl had significantly ($P < 0.001$) higher levels of IL-7 in plasma (12.26 ± 5.86 pg/ml) than the subsets with CD4 cell counts between 200 and 500 and above 500 cells/ μl (6.67 ± 4.10 and 5.69 ± 2.75 pg/ml, respectively). These data suggest that CD4⁺ T-cell depletion, caused by HIV-1 replication, may alter IL-7 levels in plasma as a mean to regenerate T-cell numbers.

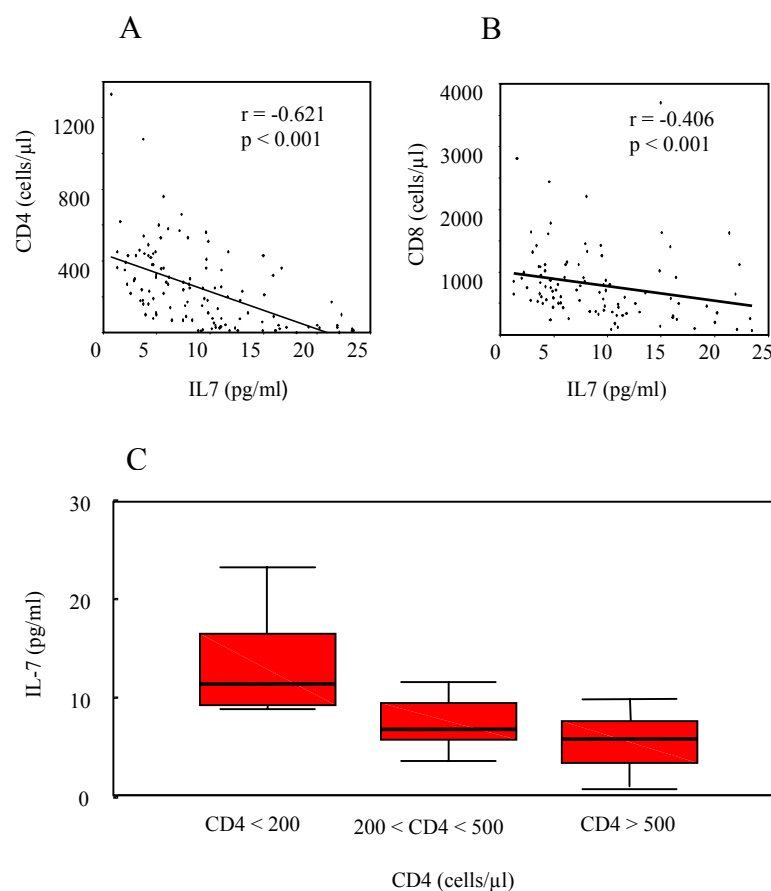


FIG. 4. (A and B) Correlation between IL-7 levels and CD4 T-cell count ($r = -0.621$) (A) and between IL-7 levels and CD8 T-cell count ($r = -0.406$) (B) in HIV-positive patients. (C) Levels of IL-7 in plasma of HIV-positive patients stratified according to CD4 T-cell count in three subsets, i.e., <200 , 200 to 500, and >500 CD4 cells/ μl . The means \pm SD of IL-7 levels in plasma for the three subsets were 12.26 ± 5.9 , 6.67 ± 4.1 , and 5.69 ± 2.7 pg/ml, respectively. Subsets are depicted in box plots as described for Fig. 3.

IL-7 as a marker for the emergence of the SI phenotype. PBMC from HIV-positive individuals were cocultured with PBMC from healthy donors to isolate virus. HIV-1 p24 antigen-containing supernatant from each coculture was then used for evaluation of the SI phenotype in MT-2 cells. Fifty-six samples tested as SI, and 75 samples tested as NSI. When we analysed IL-7 levels in the HIV-positive group separated into groups that harboured SI and NSI viruses, we found significantly ($P < 0.001$) higher levels of IL-7 in the SI group (13 ± 6 pg/ml) than in the NSI group (7 ± 4 pg/ml) (Table 1; Fig. 5A). Significant differences were also found between the SI group and the NSI group in $CD4^+$ T-cell count, $CD8^+$ T-cell count, and viral load, suggesting a more advanced stage of disease in the SI group than in the NSI group. There were no significant differences in RANTES levels between the groups.

Table 1. Immunological and virological variables for the patients in the NSI and SI groups^a

Group	n	IL-7 (pg/ml)	CD4 (cells/ μ l)	CD8 (cells/ μ l)	RANTES (ng/ml)	Viral Load (Log ₁₀)
SI	56	13.04 ± 5.9	125 ± 155	619 ± 420	29.3 ± 19.3	5.49 ± 5.6
NSI	75	6.7 ± 3.6	329 ± 223	909 ± 649	26.5 ± 22.7	4.9 ± 5.2
<i>P</i> ^b		< 0.001	< 0.001	< 0.05	>0.1	< 0.001

^a Results are expressed as means and SD.

^b Statistical significance (Mann-Whitney U test) between SI and NSI groups.

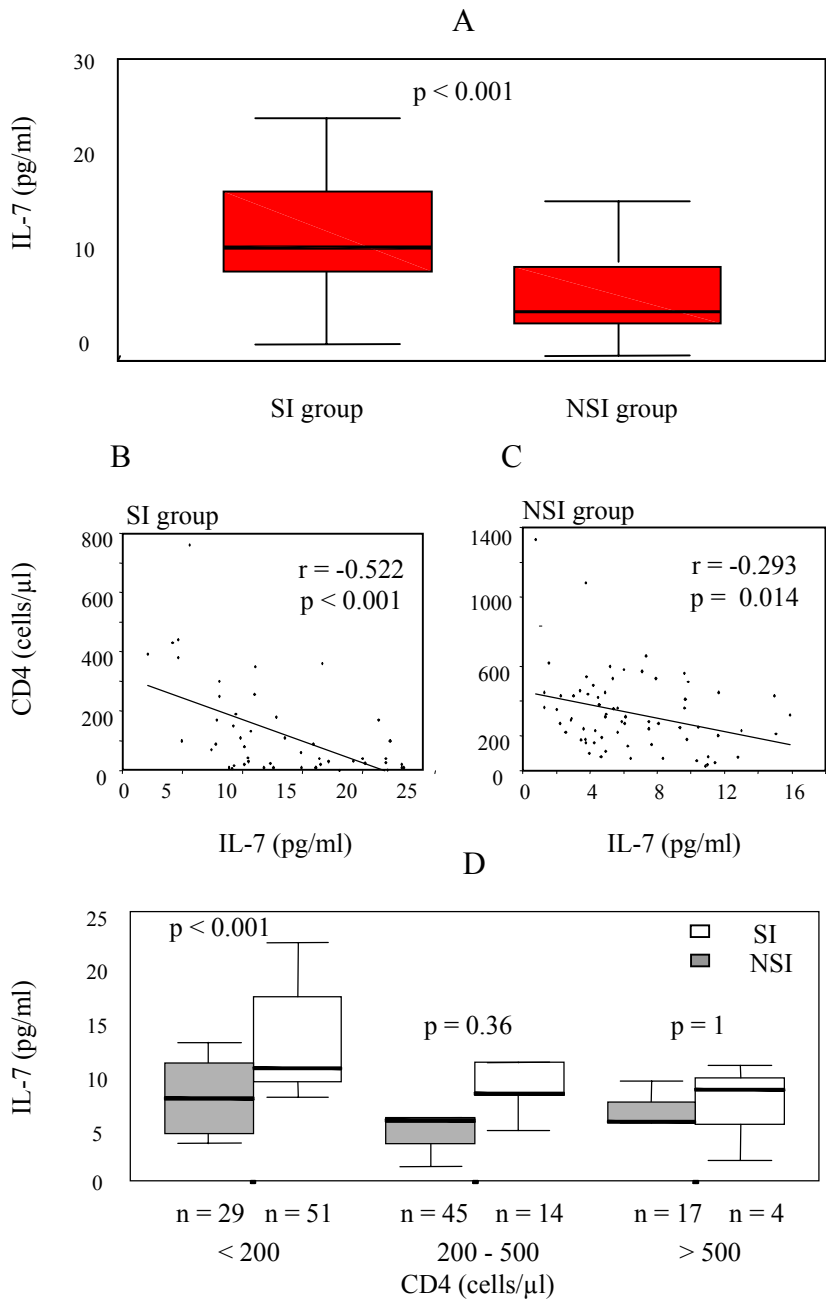


FIG. 5. (A) IL-7 levels in plasma in HIV-positive patients separated according to the viral phenotype (SI or NSI). IL-7 levels are depicted in a box plot as described for Fig. 3. (B and C) Linear regression between IL-7 levels and CD4 T-cell counts in patients of the SI group ($r = -0.522$) (B) and the NSI group ($r = -0.293$) (C). (D) Levels of IL-7 in plasma of HIV-positive individuals of the SI and NSI groups stratified according to CD4 T-cell count in three subsets as described for Fig. 4C.

We correlated CD4⁺ T-cell counts with IL-7 levels separately in the SI and NSI groups, finding a higher correlation between the two parameters in the SI group ($r = -0.522$; $P < 0.001$) than in the NSI group ($r = -0.293$; $P = 0.014$) (Fig. 5B and C).

Since HIV disease may progress in the absence of the SI phenotype, it was important to compare IL-7 levels between individuals in the NSI or SI group in a similar stage of disease. Thus, we stratified the individuals of both groups according to their CD4 T-cell count (Fig. 5D). The NSI group did not show significant differences in IL-7 levels in the three subsets of CD4 levels (7.3 ± 3.2 , 6.3 ± 4 , and 5.7 ± 2.9 pg/ml). In contrast, in the SI group, we found significant ($P < 0.001$) higher levels of IL-7 (14.6 ± 5.4 pg/ml) in the subset with the lower CD4 cell count (<200 cells/ μ l) than in the two other subsets (7.8 ± 4.5 and $5.6 \pm$ pg/ml, respectively). It is interesting that the SI subset with a CD4 cell level of <200 cells/ μ l showed significantly ($P < 0.001$) higher levels of IL-7 than the NSI subset with a similar CD4 cell count, whereas there were no significant differences in IL-7 levels between the NSI and the SI groups when the CD4 cell count was above 200 cells/ μ l.

High IL-7 levels are associated with SI variants. To characterize the IL-7 level in plasma as a marker of the emergence of the SI phenotype, we stratified patients according to the IL-7 level in plasma (Fig. 6) The results showed that 89% of individuals with more than 13 pg of IL-7 per ml belonged to the SI group and that this decreased to 32 and 22% when IL-7 levels were below 13 and 2 pg/ml, respectively. The 78% of the individuals with IL-7 levels below 2 pg/ml belonged to the NSI group. As the IL-7 level increased (2 to 13 pg/ml and >13 pg/ml), the proportion of NSI individuals was lower (68 and 11%, respectively). Thus, the IL-7 level in plasma may be a marker for the emergence of the SI phenotype.

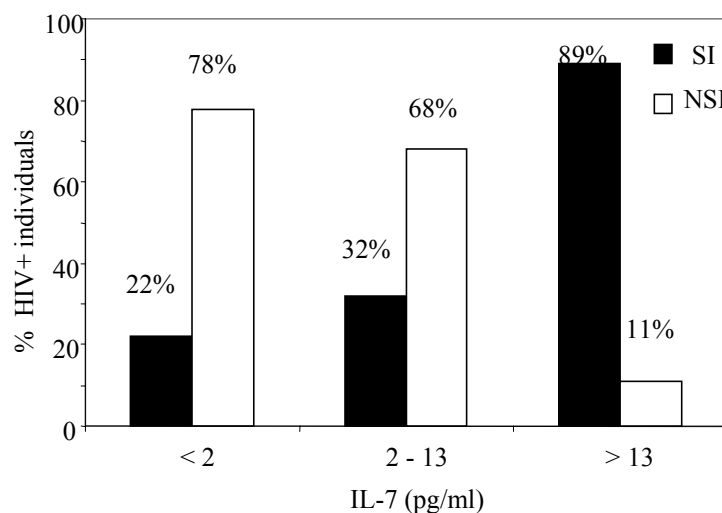


FIG. 6. Percentages of individuals belonging to the SI and NSI groups, stratified according to the levels of IL-7 in plasma in three subsets (<2 , 2 to 13, and >13 pg/ml).

Longitudinal study. A longitudinal study was designed to evaluate changes in IL-7 levels with respect to standard virological and immunological markers of HIV-1 disease (viral load and CD4 T cell count) and to better characterize IL-7 as a marker of disease progression. Frozen plasma samples that were collected from five HIV-positive individuals for a period of 2 to 7 years were used to evaluate IL-7 levels in plasma. Patients were selected on the basis of availability of plasma samples taken at least every 3 months for the period of the study, in which IL-7 levels and viral load could be evaluated. All patients had received antiretroviral therapy during the course of the disease; therefore, CD4⁺ T-cell count, viral load, and IL-7 levels in plasma were expected to be influenced by drug treatment. In Fig. 7, we show IL-7, CD4⁺ T-cell count, and viral load trends for two patients as a representative sample of the longitudinal study.

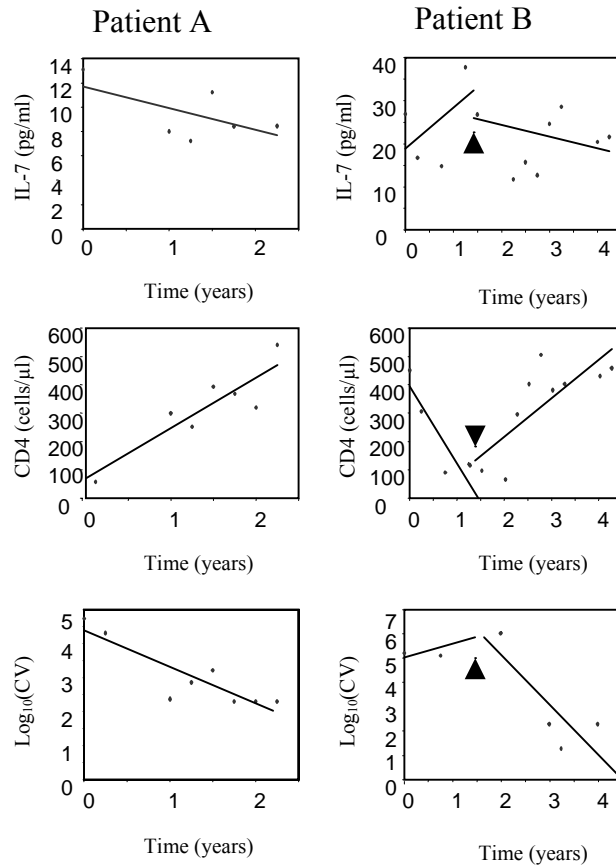


FIG. 7. IL-7 levels, CD4 T-cell counts, and \log_{10} viral load in two patients along the course of the longitudinal study. The lines represent the trends calculated by linear regression.

In patient A, time zero corresponds to the initiation of treatment (AZT plus ddI plus 3TC plus indinavir). In patient B, time zero corresponds to the initiation of the first treatment (AZT plus 3TC plus d4T), which was continued for 2 years; the second treatment (AZT plus 3TC plus d4T plus indinavir) (time of initiation is shown by the arrowhead) covers the following 2 years. In patient A, a decrease in IL-7 level corresponded to an increase in CD4 T-cell count and to a decrease in viral load, indicating an effective response to the treatment with indinavir. The data for patient B revealed biphasic trends in the measured parameters; that is, this patient did not respond satisfactorily to the first treatment with double therapy (AZT plus 3TC), which caused an initial increase in IL-7 level and in viral load and a decrease in CD4 T-cell count. After 2 years the patient began receiving triple antiretroviral therapy, which caused a decrease in viral load and in IL-7 levels and an increase in CD4 T-cell count. Taken together, these data suggest that the plasma IL-7 level may be an effective marker of disease progression in HIV-positive patients.

DISCUSSION

In our cross-sectional study, we have found a significant difference in plasma IL-7 levels between HIV-negative donors and HIV-positive patients. Confirming recently published results [172, 173], we have found a negative correlation between IL-7 levels in plasma and CD4⁺ T-cell counts in HIV-positive patients ($r = -0.621$), suggesting that HIV infection may mask the proliferative effect of IL-7 (Fig. 1) [173].

In addition, a longitudinal study with HIV-positive patients showed that variations in CD4⁺ T-cell counts caused by the response to treatment were accompanied by similar variations in plasma IL-7 levels. These data support the idea of IL-7 as an indicator of CD4⁺ T-cell depletion and consequently as a marker of disease progression.

There is controversy about the origin of the T-cell renewal that compensates for T-cell depletion in HIV infection. Some evidence points to a persistent immune activation induced by viral replication that causes proliferation of existing naive CD4⁺ T cells in the periphery [322]. Other evidence points to thymic output of new naive T cells [201, 204] caused by a homeostatic response to T-cell depletion. Previous observations have associated abundant thymic tissue in HIV-positive individuals with increased numbers of naive T cells [202, 204]. Since IL-7 is produced by stromal cells of the thymus and is

implicated in thymocyte maturation, our data may indicate a homeostatic response that is mediated by IL-7. Alternatively, IL-7 produced by extrathymic tissue or induced by other factors (e.g., tumor necrosis factor alpha) could explain the observations made here. The fact that some individuals with <200 CD4 cells/ μ l have low IL-7 levels in plasma may support the latter hypothesis.

Our results suggest a relationship between IL-7 levels in plasma and HIV phenotype, since HIV-positive patients with high IL-7 levels had a high probability (0.89) of having the SI phenotype. It is unclear why individuals with low CD4 cell counts of the NSI phenotype have significantly lower IL-7 levels than those individuals with SI variants. If IL-7 increases in response to CD4 cell depletion, NSI individuals with CD4 cell counts of <200 / μ l should have plasma IL-7 levels similar to those of SI individuals in the same immunological status. One possible explanation is that NSI and SI variants may have different tropisms for cell subpopulations that produce IL-7 [331-333]. In addition, HIV-1 may induce a collapse of the regulatory signals that control CD4 cell number, allowing for IL-7 production without a concomitant effect on CD4 proliferation. Our data indicate that, unlike CD4 cell counts, IL-7 levels could discriminate between those individuals with the NSI phenotype and those with the SI phenotype in that subset of individuals with advanced disease progression.

IL-7 may be considered a causal factor for the emergence of the SI variants, together with other factors such as SDF-1. We have shown that individuals with high levels of SDF-1 were at a lower risk of developing HIV variants of the SI phenotype [334].

The immune system may respond to CD4 T-cell depletion caused by HIV replication by inducing the proliferation of circulating naive CD4 T cells and by producing homeostatic signals (such as IL-7) that induce production of new naive CD4 T cells. However, at a certain time during infection, the immune system may not be able to respond to the signals induced by decreased CD4 T-cell number, which in turn act on existing CD4 cells. Consequently, higher IL-7 levels may induce the overexpression of CXCR4 (Fig. 2A), allowing SI variants to grow. High SDF-1 levels could maintain lower expression of CXCR4 and keep SI variants at bay, and at the same time, high SDF-1 levels could block the effect of IL-7 and/or other factors that affect CXCR4 expression. This hypothesis could help to explain the correlation between the emergence of SI variants and the rapid CD4 T-cell decline and why SI variants appear late after infection. The effect of IL-7 on CXCR4 expression could be masked by the same

principle governing IL-7 and CD4 cell count: it is possible that during HIV-1 infection, increased IL-7 could lead to the selective destruction of CXCR4-expressing cells. The regulation of CXCR4 expression appears to be governed by multiple factors that may be active at any given time and that require further study.

In conclusion, our observations on the increased production of IL-7 in HIV positive individuals and its correlation to T-cell depletion suggest that IL-7 may have an important role in the maintenance of T-cell homeostasis in HIV infection. Inpatient IL-7 production may be an effective marker of the disease progression and a causal factor for the emergence of SI HIV variants.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE) project 3111/00, Ministerio de Ciencia y Tecnología project BFM2000-1382, and the Fundació irsiCaixa. J. Blanco is an FIS researcher from the Fundació para la Recerca Biomèdica Hospital Germans Trias i Pujol. A. Llano and J. Barretina hold predoctoral scholarships from FIS.

3.3 INTERACCIÓN ENTRE IL-7 Y RANTES Y SU EFECTO CONJUNTO SOBRE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

Son múltiples los factores del huésped que influyen en la patogénesis viral. Dichos factores interactúan entre ellos, como es sabido que ocurre entre citocinas y quimiocinas. El papel ejercido por las CC-quimiocinas en la progresión de la infección por el VIH-1 es muy controvertido, y una de las causas que complican su estudio son las interacciones con otras citocinas.

En este último capítulo hemos intentado clarificar las interacciones que se producen entre las citocinas y las quimiocinas y su relación con la progresión y la aparición de las variantes X4/SI.

En la primera parte de este capítulo hemos descrito las interacciones que se producen entre IL-7 y RANTES tanto *in vitro* como *in vivo*. También hemos intentando establecer un algoritmo que nos indique con mayor precisión la presencia o ausencia de variantes X4/SI en un individuo.

Finalmente, en la última parte del capítulo, y una vez definida la interacción que se produce entre IL-7 y RANTES, hemos tratado de definir los mecanismos mediante los que IL-7 y RANTES actúan sobre la selección de las variantes X4/SI.

Interleukin-7-Dependent Production of RANTES That Correlates with Human Immunodeficiency Virus Disease Progression

Anuska Llano, Jordi Barretina, Arantxa Gutiérrez, Bonaventura Clotet, and José A. Esté.

ABSTRACT

There is a relationship between CD4-T-cell number and circulating interleukin 7 (IL-7) levels in human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals. Here, we show that IL-7 induced a dose-dependent production of CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), and CCL5 (RANTES) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), ex vivo tonsil lymphoid tissue of HIV⁻ individuals, and PBMC from HIV⁺ individuals, suggesting that IL-7 may regulate β -chemokine production in vivo. In a cross-sectional study of HIV⁺ individuals ($n = 130$), a weak but significant correlation between IL-7 and RANTES was noted ($r = 0.379$; $P < 0.001$). Remarkably, the correlation between IL-7 and RANTES increased to an r value of 0.798 ($P < 0.001$) if individuals with low CD4 cell counts (<200 cells/ μ l) were excluded from the analysis. Our results suggest that there is a relationship between IL-7 and the production of RANTES both in vitro and in vivo that is lost in immune-compromised patients (CD4 count of <200 cells/ μ l) but that could be restored by antiretroviral therapy. Unlike the case for IL-7, high levels of RANTES suggest an intermediate stage of HIV disease progression.

Journal of Virology, April 2003, Vol. 77 No. 7, p. 4389-4395.

INTRODUCTION

In human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection, host factors play a central role in the evolution of the disease [308, 315]. Genetic factors may protect or reduce the rate of disease progression [335], and a number of soluble factors have been linked to immune-controlled and noncytolytic antiviral response of CD8⁺ T cells [336] that may correlate with disease progression [337].

β -chemokines released by activated CD8 T cells have been shown to be responsible for soluble suppressor activity against HIV-1 strains. CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), and CCL5 (RANTES) are potent in vitro inhibitors of HIV replication at an early step of the virus life cycle [58]. RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β bind to chemokine receptor CCR5, which is required for entry by macrophage-tropic strains (R5 strains) [42]. T-cell-tropic HIV-1 strains use another chemokine receptor, CXCR4. The chemokine CXCL12 (SDF-1) [64] blocks the replication of virus isolates that use this receptor (X4 strains) [41, 315] and may prevent the emergence of X4 strains in vivo [334]. Overproduction of β -chemokines has been associated with resistance to infection with R5 HIV-1 in vitro [338], protection of HIV-exposed uninfected individuals [339, 340], slow disease progression [341, 342], and asymptomatic status of HIV⁺ individuals [300, 343, 344]. Nevertheless, clarification of the exact role of β -chemokines in the course of HIV infection and disease progression has remained elusive. The search for a correlation between chemokine levels in plasma or serum and the protection from HIV infection or progression to AIDS has been attempted by a number of groups, but most of them have failed [296, 345-349]. HIV-1 infection or accessory HIV gene products may induce the production of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β by HIV-1-infected macrophages, triggering both chemotaxis and activation of resting T lymphocytes and permitting productive HIV-1 infection [350]. Furthermore, RANTES has been reported to enhance HIV replication [351, 352], and there is data suggesting that an elevation of RANTES in serum predicts a rapid progression of the disease [298], supporting the idea that β -chemokine production could, in fact, promote HIV-1 infection and propagation. Thus, conclusive evidence of the relevance of β -chemokine-mediated anti-HIV activity in vivo is still unclear.

Interleukin 7 (IL-7) is a critical homeostatic cytokine for T-cell development [172, 186, 187, 199]. HIV-1-seropositive individuals show elevated levels of IL-7 in plasma that are inversely correlated with CD4⁺-T-cell number and positively correlated with

increased HIV-1 viral load (VL) [173]. We have recently demonstrated a possible association between IL-7 levels in plasma and the evolution of X4 HIV-1 in vivo [353]. Besides increasing the number of target cells for HIV, IL-7 influence in the disease progression may be due to its capacity to upregulate CXCR4 expression on mature CD4⁺ T cells [195, 353, 354], suggesting that IL-7 also potently modulates mature T-cell function. In fact, IL-7 may costimulate T-cell activation, induce a weak type 1 T-cell differentiation, block T-cell apoptosis, and increase the activity of CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes (CTL) (reviewed in reference 363).

In this work, we have studied the effect of IL-7 on the in vitro production of β -chemokines and its correlation with RANTES in plasma of HIV⁺ individuals. We demonstrate for the first time a tight correlation between IL-7 and RANTES that is lost in immune-compromised patients.

RESULTS AND DISCUSSION

IL-7 stimulates the production RANTES, MIP-1 α , and MIP- β . We first evaluated the production of β -chemokines by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from HIV⁻ or HIV⁺ donors after 6 days of incubation with IL-7 and IL-2. PBMC and plasma samples were obtained as described previously [353] and evaluated for IL-7 receptor expression by flow cytometry. A mean of 84% \pm 6% of CD4⁺ and 61% \pm 19% of CD8⁺ cells from HIV⁻ donors expressed the IL-7 receptor ($n = 5$). The PBMC were cultured in RPMI medium without stimulation (those of HIV⁺ individuals) or supplemented with phytohemagglutinin (PHA) (4 μ g/ml) and IL-2 (6 U/ml) (those of HIV⁻ individuals) at a concentration of 10⁶ cells per ml. After 2 days, cells were washed and cultured in RPMI medium with or without IL-2 (10 U/ml) and with various IL-7 concentrations. After 6 days of stimulation, 50 μ l of the culture was collected to analyse expression of various receptors, and supernatants were collected and stored frozen at -80°C until use.

Cells from HIV-negative donors, without previous stimulation, did not respond to IL-7 stimuli (data not shown). As shown in Fig. 1A, increasing concentrations of IL-7 induced a dose-dependent increase in the concentrations of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β in the supernatant of PHA-activated cells that reached statistical significance ($P < 0.05$) at 500 ng of IL-7/ml. CD4 and CD8 T cells were separated by negative selection (following the manufacturer's guidelines of StemSep Columns for Gravity Feed

[diameter, 0.3 inches]; StemCell Technologies, Barcelona, Spain). Similar to PBMC, purified CD4⁺ or CD8⁺ cells responded to IL-7 by producing RANTES (data not shown), confirming that both T-cell subsets are a source of β -chemokines [58, 299, 300, 338]. Conversely, and unlike ADP (adenosine diphosphate), a known agonist of platelet aggregation and RANTES release, IL-7 did not induce the production of RANTES by platelets isolated by centrifugation of platelet-rich plasma following a protocol described previously [355].

IL-7 did not induce a significant increase in T-cell number at the concentrations tested compared to results for cells that were not stimulated with IL-7, suggesting an effect of cell activation without T-cell proliferation. In fact, IL-7 induced a dose-dependent increase in CXCR4 expression and a modest but clear down regulation of CCR5 (up to 33% decrease by 500 ng of IL-7/ml) in PBMC from healthy donors. Thus, costimulation of PBMC with IL-7 of activated cells induced β -chemokine production.

In order to clarify the effect of IL-7, we used a well-defined model system [307, 356], based on human tonsil tissue blocks cultured *ex vivo*, that does not require exogenous stimulation or activation, avoiding the use of PHA or IL-2. As observed with PBMC, IL-7 induced an upregulation (up to threefold) of RANTES, MIP-1 α (up to six fold), and MIP-1 β (up to 7-fold) production in tonsil lymphoid tissue (Fig. 1B). Similarly, in PBMC from HIV-infected individuals that do not require costimulation with IL-2 or PHA stimulation to produce RANTES [357], IL-7 induced the production of RANTES >20-fold (at 100 ng of IL-7/ml), MIP-1 α (>20-fold), or MIP-1 β (>5-fold) compared to the untreated (control) cells (Fig. 1C). However, the effect of IL-7 in β -chemokine production was not reflected in the level of CCR5 expression (data not shown). Thus, we demonstrate that IL-7 may costimulate with IL-2 (in HIV⁻ PBMC) or directly stimulate (in lymphoid tissue) T cells that respond with the production of β -chemokines. Our observation that IL-7 enhanced the production of β -chemokines in PBMC from HIV⁺ individuals without the need of exogenous stimulation suggested that IL-7 may influence chemokine levels *in vivo*.

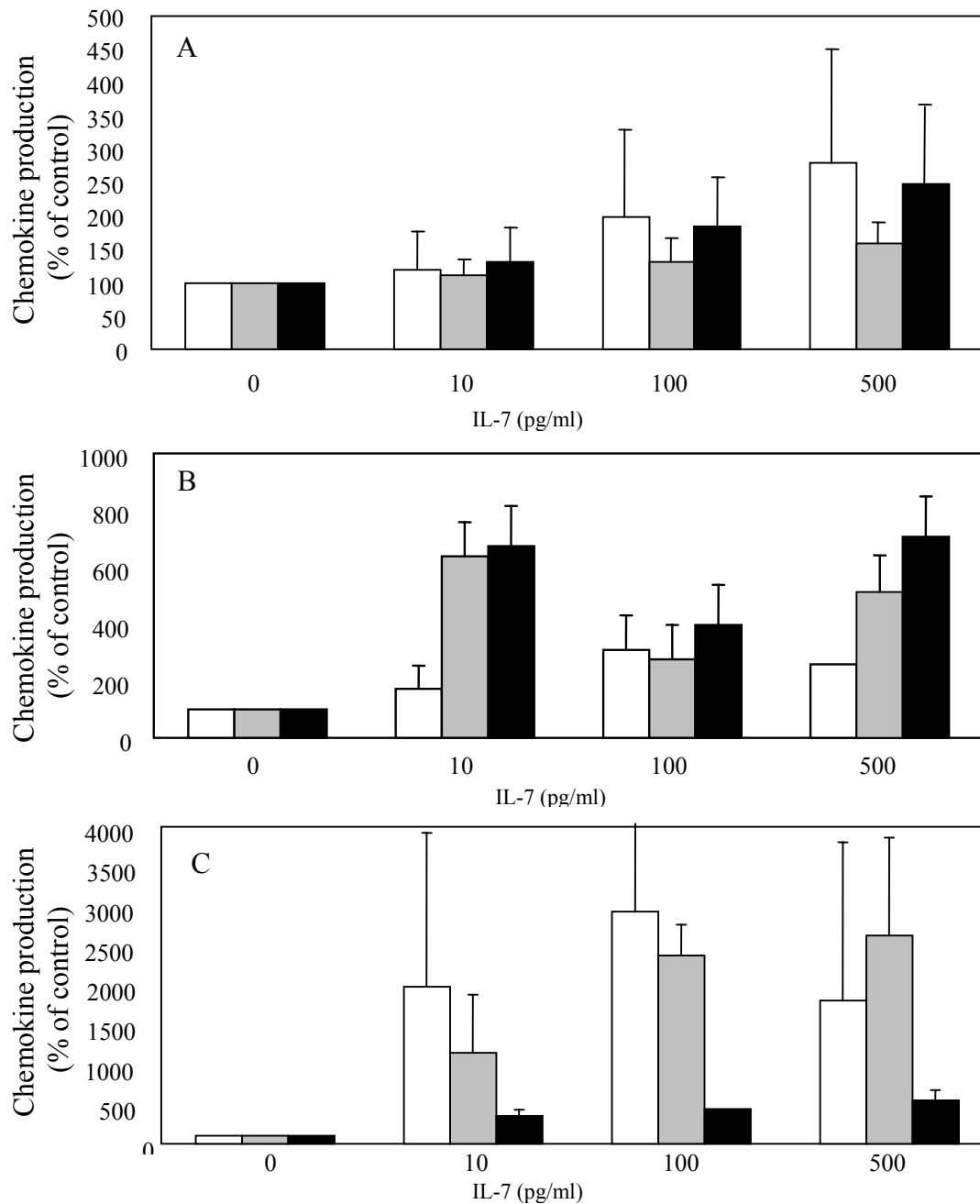


FIG. 1. IL-7-stimulated β -chemokine production. PHA- and IL-2-stimulated PBMC from HIV⁻ donors ($n = 5$) (A), tonsil lymphoid tissue ex vivo ($n = 2$) (B) without PHA or IL-2, or PBMC from HIV⁺ individuals ($n = 3$) without PHA or IL-2 (C) were stimulated with various concentrations of IL-7. After 6 days in culture, RANTES (white bars), MIP-1 α (grey bars), or MIP-1 β (black bars) was evaluated by ELISA of cell supernatants. Results represent the mean \pm standard deviation.

IL-7 in plasma correlates with RANTES. A cross-sectional study was done to evaluate the relationship between IL-7 and RANTES in HIV⁺ individuals. Plasma from 130 HIV individuals was isolated after centrifugation of blood samples at 1,400 rpm for 10 min in a Centra-GP8 IEC centrifuge (Hucoa, Barcelona, Spain) and was immediately cryopreserved and stored at -80°C until use. Plasma IL-7 levels were determined by an ultrasensitive commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Quantikine HS Human IL-7 Immunoassay; R&D Systems, Minneapolis, Minn.) following the manufacturer's instructions. RANTES levels were measured by a commercial ELISA (Endogen, Barcelona, Spain). Patient samples used for cross-sectional analysis were those corresponding to the basal sample prior to initiation of an antiretroviral treatment clinical study. The immunological, virological, and epidemiological variables of the complete cohort are shown in Table 1. HIV⁺ individuals could be stratified into groups of low (<200 cells/ μ l) and high (>200 cells/ μ l) CD4-T-cell count. There were no significant differences in the ratio of male/female individuals, time since HIV diagnosis, or risk factor between the two groups, suggesting that these variables did not influence the CD4- or CD8-T-cell count, VL, or IL-7 or RANTES levels. Conversely, the groups of low and high CD4-T-cell count had significantly ($P < 0.001$) different IL-7 levels in plasma. Similarly, mean CD8-T-cell numbers and mean HIV VL were significantly ($P < 0.001$) different between the two groups.

Despite increased levels of RANTES in plasma from HIV patients [358], members of our group and others have not been able to detect a correlation between β -chemokine levels and CD4-T-cell count [300, 357]. Similarly, there were no significant differences between RANTES levels in plasma of low- or high-CD4-T-cell-count groups (Table 1). Conversely, there was a weak but significant correlation ($r = 0.379$; $P < 0.001$) between IL-7 and RANTES levels in plasma of HIV⁺ individuals (Fig. 2A). This correlation increased to an r value of 0.798 and P value of <0.001 when only individuals with a CD4 count of >200 cells/ μ l ($n = 66$) were included in the analysis, suggesting a tight control between IL-7 and RANTES in those patients that were not immune compromised (Fig. 2B).

Table 1. Immunological, virological, and epidemiological variables of a cohort of HIV⁺ individuals^a

<i>Variable</i>	<i>HIV+ patients</i>	<i>HIV+ patients with CD4 cell count < 200</i>	<i>HIV+ patients with CD4 cell count > 200</i>
<i>n</i>	130	64	66
VL (Log ₁₀)	5.1 ± 5.47	5.3 ± 5.59	4.6 ± 4.9
CD4 (cell/μl)	247 ± 221	71 ± 58	400 ± 192
CD8 (cell/μl)	776 ± 551	433 ± 357	1011 ± 622
RANTES (ng/ml)	27 ± 20	26 ± 18	26.5 ± 17
IL-7 (pg/ml)	10 ± 7	13 ± 7	6.5 ± 4
Gender (% male /% female)	82/18	88/12	75/25
Time since HIV diagnosis (years)	4 ± 3	5 ± 3	4 ± 3
Risk factor (%) ^b			
IVDU	25	27	23
Homosexual	39	41	42
Heterosexual	14	19	21
CBP	14	11	3
IND	8	3	11

^a Some values are shown as mean ± standard deviation .

^b IVDU: drug user, CBP: contaminated blood product, IND: indeterminate.

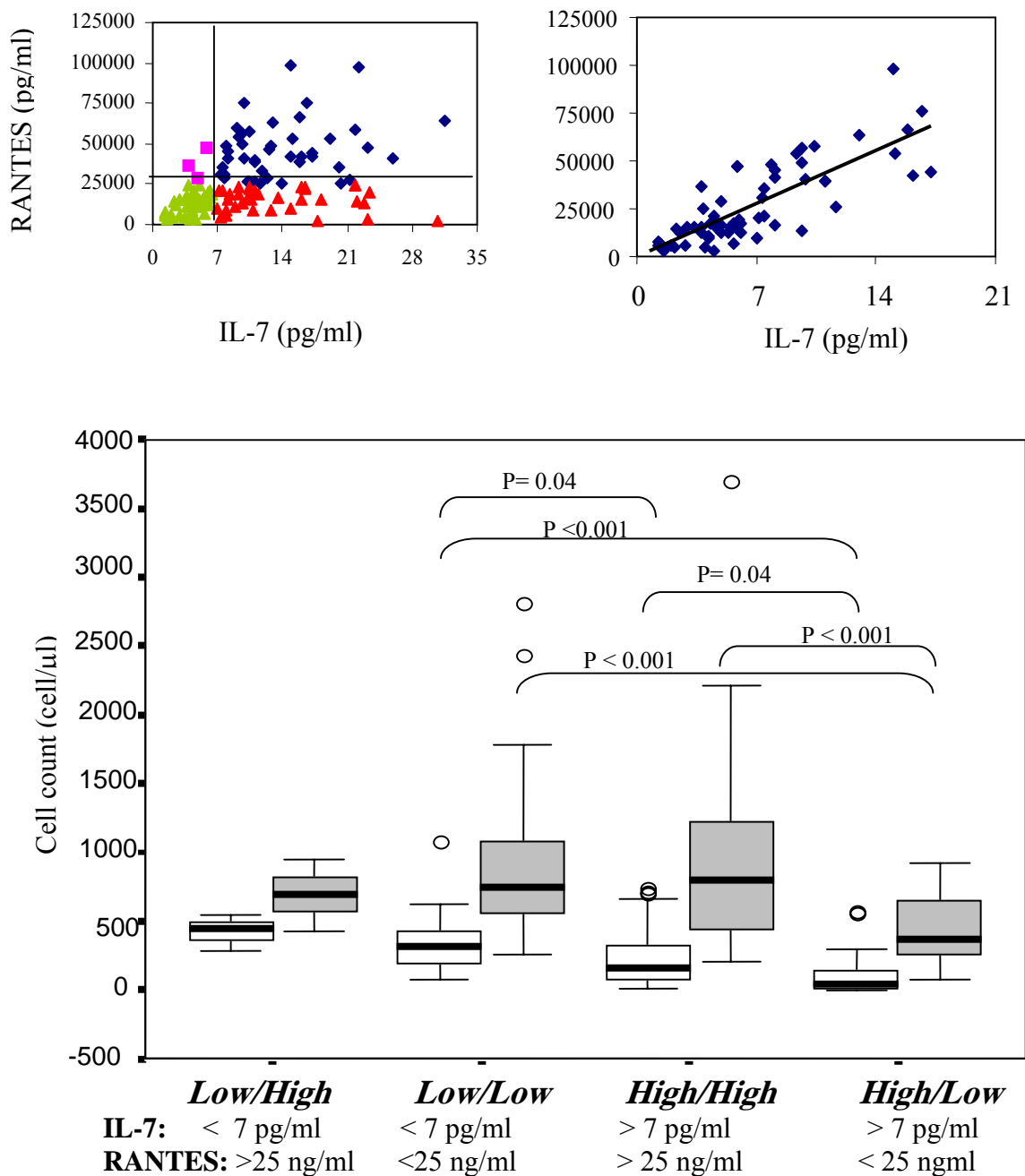


FIG. 2. Correlation between IL-7 and RANTES levels in plasma of HIV⁺ individuals. (A) Linear correlation ($r = 0.374$; $P < 0.001$) between IL-7 and RANTES of 130 HIV⁺ individuals. HIV⁺ individuals may be separated into four separate groups according to low (<7 pg/ml) and high (>7 pg/ml) levels of IL-7 (vertical cutoff line) and low (<25,000 pg/ml) and high (>25,000) levels of RANTES (horizontal cutoff line). Colors depict individuals in the Low/Low (green), Low/High (pink), High/High (blue), and High/Low (red) groups for IL-7 and RANTES levels, respectively. (B) Correlation between IL-7 and RANTES ($r = 0.798$; $P < 0.001$) of HIV⁺ individuals with CD4 cell counts of >200 cells/μl. (C) CD4-T-cell (white bars) and CD8-T-cell (grey bars) values for each of the four groups. Results are depicted in box plot diagrams, where the box represents the 25th and 75th quartile and the line represents the median value. Bars indicate 5th and 95th percentiles, and circles depict atypical values. *P* values shown represent significant differences (Student's *t* test) between cell subsets of the corresponding groups. The mean \pm standard deviation values are shown in Table 2.

HIV⁺ individuals could be stratified in three categories according to IL-7 and RANTES in plasma: IL-7 <7pg/ml/RANTES <25 ng/ml (Low/Low); IL-7 >7 pg/ml/RANTES >25 ng/ml (High/High); and IL-7 >7 pg/ml/RANTES <25 ng/ml (High/Low) (Fig. 2A and C). Only three individuals could be grouped in the Low/High (IL-7 < 7 pg/ml/RANTES > 25 ng/ml) group. The immunological and virological characteristics of each group are shown in Table 2, and the distribution, range, and median CD4 and CD8 values are shown in Fig. 2C. The mean CD4-T-cell count was significantly ($P < 0.05$) higher in the Low/Low group, followed by the High/High group and High/Low group. The mean CD8-T-cell count was statistically different between the Low/Low and High/Low groups and between the High/High and High/Low groups. Taken together, these results suggest an association between RANTES and IL-7 levels and the CD4 and CD8 cell count in which immune-competent individuals have low IL-7 and low RANTES, immune-deficient patients have high IL-7 and low RANTES, and an intermediate stage of disease is characterized by high IL-7 and high RANTES.

Table 2. Immunological and virological variables for HIV⁺ individuals stratified according to IL-7 and RANTES levels in plasma^a

	<i>Low/Low^b</i>	<i>High/High^c</i>	<i>High/Low^d</i>	<i>Low/High^e</i>
<i>N</i>	42	49	36	3
VL (Log ₁₀)	4.6±5	5.1±5.5	5.5±5.6	4.0±3.9
CD4 (cell/μl)	338±192	215±201	100±139	423±132
CD8 (cell/μl)	802±553	777±652	332±254	692±260
RANTES(ng/ml)	12.8±6	46±17	15±7	38±9
IL-7 (pg/ml)	4±1	14±6	14±6	5±1

^a Some values are shown as mean ± standard deviation

^b <7 pg/ml IL-7 <25 ng/ml RANTES

^c >7 pg/ml IL-7 >25 ng/ml RANTES

^d >7 pg/ml IL-7 <25 ng/ml RANTES

^e <7 pg/ml IL-7 >25 ng/ml RANTES

HIV-negative individuals have low or undetectable levels of IL-7 [353], and the level of RANTES is normally low [300, 357]. Conversely, HIV⁺ individuals have significantly higher levels of RANTES than uninfected individuals (data not shown) [358]. IL-7 has been shown to increase T-cell number, presumably through activation and proliferation of early T-cell subsets. In HIV infection this increased T-cell number is masked by the rapid destruction of T cells and increased HIV replication [173, 359, 360]. As more cells become activated because of HIV infection, more RANTES is produced. Thus, the increased RANTES correlates with increased IL-7. As disease progresses, IL-7 inversely correlates with CD4 cell count [173, 353]. T cells are an important source of RANTES and other β -chemokines [58, 340, 361]; thus, a drop in the level of CD4⁺ and CD8⁺ T cells should be tied to a drop in RANTES levels. However, as shown in Fig. 2, the significant change in CD4 cell count between the Low/Low group and the High/High group is not yet followed by a significant change in CD8 T cells. RANTES levels drop only when a dramatic change in T-cell count (both CD4s and CD8s) occurs; that is, RANTES drops after exhaustion of the immune system when IL-7 production cannot compensate for the depletion of T cells. Therefore, low T-cell count and immunodeficiency are marked by high and low levels of IL-7 and RANTES, respectively.

RANTES measurements are known to be problematic because platelets are a rich source of RANTES [355] that could be released upon platelet activation in the glass tube when blood is drawn. However, there is only a weak correlation between RANTES levels and platelet count for individual patients [298], and disease progression is marked by chronic thrombocytopenia. It is unlikely that platelet-derived RANTES was released only in a proportion of individuals with high IL-7, since plasma was systematically collected for all individuals following the same procedure. Nevertheless, we cannot exclude that the correlation between IL-7 and RANTES may also reflect platelet activation or another cell source of RANTES in HIV⁺ individuals.

The correlation between IL-7 and RANTES is maintained in patients in HAART. A second cohort of HIV⁺ individuals was used to confirm the relationship between IL-7 and RANTES. Plasma samples ($n = 36$) from a subset of HIV⁺ individuals were used to measure IL-7 and RANTES in plasma. These patients were enrolled in our

HIV clinic and have been efficiently treated with highly active antiretroviral therapy (HAART) for two or more years that includes at least three reverse transcriptase inhibitors (RTIs) or two RTIs plus a protease inhibitor (PI). The following patients were included in this cohort: 21 males and 9 females, who acquired HIV through sexual intercourse (63%), intravenous-drug use (27%), or an indeterminate route of transmission (10%). After treatment the mean CD4-T-cell count increased from 373 ± 183 to 515 ± 327 cells/ μ l, the mean VL decreased 1.1 \log_{10} RNA copies/ml (from $59,542 \pm 178,712$ to $4,743 \pm 12,470$ copies/ml), and a positive correlation ($r = 0.73$; $P < 0.001$) between IL-7 and RANTES was found (Fig. 3A). Thus, a strong correlation was found between IL-7 and RANTES in patients with a CD4 T cell count of >200 cells/ μ l as a consequence of HAART.

Longitudinal changes in IL-7 and RANTES were further studied in a cohort of HIV⁺ individuals enrolled in a structured treatment interruption [362] study consisting of optimized antiretroviral therapy (at least two RTIs with or without a PI) that led to a VL of <400 copies/ml and CD4 cell counts of >500 cells/ μ l. Patients discontinued treatment until the VL increased up to 100,000 copies/ml or the CD4 cell count decreased to <350 cells/ μ l. Plasma samples from each patient were collected before and after interruption of treatment and evaluated for IL-7 and RANTES, and the inpatient change in both parameters were calculated. An increase or decrease in IL-7 correlated with an increase or decrease in RANTES in 19 of 24 patients (Fig. 3B). A strong correlation ($r = 0.77$; $P < 0.01$) between the change in IL-7 and the change in RANTES was observed in this cohort, indicating that a strong inpatient decrease or increase in IL-7 was associated to a strong decrease or increase in RANTES. Variations in the VL as a consequence of treatment interruption or reinitiation of HAART showed that a change in IL-7 resulted in a change in RANTES (Fig. 3C and D show results for two representative patients). Conversely, no change in the IL-7 level resulted in no change in the RANTES level (Fig. 3E). Of note, RANTES levels could increase before a detectable change in IL-7 (Fig. 3C). A prospective study of individuals with low CD4 cell counts that improve their immune status after HAART should formally address whether changes in β -chemokines levels are a consequence of changes in IL-7 as suggested by our in vitro studies. Nevertheless, a longitudinal study of HIV⁺ individuals for whom HAART is interrupted suggests that HAART will affect IL-7 and RANTES production in a similar fashion.

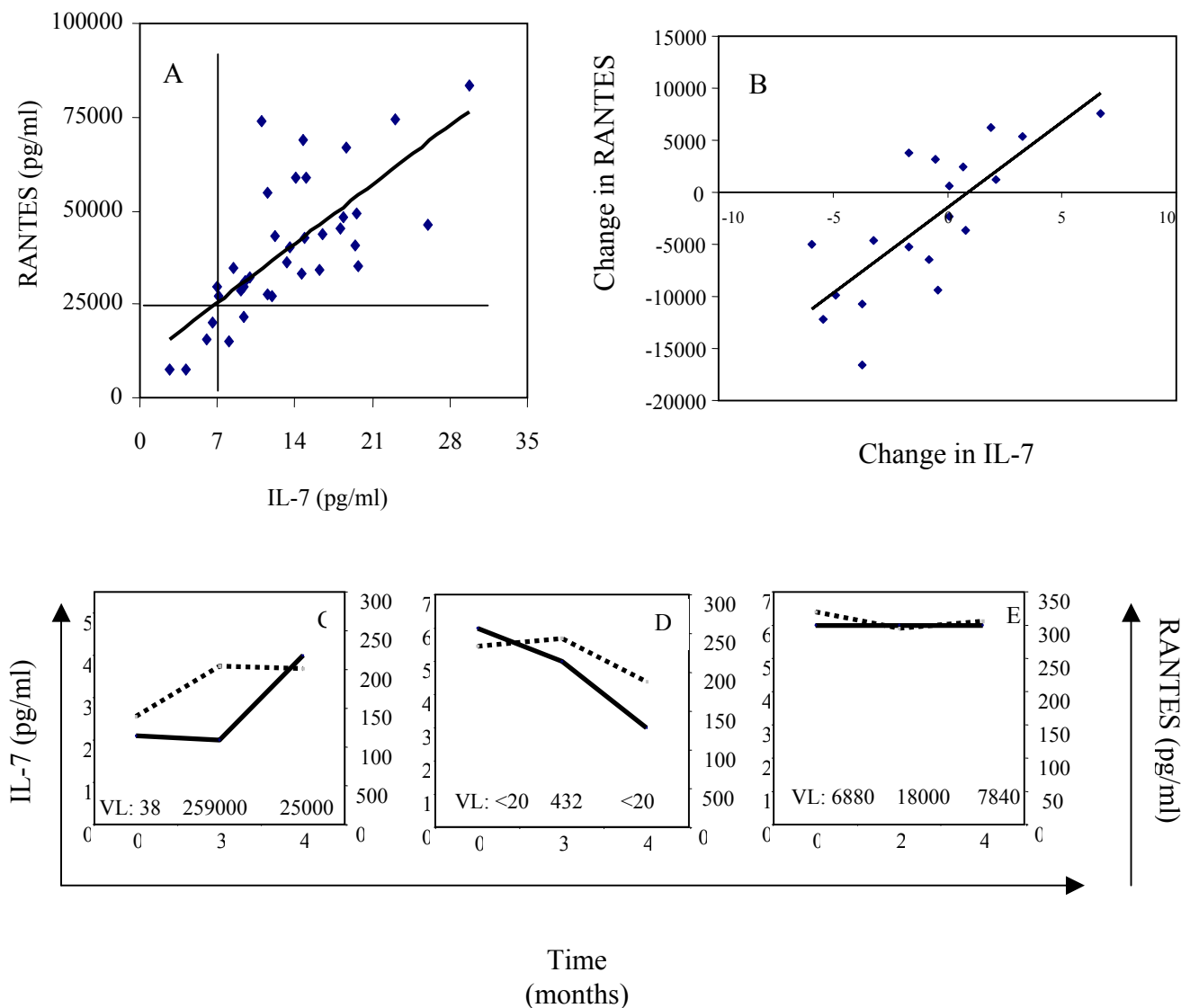


FIG. 3. IL-7 and RANTES in patients under HAART. (A) Linear correlation ($r = 0.74$; $P < 0.001$) between IL-7 and RANTES in plasma of HIV⁺ individuals after 2 years of HAART. The vertical and horizontal lines show the IL-7 and RANTES cutoff values, respectively. (B) Plasma samples from patients in a treatment interruption study were collected before and after interruption of treatment, and RANTES and IL-7 were measured by ELISA. The figure represents the correlation ($r = 0.77$; $P < 0.01$) between the inpatient change in RANTES and IL-7 in 19 of 24 patients evaluated. (C, D, and E) Plasma samples from three representative patients were collected before and after interruption of treatment and after reinitiation of HAART. IL-7 (filled line) and RANTES (dotted line) were measured by ELISA. HIV VL in RNA copies/milliliter is shown for each time period.

Our results could explain, in part, the discrepancies observed in relationship to β -chemokine production and disease progression. Previous works have not taken into account an analysis that includes cytokines such as IL-7 that, as shown here, may

directly alter the production of RANTES by T cells from uninfected or infected individuals. A beneficial effect on T-cell number could be associated to β -chemokines, i.e., RANTES, if individuals with similar IL-7 levels are compared. Conversely, RANTES levels could be associated to disease progression if distinct IL-7 groups are compared. Our results suggest the possibility that individuals with high RANTES levels but low IL-7 levels are indeed protected from infection. Genetic, virological, or immunological factors besides those discussed herein could influence RANTES production and disease progression.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank J. de Haro and J. Calvo from Hospital Municipal de Badalona for providing tonsil lymphoid tissue.

This work was supported in part by the Spanish Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España project 3111/00, the Ministerio de Ciencia y Tecnología project BFM2000-1382, and the U.S.-Spain Joint Commission for Scientific and Technological Cooperation (Fulbright Commission). A. Llano and J. Barretina hold predoctoral scholarships from the Fondo de Investigación Sanitaria.

RANTES (CCL5) and IL-7 may promote the selection of X4 HIV-1 variants

Anuska Llano, Jordi Barretina, Bonaventura Clotet and José A. Esté

ABSTRACT

We have previously identified interleukin-7 (IL-7) as a factor related to the evolution of HIV-1 from CCR5-using (R5) to CXCR4-using (X4) strains but the exact mechanism has not been elucidated. Besides its upregulatory effect on CXCR4, we found that IL-7 induced a dose-dependent production of RANTES in uninfected and freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from HIV+ individuals. X4 HIV-1 entry and replication could be enhanced by the presence of IL-7, while R5 virus replication was blocked. There may be a direct effect of IL-7 on the selection of the SI/X4 phenotype by overexpression of CXCR4 and downregulation of CCR5 through the production of CC-chemokines and the activation of HIV replication.

Anexo

In HIV-1 infection, host factors play a central role in the evolution of the disease [81, 308, 315]. The appearance of X4 tropic virus or syncytium-inducing (SI) variants, in approximately 50% of HIV-1 seropositive individuals, still remains as one of the key matters of the disease. The emergence of X4 variants is associated to a rapid decline of CD4 + T cells and AIDS [309, 316].

Interleukin 7 (IL-7) is a critical homeostatic cytokine for T cell development [186, 187, 192, 198, 199, 363] and it is now known the important role that this cytokine plays in HIV-infection. HIV-1 seropositive individuals show elevated levels of IL-7 in plasma that inversely correlate with CD4 + T cell number and positively correlate with HIV-1 viral load [173]. We have shown the association between IL-7 levels in plasma and the emergence of HIV-1 X4 [364] variants in vivo [353]. One possible explanation of the IL-7 influence in the disease progression may be owe to its capacity to up-regulate CXCR4 coreceptor expression on PBMCs [195, 354] favoring the emergence of the HIV-1 X4 variants.

Chemokines have also been described as important host factors that are involved in HIV-1 disease progression. Confronting evidence has been shown on the role of β -chemokines in the disease progression. CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1 α) and CCL4 (MIP-1 β) are potent in vitro inhibitors of HIV entry and replication [295, 300, 340]. It has been shown that CD8 + T cells from asymptomatic HIV+ patients produced significantly higher levels of MIP1- α and MIP1- β , but not RANTES, than seronegative individuals or than patients with rapid progression [300]. However, other authors suggested that elevated serum RANTES levels predict rapid progression of the disease [298].

Exogenous IL-7 increased the production of RANTES by peripheral blood mononuclear cells from HIV-1 negative and HIV-1+ individuals and enhanced HIV-1 X4 entry [365]. We have shown that there is a correlation between IL-7 and RANTES levels in plasma of HIV-1 infected patients.

To further understand the role of IL-7 in HIV-1 pathogenesis we looked for the effect of IL-7 on the capacity of X4 and R5 strains to infect cells in the absence of RANTES production. Therefore, we evaluated the effect of IL-7 on the capacity of viral entry after one cycle of replication. Briefly, equal titter of each virus was used to

infected 1×10^6 PBMC of uninfected donors, either stimulated with or without PHA/IL-2 and with or without IL-7 during 24-48h. Dextran sulfate, a known inhibitor of viral entry [366] was used as control. After 8 hours of the acute infection the cells were pelleted and total DNA was isolated for PCR amplification by a commercial extraction kit (Qiagen, Barcelona, Spain). As illustrated in Figure 1, infection of activated PBMCs from healthy donors, stimulated with IL-7 (100 ng/ml) a 12-fold increase of HIV-1 X4 entry as compared to the infection in the absence of IL-7. Conversely, HIV-1 R5 entry was not significantly altered (2-fold increase). Preincubation of PBMC for 24h with IL-7 prior to infection, induced a similar effect: a 20-fold and a 6-fold increase in HIV-1 X4 and R5 entry, respectively. These data indicate that IL-7 had the capacity of enhancing viral entry of both R5 and X4 strains, however the effect on X4 strain was much stronger.

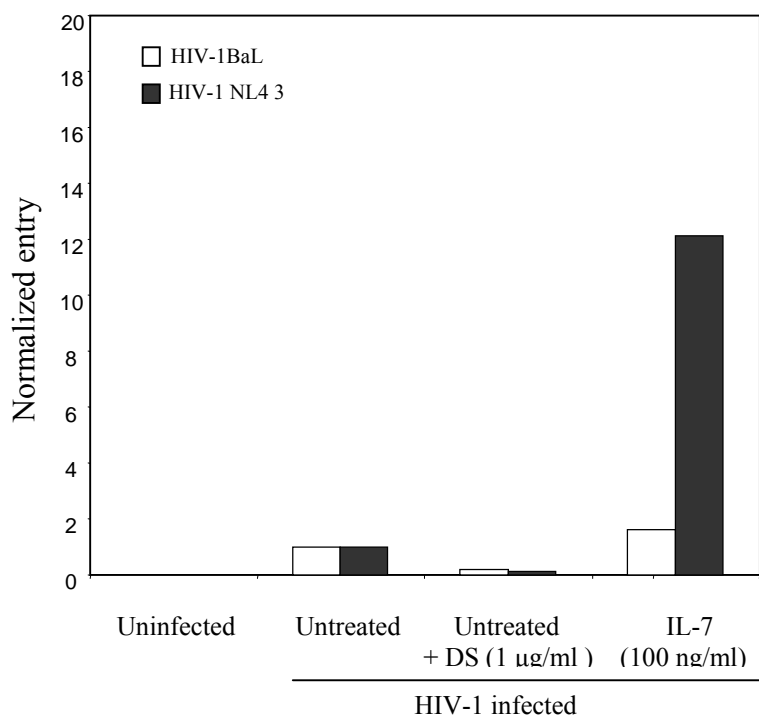


Fig 1. IL-7 enhanced viral entry: activated PBMCs from healthy donors were infected with a R5 strain (BaL: gray bars) or a X4 strain (NL4 3: black bars), in presence of dextran sulfate and IL-7 (100 ng/ml) added in the acute infection or added 24 hours before the infection. The data is presented as relative entry to viral infection levels in the untreated controls. The data presented here is the mean of two experiments.

We next compared the replication capacity (measured as pg of p24 produced) of a R5 (BaL) and a X4 (NL4-3) HIV-1 strain, alone or in a mixture of both strains in the presence or absence of exogenous RANTES. Briefly, PHA/IL-2 activated PBMCs (1×10^6 cells/ μ l) were infected with a mixture of HIV-1 strains containing 1% of NL4-3 (X4) and 99% of BaL (R5) or virus alone in presence or absence of exogenous RANTES (1 μ g/ml). Cells were cultured and passaged every 7 days in uninfected PHA/IL-2 stimulated PBMC and cell pellets and supernatants were collected. DNA was isolated from infected cells for Amplified-fragment length polymorphism (AFLP) analysis and p24 antigen was measured in the culture supernatants.

As expected, exogenous RANTES inhibited the replication of the R5 virus alone (Figure 2A). However, the replication capacity of the X4 strain was enhanced up to 372-fold as early as 7 days postinfection (Figure 2B), suggesting that RANTES would promote the replication of X4/SI strains in a heterogeneous (mix) population.

Moreover, in the mixture of both strains, cultured in presence of exogenous RANTES, the X4 strain was favorably selected 20 days postinfection, as we can see in Figure 2C, detected by amplified-fragment length polymorphism analysis. Briefly, a fragment of the V3 region of the HIV-1 genome was amplified by PCR as described elsewhere [310]. Amplified DNA generates a fragment of 323 bp from the NL4-3 strain and 316 bp from BaL strain. The PCR product was diluted 1/40 and 2 μ l were added to a mixture containing formamide and internal size marker. The sample mixture was heated to 95°C for 5 min, cooled on ice and immediately loaded into the gel. The internal size standard was labeled with the red fluorescence dye (ROX-500) and the forward primer of the PCR was labeled with the green fluorescence dye HEX. AFLP fragments were separated with POP4-polymner on an ABI Prims 310 automated DNA sequencer. Fragments were sized with GeneScan version 2.1.0 software. Determination of HIV-1 viral strain was also done by sequence analysis of the genome.

Taken together our results suggest that high RANTES levels promote the entry and replication, and favor the selection of X4 over R5 HIV-1 strains.

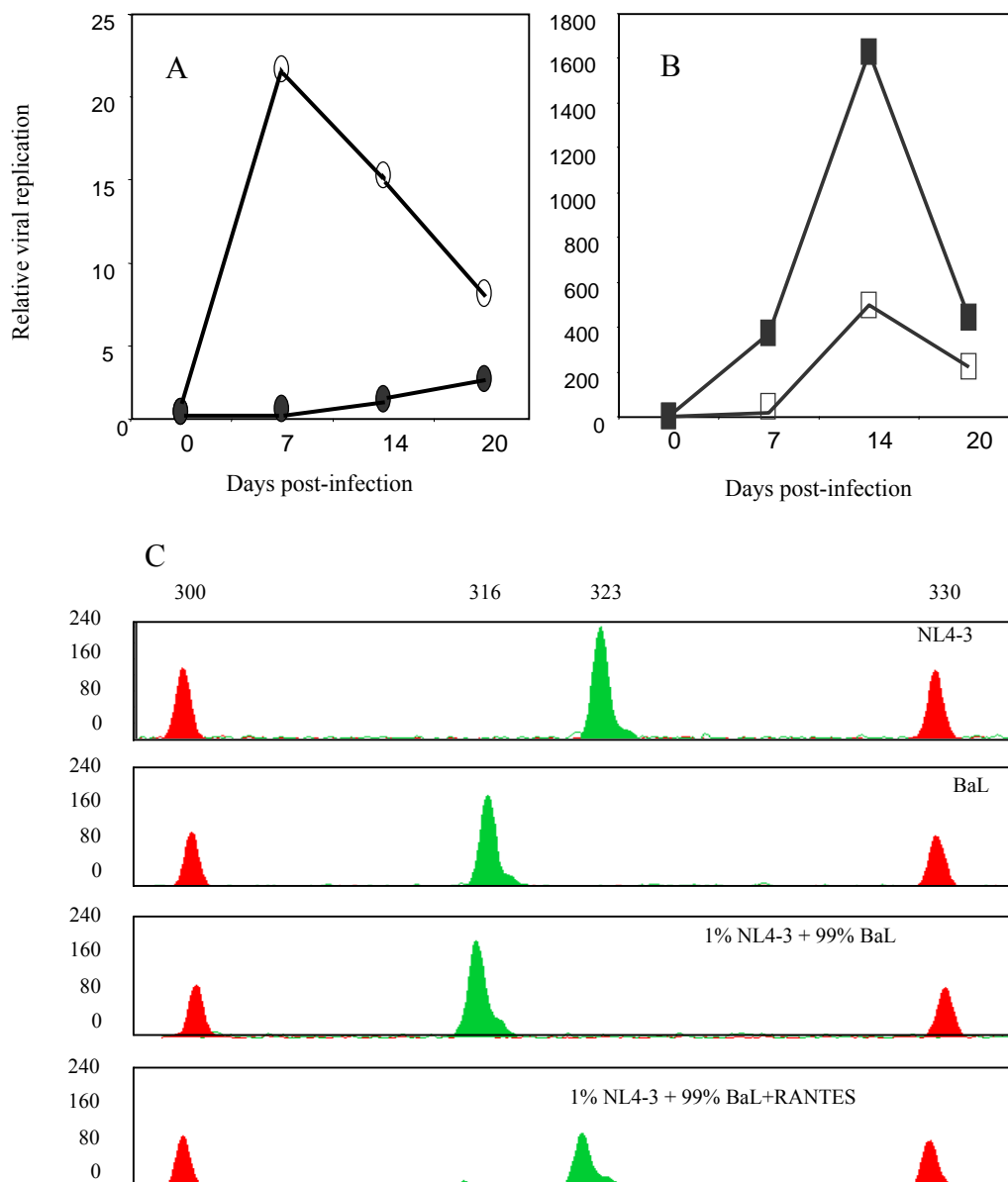


Fig 2. (A and B) Exogenous RANTES suppress R5 tropic virus and enhanced X4 tropic virus. PBMCs were infected with a R5 (A) or X4 (B) tropic strain in presence (black marks) or absence (white marks) of exogenous RANTES, levels of viral replication was measured by p24 production 7 and 14 days postinfection. Data are presented as relative production of p24 with respect to day 0 and are representative of experiments performed with different donors. (C) GeneScan version 2.1.0 derived electropherograms. The gray peaks indicate the internal marker with known base pairs, and the black peaks indicate the fragment corresponding to the sample obtained after amplification of V3 20 days postinfection. The horizontal scale is fragment sizes in base pairs and the vertical scale is relative fluorescence.

Finally to better define the relationship between IL-7 and RANTES and its association to the emergence of X4 variants in HIV-1 + infected patients, we carried on a cross-sectional analysis, in which the number of CD4 + T cells and viral phenotype were determined and the levels of IL-7 and RANTES in plasma were evaluated. A

cohort of 138 patients was first grouped according to their clinical status (group 1: n = 64, CD4 + T < 200 cells per μ l; group 2: n = 66, CD4 + T > 200 cells per μ l). The means of IL-7 and RANTES levels in each group were calculated to determine whether their production varies significantly with clinical status. As we have described before [353] we found significant differences in IL-7 levels between two groups. However we did not find significant differences in RANTES levels between the two groups (Figure 3A), as others have described before [300].

We next grouped the patients in four groups according to their CD4 T cell number and RANTES levels in plasma (Table 1). Group A: CD4 >200cells/ μ l / RANTES<25 ng/ml; Group B: CD4>200cells/ μ l / RANTES>25ng/ml; Group C: CD4<200cells/ μ l / RANTES>25 ng/ml and Group D: CD4<200cells / μ l/RANTES<25ng/ml. The mean IL-7 level in plasma was calculated in each group as well as the percentage of individuals with X4 variants (Figure 3B). The groups of CD4 cell count > 200 (groups A and B) did not show any differences in the proportion of individuals with the SI phenotype. The highest % of SI individuals (group C, 81%), was found in patients with < 200 CD4 cells/ μ l and high IL-7 and high RANTES levels (16 ± 6 pg/ml and 44.8 ± 19 ng/ml, respectively), followed by patients with low CD4 cell count, low RANTES (15 ± 7 ng/ml) with a mean IL-7 of 12 ± 7 pg/ml (group D). Thus, it appears that high RANTES levels may be determining the higher proportion of X4 variants in patients with low CD4 cell count.

Table 1. Immunological and virological variables HIV+ individuals stratified according to CD4 T cell number and RANTES levels in plasma.

	Group A (n=40)	Group B (n=26)	Group C (n=26)	Group D (n=46)
CD4 (cell/ μ l)	400 \pm 168	389 \pm 167	75 \pm 56	69 \pm 61
CD8 (cell/ μ l)	736 \pm 571	987 \pm 725	562 \pm 444	375 \pm 274
RANTES(pg/ml)	12587 \pm 5481	48322 \pm 15461	44772 \pm 18956	15355 \pm 6871
IL-7 (pg/ml)	4 \pm 2	10 \pm 4	16 \pm 6	12 \pm 7
% SI strains	18	23	81	61

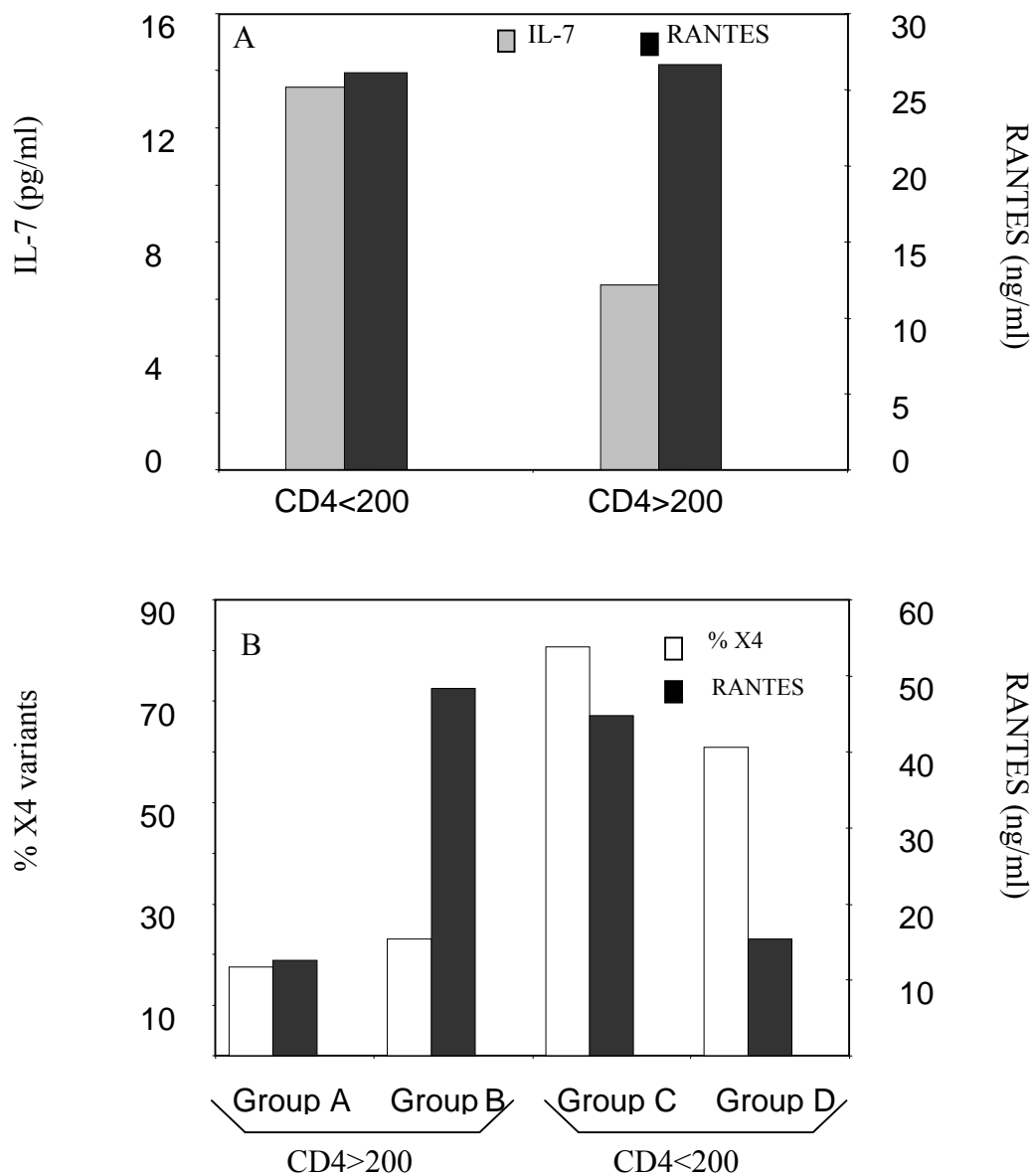


Fig 3. High percentage of X4 variants in patients with high levels of RANTES in plasma and with a low CD4 T cell/ μ l. The levels of IL-7 and RANTES in plasma were evaluated and the number of CD4 T cells/ μ l and the viral phenotype were determined in 130 patients. There were no significant differences in RANTES levels when patients were grouped in two groups according to the number of CD4 T cell/ μ l (A). Patients may be separated into 4 separate groups according to the clinical Status (CD4 > 200 or CD4 < 200 cells/ μ l) and to their level of RANTES in plasma (< or > than 12000 pg/ml). The levels of RANTES in the subgroup with CD4 < 200 cells/ μ l and with the higher % of X4 variants (81%) are significantly higher than the subgroup with less % of X4 variants (61%) (B).

4 DISCUSIÓN

La regulación de la expresión de CXCR4 *in vivo* es un fenómeno complejo y multifactorial. La relación existente entre los niveles de SDF-1 en plasma y la expresión de CXCR4 en la superficie de los linfocitos T *in vivo* no está clara, siendo este un tema muy controvertido dentro de la patogénesis del VIH-1. Nosotros hemos encontrado una posible asociación entre altos niveles de SDF-1 en plasma y menores niveles de expresión de CXCR4 en PBMCs de donantes sanos, lo que sugiere que *in vivo* SDF-1 puede estar determinando o incluso modificando los niveles de CXCR4. Se sabe que CXCR4 selectivamente es internalizado en la superficie de los linfocitos intestinales, donde la expresión de SDF-1 es abundante [98]. Al igual que en el intestino, una alta expresión de SDF-1 se puede estar produciendo en otros epitelios; de hecho, la quimiocina se expresa constitutivamente en las células dendríticas y en las epiteliales de la piel, así como en el tejido tímico [312, 367]. Todo esto sugiere que SDF-1 podría inducir la internalización del correceptor CXCR4 en los lugares donde se produce la infección, reduciendo la transmisión y la propagación del VIH-1, concretamente de las cepas X4.

En nuestro primer trabajo hemos descrito una variación considerable en los niveles plasmáticos de SDF-1 entre individuos VIH-1+, a pesar de ello hemos observado una débil, pero significativa diferencia entre los niveles de SDF-1 en plasma y el fenotipo viral de los pacientes, de manera que los individuos con cepas virales X4/SI presentan niveles de SDF-1 significativamente menores que los individuos con cepas R5/NSI. Para entender el significado biológico de este resultado hay que tener en cuenta que el fenotipo viral R5/NSI es transitorio ya que en el individuo infectado

puede emerger el fenotipo viral X4/SI, por lo que habrá individuos con cepas R5/NSI con bajos niveles de SDF-1. El grupo de pacientes con cepas R5/NSI presenta una mayor variabilidad en los niveles de SDF-1 reflejando la posibilidad de que este grupo incluya individuos con fenotipos virales R5/NSI y bajos niveles plasmáticos de SDF-1 cuyo fenotipo viral evolucionará a X4/SI. Nuestros resultados también sugieren que SDF-1 podría estar ejerciendo presión selectiva, al menos en parte, limitando la emergencia de las cepas X4/SI. Esto explicaría porque el fenotipo SI/X4 no emerge en todos los pacientes que progresan a SIDA. En nuestro laboratorio se ha llevado a cabo un estudio de diversidad de la región C2-V5 del gen de la envuelta *env* en individuos VIH-1 positivos con diferentes niveles plasmáticos de SDF-1, encontrándose que en los pacientes con cepas R5/NSI y elevados niveles de SDF-1 existe una mayor diversidad en dicha región que en los pacientes con bajos niveles de SDF-1 e igual fenotipo viral, lo que también sugiere que SDF-1 puede estar ejerciendo distintas presiones selectivas en la diversificación y evolución de *env* (Fernández *et al.*, submitted).

Derdeyn y colaboradores describieron que los niveles de SDF-1 en plasma de individuos sanos se mantenían estables a lo largo del tiempo. Además, en pacientes VIH-1+ que recibían HAART los niveles de SDF-1 tampoco variaban incluso después de 42 semanas post-tratamiento. Estos mismos autores encontraron una correlación positiva entre los niveles de SDF-1 y el número de células T CD4 en un estudio cross-seccional, lo que sugería una posible asociación entre bajos niveles de SDF-1 y la progresión de la infección [286]. Contradictoriamente Ikegawa y colaboradores describieron que la infección por VIH-1 inducía la expresión de SDF-1, particularmente en la última etapa de la infección, sugiriendo que un elevado nivel de SDF-1 sería un indicador pronóstico de un avanzado estado de la infección [287]. Por otro lado, nosotros no hemos encontrado correlación entre los niveles de SDF-1 en plasma y el número de células T CD4 o carga viral. Nuestros resultados sugieren que los niveles plasmáticos de SDF-1 no se ven afectados por la infección ni tampoco dependen del estado inmunológico del paciente. Además SDF-1 no es una quimiocina inducible, sino que se expresa de forma constitutiva en varios tejidos, donde desempeña importantes funciones homeostáticas, por lo que no es de extrañar que sus niveles plasmáticos sean estables.

Independientemente de que los niveles de SDF-1 permanezca estables dentro de un mismo individuo, los niveles de la quimiocina entre pacientes son muy variables. No se sabe cuáles son los factores que influyen la producción de SDF-1 en un

individuo. Se ha descrito un polimorfismo genético en la región promotora 3'A del gen que codifica para SDF-1 (SDF1-3'A) que podría alterar la producción de la quimiocina. Hay autores que han descrito que la presencia de la variante en homocigosis se asocia con una progresión retardada a SIDA [368]. Por el contrario, otros estudios muestran que la presencia en homocigosis de la variante no protege contra la progresión, sino que se asocia con una acelerada pérdida de células T CD4 [369]. Otros autores, a pesar de haber descrito una asociación entre la presencia de la variante en homocigosis y bajos niveles de SDF-1 en individuos no infectados, no han encontrado asociación entre la variante polimórfica y el efecto sobre la progresión de la infección [288]. En nuestro estudio no encontramos correlación entre alto o bajo nivel de SDF-1 en plasma con la detección de la variante polimórfica, sin embargo, en nuestra cohorte el porcentaje de individuos homocigotos para la variante era muy bajo, por lo que únicamente podemos asegurar que la presencia de la variante en heterocigosis no se correlaciona con los niveles plasmáticos de SDF-1 y por lo tanto no parece influir en la progresión de la infección.

Es importante destacar también, que un reducido número de individuos de nuestro estudio presentan variantes X4/SI a pesar de tener altos niveles plasmáticos de SDF-1, esto indica que no solo SDF-1 está actuando como factor supresivo de las cepas X4/SI, sino que debe de haber otros factores que también estén influenciando en el cambio de tropismo del virus. Por lo tanto, aunque SDF-1 es el ligando natural de CXCR4, no es el único factor que modifica la expresión de este receptor. Entre otros, IL-7 induce una sobre expresión de CXCR4 en PBMCs en cultivo *ex vivo*. También se ha descrito y nosotros mismo hemos visto que los individuos VIH-1+ presentan niveles de IL-7 en plasma más elevados que individuos sanos, sugiriendo que esta citocina podría estar influyendo en la patogénesis del VIH-1. Además, Napolitano y colaboradores describieron la asociación entre elevados niveles de IL-7 en plasma y la linfopenia de células T CD4 asociada a la infección por VIH-1 [173], determinando el importante papel de IL-7 en el mantenimiento de las células T CD4. En nuestro trabajo corroboramos estos resultados. Nosotros encontramos una fuerte correlación inversa entre los niveles plasmáticos de IL-7 y el número total de células T CD4 presentes en periferia en individuos infectados con VIH-1. Dicha correlación seguía siendo significativa, pero más débil entre los niveles de IL-7 y el número total de células T CD8+.

En nuestra cohorte de pacientes VIH-1+ observamos que los individuos que presentaban cepas virales X4/SI tenían niveles significativamente más elevados de IL-7 en plasma que aquellos que presentaban cepas R5/NSI. En los pacientes con cepas X4/SI la correlación entre los niveles de IL-7 y el número de células T CD4 es mucho mayor que la existente en los pacientes con cepas R5/NSI. También encontramos una asociación entre altos niveles plasmáticos de IL-7 y la presencia del fenotipo viral X4/SI, de manera que los pacientes VIH-1+ con altos niveles de IL-7 plasmáticos tienen una alta probabilidad de presentar cepas virales X4/SI.

Al estratificar a los pacientes con cepas virales X4/SI y R5/NSI en tres grupos, en función de sus niveles de células T CD4, en primer lugar observamos que únicamente existen diferencias significativas en los niveles de IL-7 en los pacientes que presentan cepas X4/SI. Sin embargo, en los pacientes con cepas R5/NSI, independientemente del estado inmunológico, todos los pacientes presentan niveles similares de la citocina. En segundo lugar observamos que individuos con bajo número de células T CD4 y cepas virales R5/NSI presentan niveles de IL-7 más bajos que los individuos que presentan cepas virales X4/SI con igual número de células T CD4, a pesar de que se esperaría encontrar nivel similares de IL-7 para todos los pacientes que se encuentran en un mismo estado inmunológico, independientemente de la presencia de una cepa viral u otra. Esta paradoja la podríamos explicar teóricamente mediante distintas hipótesis, una de ellas podría ser el tropismo de las distintas cepas virales, que podría causar una depleción selectiva de las células productoras de IL-7 por parte de las cepas R5/NSI y no de las X4/SI. Esto haría que en los individuos con cepas R5/NSI, en un punto avanzado de la infección, hubiesen deplecionado la población de células productoras de IL-7, con lo que a pesar de presentar bajos niveles de células T CD4 los niveles de la citocina no se incrementarían. Otra posible hipótesis sería la existencia de algún polimorfismo genético, aún no descrito, por ejemplo en la región promotora del gen que codifica para IL-7, que podría generar una menor expresión de la citocina. Sin embargo, esta hipótesis parece menos probable ya que la presencia de un polimorfismo sería independiente de la presencia de una cepa viral u otra.

Nuestros resultados sugieren que IL-7 estaría favoreciendo la emergencia de las cepas X4/SI, posiblemente mediante la sobre-expresión de CXCR4. Además IL-7 podría ser considerado un marcador de progresión de la infección por el VIH-1, ya que en combinación con el número de células T CD4 nos permite predecir con una alta

probabilidad si el paciente presentará cepas X4/SI o R5/NSI, por lo que este parámetro nos permite caracterizar con mayor profundidad el estado inmunológico del paciente.

Además, en un estudio longitudinal llevado a cabo en pacientes que han recibido tratamiento antiretroviral, encontramos que los niveles de IL-7 y el número de células T CD4 varían de forma inversa, confirmando que IL-7 es un buen marcador de la progresión de la infección por VIH-1. Ahora bien, el origen de las nuevas células T CD4 generadas en aquellos pacientes que responden adecuadamente al tratamiento sigue siendo desconocido. Como IL-7 es producida por las células estromales del timo y está implicada en la maduración de los timocitos, nuestros datos podrían indicar que IL-7 actúa como mediador de la respuesta homeostática que generaría nuevas células T CD4 producidas *de novo* por el timo. Por otro lado, IL-7 también se produce en tejidos extratímicos, como los queratinocitos, o también puede ser inducido por otras citocinas como IL-1 y TNF- α [330], lo cual también podría explicar la generación de nuevas células T CD4 por proliferación periférica [206, 370].

Otro tema controvertido es el empleo de IL-7 en la terapia antiretroviral. A pesar de los significativos progresos conseguidos con el tratamiento con HAART sobre el control de la replicación viral, aún existen algunas limitaciones, como son la reconstitución inmune total, la restauración de las respuestas inmunes antivirales y el mantenimiento del pool viral latente en los reservorios. Se hipotetizó que la terapia con IL-7 podría inducir la reconstitución del sistema inmune por su efecto sobre la timopoiesis y al mismo tiempo ampliaría la respuesta inmune y estimularía los reservorios virales latentes mediante la expansión periférica independiente del timo. Hay autores que apoyan el uso de IL-7 en la terapia ya que se ha descrito que la citocina induce la activación de las células quiescentes, lo que permitiría eliminar el virus que permanece latente en los reservorios, alegando que la citocina apenas tiene efecto sobre el fenotipo de las células T *in vitro* y que tampoco se produce un aumento de la carga viral en modelos de macaco [371-373]. Sin embargo estudios *in vitro* en PBMCs y en cultivos de tejido tímico han demostrado que IL-7 incrementa la replicación del VIH-1 [272, 374]. Nuestros datos tampoco apoyan el uso de IL-7 como agente inmuno-terapéutico debido a la asociación entre el fenotipo viral más patogénico X4/SI con elevados niveles de IL-7 en plasma y su posible efecto sobre la inducción de la expresión de CXCR4 *in vivo*. Cabe la posibilidad que en pacientes con cepas R5/NSI, el tratamiento terapéutico con IL-7 podría favorecer la emergencia de las cepas X4/SI más patogénicas, acelerando la progresión de la infección.

También quisimos determinar el efecto de IL-7 sobre la replicación de las cepas R5/NSI. Dado que las células T, tanto las CD4 como las CD8, expresan IL-7R, que además son las principales productoras de β -quimiocinas y que IL-7 modula la actividad de las células T maduras, la otra alternativa fue determinar un posible efecto de IL-7 sobre la producción de CC-quimiocinas. Encontramos que IL-7 era capaz de inducir la producción de RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β en PBMCs de donantes estimulados y en PBMCs de pacientes VIH-1+ *in vitro* y en cultivos de amígdalas *ex vivo*. Sin embargo, esta producción de CC-quimiocinas no se vio siempre reflejada a nivel de la expresión del correceptor CCR5, ya que únicamente en algunos casos encontramos una ligera reducción de la expresión del correceptor CCR5 inducida por la citocina. Para determinar la relevancia de este hallazgo llevamos a cabo un estudio cross-seccional en el que se evaluaron los parámetros inmunológicos (número de células T CD4 y CD8 y niveles plasmáticos de IL-7 y de RANTES) y virológicos (carga viral y fenotipo viral) de los pacientes integrados en el estudio. Los niveles plasmáticos de MIP-1 α y MIP-1 β no pudieron ser determinados, ya que se encuentran por debajo del límite de detección de los ELISAS comerciales disponibles. Observamos una correlación débil pero significativa entre los niveles plasmáticos de RANTES y de IL-7. Curiosamente esta correlación era mucho mayor cuando se eliminan del análisis a los pacientes con menos de 200 células T CD4/ μ l, lo que sugiere la existencia *in vivo* de un control entre IL-7 y RANTES únicamente en los pacientes que no están inmuno-deprimidos. La clasificación de los pacientes en 4 grupos en función de los niveles de IL-7 y de RANTES nos proporcionó información importante sobre esta cohorte. El grupo de pacientes que presentaba bajos niveles de IL-7 y de RANTES en plasma (denominado *Low/Low*) lo definimos como el grupo de pacientes inmuno-competentes por presentar buenas condiciones inmunológicas y virológicas, de hecho es el grupo con parámetros inmunológicos más parecidos a donantes sanos y con menor carga viral. El segundo grupo presenta niveles altos de IL-7 y de RANTES (denominado *High/High*), lo definimos como el grupo intermedio ya que se encuentra en un estadio intermedio de la infección, en este grupo la carga viral es más elevada que en el grupo anterior y el número de células T CD4 + es más bajo. El siguiente grupo presenta niveles elevados de IL-7 y bajos de RANTES (denominado *High/Low*) y lo definimos como el grupo de los inmuno-deprimidos o inmuno-deficientes, este grupo de pacientes es el que se encuentra en el grado más avanzado en la enfermedad; presentan una elevada carga

viral y el número de células T CD4 es el menor, también hay que destacar el acusado descenso en el número de células T CD8. Finalmente, el último grupo presenta niveles bajos de IL-7 y altos de RANTES (denominado *Low/High*), es el grupo con mejor estado inmunológico. Este grupo incluye un número de pacientes muy reducido y por ello los estadísticos no son significativos, sin embargo cabría pensar que los individuos pertenecientes a este grupo presentan cierta protección natural a la progresión de la infección, quizá en este grupo el elevado nivel de RANTES está internalizando la expresión de CCR5, inhibiendo la entrada viral.

En resumen, nuestro estudio sugiere que los niveles de IL-7 y de RANTES varían con la progresión de la infección, de manera que a medida que avanza la infección aumentan los niveles de IL-7 en respuesta a la depleción de células T CD4 y consecuentemente aumentan también los niveles de RANTES, sin embargo llega un punto en la infección en el que, a pesar de que los niveles de IL-7 son elevados, ya no se producen los mecanismos de regeneración de células T e incluso se produce una caída en el número de células T CD8 (cuyo nivel se mantiene elevado durante toda la infección). En este punto también se produce la caída en los niveles de RANTES, sugiriendo que las células T CD8 son las principales productoras de esta quimiocina. La determinación de los niveles plasmáticos de RANTES y de IL-7 en combinación nos permiten obtener aún más información acerca del estado inmunológico de los pacientes VIH-1+ que la obtenida únicamente a través IL-7 solo o del número de células T CD4. La combinación de estos tres parámetros nos permite definir, no sólo la probabilidad de presentar cepas X4/SI, sino también afinar más en el estadio de la infección, es decir, si el paciente se encuentra en un estadio inicial, intermedio o final de la infección.

El tratamiento antiretroviral también ejerce su efecto sobre la correlación entre IL-7 y RANTES observada en los pacientes infectados. En nuestro trabajo vimos una buena correlación entre ambos parámetros en una segunda cohorte de pacientes VIH-1+ que habían respondido satisfactoriamente al tratamiento antiretroviral durante un periodo mínimo de dos años y que, tras el tratamiento, presentaban niveles de CD4 por encima de las 200 células/ μ l. Esto nos sugería que el tratamiento antiretroviral era capaz de recuperar la correlación entre IL-7 y RANTES y que por lo tanto que la recuperación inmunológica de los pacientes es posible al menos en parte.

La determinación de los niveles plasmáticos de las CC-quimiocinas, así como su efecto sobre la regulación de la expresión de CCR5 sigue siendo un tema muy controvertido. Existe consenso en que los niveles de RANTES son más elevados en

individuos infectados por el VIH-1 que en individuos sanos. Mientras que los niveles plasmáticos de MIP-1 α y MIP-1 β parecen no estar modificados por la infección [298, 358, 375]. En referencia a RANTES, la controversia radica en la asociación de los niveles plasmáticos de RANTES con una mayor o menor progresión de la infección. Aukrust y colaboradores describieron elevados niveles de RANTES en plasma de progresores normales en estadios no avanzados de la infección que iban descendiendo al progresar la enfermedad. En este mismo estudio, algunos LTNPs presentaban niveles ligeramente más elevados que los individuos sanos y otros incluso niveles más bajos [295]. En otro estudio longitudinal llevado a cabo por Polo y colaboradores describían que elevados niveles de RANTES desde las primeras etapas de la infección se asociaban con una rápida progresión de la enfermedad. También hay estudios en los que correlacionan elevados niveles plasmáticos de RANTES con un aumento en el grado de activación de las células T CD8 [376]. Nosotros, a pesar de que encontramos niveles más elevados de RANTES en plasma de los pacientes que de donantes sanos, no encontramos correlación entre los niveles plasmáticos de RANTES y el número de células T CD4. Incluso cuando separamos a los pacientes en dos grupos en función de su número de células T CD4 (<200 y >200 células T CD4/ μ l) encontrábamos diferencias significativas en los parámetros virológicos (carga viral y fenotipo viral) y en los inmunológicos (IL-7, CD4 y CD8), pero no en el nivel de RANTES en plasma.

También hay que tener en cuenta, a la hora de hablar de niveles plasmáticos de RANTES, que no son únicamente las células T las productoras de esta quimiocina, también hay otras poblaciones celulares que la producen. Se ha descrito que las células NK activadas producen RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β [377]. Otra fuente importante de RANTES son las plaquetas que lo almacenan en gránulos y cuando son activadas lo liberan en grandes cantidades [378]. Si las muestras sanguíneas no se tratan correctamente, el RANTES producido por las plaquetas puede alterar el nivel verdadero de la quimiocina presente en plasma. Por otro lado también se ha descrito que en pacientes VIH-1+, la presencia de otras infecciones oportunistas también puede inducir la producción de CC-quimiocinas. Margolis y colaboradores describieron que en pacientes VIH-1 + la coinfección con herpesvirus-6 induce la producción de RANTES, pero no de MIP-1 α y MIP-1 β , en tejido linfoide, y que se asocia con la supresión de la replicación de cepas R5/NI pero no de las X4/SI [307]. En otro estudio se asoció la coinfección con *Mycobacterium tuberculosis* con la producción de CC-quimiocinas y

con una acelerada progresión de la infección del VIH-1 [379]. En nuestro estudio todas las muestras han sido igualmente manipuladas, sin embargo, no podemos excluir ni a las plaquetas, ni a otros tipos celulares como posibles productores de RANTES, dado el grado de activación celular que presentan los individuos infectados con VIH-1, así como el efecto de otros patógenos oportunistas asociados al VIH-1.

El papel que ejercen las quimiocinas sobre la patogénesis viral sigue siendo confuso hoy en día, esto puede ser debido a que no sólo tienen un efecto inhibitor de la entrada viral. La inhibición de la entrada viral se produce bien por competición directa por el receptor o por internalización del mismo y es independiente de la señalización de su correceptor a través de proteínas G, por lo que las quimiocinas pueden estar ejerciendo una función más compleja que la simple inhibición de la entrada en la replicación del VIH-1. De hecho, la señalización de quimiocinas a través de las proteínas G no solo induce quimiotaxis, sino también induce señales de supervivencia o de muerte, la activación predominante de una vía u otra puede depender, por ejemplo, de la concentración a la que se encuentra la quimiocina [380, 381]. Las CC-quimiocinas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β pueden inducir la replicación del VIH-1 en monocitos, macrófagos y linfocitos [382-384]. Este efecto inductor de la replicación viral por parte de las CC-quimiocinas es sensible a la toxina pertusis, y por lo tanto dependiente de señalización por proteína G [383]. Dolei y colaboradores sugirieron que las CC-quimiocinas podían incrementar la entrada de las cepas X4 en PBMCs como consecuencia de una acumulación del transcrito de CXCR4 [382]. Sin embargo, en el estudio no existen evidencias de modificación de la expresión de CXCR4 en la superficie celular. Kinter y colaboradores publicaron que las CC-quimiocinas no tenían efecto sobre la expresión de CXCR4 en la superficie celular, pero sin embargo aumentaba la co-localización de CD4 y CXCR4 [384] facilitando así la entrada de las cepas X4/SI. Otros autores han apuntado a que la señalización de las CC-quimiocinas a través de las proteínas G activan vías que regulan algunos pasos de la replicación viral, como la integración o la transcripción reversa [381]. Nosotros también hemos observado que *in vitro* la entrada de las cepas X4/SI en la célula en presencia de IL-7 se ven enormemente favorecidas, y que en presencia de RANTES exógeno se seleccionan las cepas X4/SI de una población mixta de cepas X4/SI y R5/NSI donde las cepas X4/SI se encuentran en menor proporción.

Al igual que las CC-quimiocinas, SDF-1 también ejerce efectos opuestos sobre la replicación viral, a parte de inhibir la entrada de las cepas X4/SI, SDF-1 también induce

la replicación viral mediante la estimulación de la transcripción del provirus mediada por Tat [385]. Estos efectos opuestos de las quimiocinas sobre la replicación viral ponen en duda el uso de estas moléculas o sus análogos como posibles agentes terapéuticos, por otra parte también explican la dificultad existente en caracterizar su relevancia dentro de la progresión de la infección por el VIH-1. Posiblemente, el fino balance entre los efectos que regulan la replicación del VIH-1 de manera positiva y negativa ejercido por las quimiocinas determinará la tasa de progresión viral *in vivo*.

El VIH-1 induce la producción tanto de quimiocinas como de citocinas, siendo las interacciones entre ellas enormemente complejas, lo que dificulta la identificación de su función dentro de la patogénesis viral. Los efectos opuestos de IL-7 y SDF-1 sobre CXCR4 sugieren que en microambientes donde se producen ambas moléculas, como por ejemplo el timo, el balance entre ambos factores podría estar determinando el grado de la expresión de CXCR4 en la superficie celular, de manera que en individuos con niveles elevados de SDF-1, las cepas X4/SI podrían tardar más en emerger debido a la internalización del receptor por parte de la quimiocina. En estadios más avanzados de la infección los niveles de IL-7 irán en aumento en respuesta a la depleción de las células T CD4, como consecuencia se generaría una sobre expresión de CXCR4 compensando el efecto ejercido por SDF-1 y permitiendo la emergencia de las cepas X4/SI. Al mismo tiempo IL-7 podría estar actuando de forma indirecta sobre la replicación viral, ya que progresivamente IL-7 estaría induciendo la producción de CC-quimiocinas, que a su vez internalizarían el correceptor CCR5, reduciendo la replicación de las cepas R5/NSI y por otra parte favoreciendo la replicación de las X4/SI.

Este es un modelo hipotético en el que se estudian la interacción de tres parámetros entre ellos y con el VIH-1. A parte de los factores del huésped estudiados por nosotros, otros factores del huésped, así como la presencia de patógenos oportunistas y factores propios del VIH-1 estarán alterando los niveles de expresión de CCR5 y CXCR4, así como los niveles de producción de quimiocinas y citocinas que influirán en la replicación viral. Por lo tanto, la multiplicidad de factores que gobiernan la replicación viral hace insuficiente el abordaje de un único factor, así como la determinación del impacto de dicho factor sobre la patogénesis viral. Esto conlleva a que en el futuro se planteen estudios multiparamétricos que definan con mayor exactitud la interacción entre ellos y con el VIH-1.

Otro punto a tener en cuenta es que este modelo está basado en las observaciones hechas en sangre periférica, y representan un reflejo de lo que hipotéticamente está

sucediendo en los órganos linfoides, donde tiene lugar la mayor parte de la replicación viral. Por un lado, los niveles de citocinas y de quimiocinas en los órganos linfoides pueden ser muy diferentes a los presentes en plasma, ya que en ellos existen microambientes donde la expresión de una citocina o quimiocina puede ser muy diferente respecto a la presente en plasma. Por otro lado, la distribución de las poblaciones celulares en los órganos linfoides también es esencial para determinar la presencia de dianas para variantes X4/SI o R5/NSI y para determinar la presencia de las células productoras de determinadas citocinas y/o quimiocinas. Todo esto hace indispensable orientar las futuras investigaciones hacia el estudio de tejido *ex vivo* de timo, amígdala, bazo y nódulos linfoides, de manera que tengamos una información más real de cómo está sucediendo la replicación viral y podamos definir nuevos marcadores de la progresión de la infección.

5 CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en nuestro trabajo son las siguientes:

1. Los pacientes infectados con cepas X4/SI presentan niveles de SDF-1 en plasma significativamente más bajos que los pacientes infectados con cepas R5/NSI, sugiriendo que SDF-1 puede estar actuando como factor supresivo de la emergencia de las variantes X4/SI.
2. En PBMCs de donantes sanos, elevados niveles de SDF-1 en plasma se correlacionan, de manera débil pero significativa, con una baja expresión del correceptor CXCR4.
3. Los niveles plasmáticos de SDF-1 son independientes del número de células T CD4 y de la carga viral del paciente infectado con el VIH-1.
4. Los pacientes infectados con cepas X4/SI presentan niveles plasmáticos de IL-7 significativamente más elevados que los pacientes infectados con cepas R5/NSI.

5. La alta probabilidad (81%) de un paciente de tener cepas virales X4/SI cuando presenta niveles elevados de IL-7 establece la clara asociación entre IL-7 y el fenotipo viral X4/SI.
6. Los niveles plasmáticos de IL-7 se ven alterados con el tratamiento antiretroviral, al igual que la carga viral y el número de células T CD4, lo que sugiere que IL-7 puede ser considerado como un marcador de la progresión de la infección por VIH-1.
7. IL-7 induce la producción de las CC-quimiocinas RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β en células T en cultivo.
8. *In vivo*, existe una clara correlación positiva entre los niveles plasmáticos de IL-7 y RANTES en los pacientes con más de 200 células T CD4/ μ l.
9. El tratamiento antiretroviral puede reestablecer la correlación entre IL-7 y RANTES, sugiriendo una posible restauración del sistema inmune.

6 BIBLIOGRAFÍA

1. Chermann, J.C., et al., *Isolation of a new retrovirus in a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome*. *Antibiot Chemother*, 1983. **32**: p. 48-53.
2. Gonda, M.A., et al., *Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus*. *Science*, 1985. **227**(4683): p. 173-7.
3. Daniel, M.D., et al., *Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques*. *Science*, 1985. **228**(4704): p. 1201-4.
4. Pedersen, N.C., et al., *Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency- like syndrome*. *Science*, 1987. **235**(4790): p. 790-3.
5. Coffin, J., et al., *Human immunodeficiency viruses*. *Science*, 1986. **232**(4751): p. 697.
6. Quinn, T.C., *Population migration and the spread of types 1 and 2 human immunodeficiency viruses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(7): p. 2407-14.
7. De Cock, K.M., et al., *Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic*. *Jama*, 1993. **270**(17): p. 2083-6.
8. Popper, S.J., et al., *Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2*. *J Infect Dis*, 1999. **180**(4): p. 1116-21.
9. Hirsch, V.M., et al., *An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2*. *Nature*, 1989. **339**(6223): p. 389-92.
10. Gao, F., et al., *Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa*. *Nature*, 1992. **358**(6386): p. 495-9.

11. Gao, F., et al., *Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes [see comments]*. Nature, 1999. **397**(6718): p. 436-41.
12. Muesing, M.A., et al., *Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus*. Nature, 1985. **313**(6002): p. 450-8.
13. Sanchez-Pescador, R., et al., *Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2)*. Science, 1985. **227**(4686): p. 484-92.
14. Gallo, R., et al., *HIV/HTLV gene nomenclature [letter]*. Nature, 1988. **333**(6173): p. 504.
15. Marx, P.A., R.J. Munn, and K.I. Joy, *Computer emulation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus*. Lab Invest, 1988. **58**(1): p. 112-8.
16. Nermut, M.V., et al., *Further evidence of icosahedral symmetry in human and simian immunodeficiency virus*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1993. **9**(10): p. 929-38.
17. Henderson, L.E., et al., *Gag proteins of the highly replicative MN strain of human immunodeficiency virus type 1: posttranslational modifications, proteolytic processings, and complete amino acid sequences*. J Virol, 1992. **66**(4): p. 1856-65.
18. Ozel, M., G. Pauli, and H.R. Gelderblom, *The organization of the envelope projections on the surface of HIV*. Arch Virol, 1988. **100**(3-4): p. 255-66.
19. Gelderblom, H.R., *Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function [editorial]*. AIDS, 1991. **5**(6): p. 617-37.
20. Aloia, R.C., et al., *Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(3): p. 900-4.
21. Henderson, L.E., et al., *Direct identification of class II histocompatibility DR proteins in preparations of human T-cell lymphotropic virus type III*. J Virol, 1987. **61**(2): p. 629-32.
22. Arthur, L.O., et al., *Cellular proteins bound to immunodeficiency viruses: implications for pathogenesis and vaccines*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1935-8.
23. Aloia, R.C., H. Tian, and F.C. Jensen, *Lipid composition and fluidity of the human immunodeficiency virus envelope and host cell plasma membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5181-5.

24. Broder, C.C. and E.A. Berger, *CD4 molecules with a diversity of mutations encompassing the CDR3 region efficiently support human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion*. J Virol, 1993. **67**(2): p. 913-26.
25. Brand, D., K. Srinivasan, and J. Sodroski, *Determinants of human immunodeficiency virus type 1 entry in the CDR2 loop of the CD4 glycoprotein*. J Virol, 1995. **69**(1): p. 166-71.
26. Choe, H., et al., *The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates*. Cell, 1996. **85**(7): p. 1135-48.
27. Wu, L., et al., *CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5*. Nature, 1996. **384**(6605): p. 179-83.
28. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1 [published erratum appears in Nature 1996 Nov 21;384(6606):288]*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-5.
29. Chan, D.C. and P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition*. Cell, 1998. **93**(5): p. 681-4.
30. Reinherz, E.L., et al., *Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(8): p. 4061-5.
31. Maddon, P.J., et al., *The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family*. Cell, 1985. **42**(1): p. 93-104.
32. Hussain, L.A. and T. Lehner, *Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia*. Immunology, 1995. **85**(3): p. 475-84.
33. Jordan, C.A., et al., *Infection of brain microglial cells by human immunodeficiency virus type 1 is CD4 dependent*. J Virol, 1991. **65**(2): p. 736-42.
34. Dalglish, A.G., et al., *The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus*. Nature, 1984. **312**(5996): p. 763-7.
35. Harouse, J.M., et al., *Inhibition of entry of HIV-1 in neural cell lines by antibodies against galactosyl ceramide*. Science, 1991. **253**(5017): p. 320-3.
36. Yahi, N., et al., *Galactosyl ceramide (or a closely related molecule) is the receptor for human immunodeficiency virus type 1 on human colon epithelial HT29 cells*. J Virol, 1992. **66**(8): p. 4848-54.

37. Maddon, P.J., et al., *The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain*. Cell, 1986. **47**(3): p. 333-48.
38. Ashorn, P.A., E.A. Berger, and B. Moss, *Human immunodeficiency virus envelope glycoprotein/CD4-mediated fusion of nonprimate cells with human cells*. J Virol, 1990. **64**(5): p. 2149-56.
39. Asjo, B., et al., *Replicative capacity of human immunodeficiency virus from patients with varying severity of HIV infection*. Lancet, 1986. **2**(8508): p. 660-2.
40. Tersmette, M., et al., *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**(6): p. 2026-32.
41. Feng, Y., et al., *HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor*. Science, 1996. **272**(5263): p. 872-7.
42. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 240.
43. Doranz, B.J., et al., *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**(7): p. 1149-58.
44. Horuk, R., et al., *The CC chemokine I-309 inhibits CCR8-dependent infection by diverse HIV-1 strains*. J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 386-91.
45. Zabel, B.A., et al., *Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis*. J Exp Med, 1999. **190**(9): p. 1241-56.
46. Mognetti, B., et al., *HIV-1 co-receptor expression on trophoblastic cells from early placentas and permissivity to infection by several HIV-1 primary isolates*. Clin Exp Immunol, 2000. **119**(3): p. 486-92.
47. Saha, K., et al., *Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 65-72.
48. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Human chemokines: an update*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 675-705.
49. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.

50. Murphy, P.M., et al., *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol Rev, 2000. **52**(1): p. 145-76.
51. D'Souza, M.P. and V.A. Harden, *Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research*. Nat Med, 1996. **2**(12): p. 1293-300.
52. Ward, S.G., K. Bacon, and J. Westwick, *Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction*. Immunity, 1998. **9**(1): p. 1-11.
53. Moser, B. and P. Loetscher, *Lymphocyte traffic control by chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 123-8.
54. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 108-15.
55. Luther, S.A. and J.G. Cyster, *Chemokines as regulators of T cell differentiation*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 102-7.
56. Mackay, C.R., *Chemokines: immunology's high impact factors*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 95-101.
57. Mackay, C.R., *Chemokine receptors and T cell chemotaxis [comment]*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 799-802.
58. Cocchi, F., et al., *Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV- suppressive factors produced by CD8+ T cells*. Science, 1995. **270**(5243): p. 1811-5.
59. Dragic, T., et al., *HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5 [see comments]*. Nature, 1996. **381**(6584): p. 667-73.
60. Alkhatib, G., et al., *CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1*. Science, 1996. **272**(5270): p. 1955-8.
61. Rollins, B.J., *Chemokines*. Blood, 1997. **90**(3): p. 909-28.
62. Taub, D.D. and J.J. Oppenheim, *Chemokines, inflammation and the immune system*. Ther Immunol, 1994. **1**(4): p. 229-46.
63. Kinter, A.L., et al., *HIV replication in CD4+ T cells of HIV-infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous beta-chemokines and the viral inductive effects of other endogenous cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 14076-81.
64. Bleul, C.C., et al., *The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 829-33.

65. Bleul, C.C., et al., *A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)*. J Exp Med, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
66. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
67. Shirozu, M., et al., *Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 495-500.
68. Peled, A., et al., *Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4*. Science, 1999. **283**(5403): p. 845-8.
69. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1199-211.
70. Arenzana-Seisdedos, F., et al., *HIV blocked by chemokine antagonist [letter]*. Nature, 1996. **383**(6599): p. 400.
71. Simmons, G., et al., *Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist*. Science, 1997. **276**(5310): p. 276-9.
72. Alkhatib, G., et al., *HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation*. Virology, 1997. **234**(2): p. 340-8.
73. Signoret, N., et al., *Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4*. J Cell Biol, 1997. **139**(3): p. 651-64.
74. Peliska, J.A. and S.J. Benkovic, *Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase*. Science, 1992. **258**(5085): p. 1112-8.
75. DeStefano, J.J., et al., *Polymerization and RNase H activities of the reverse transcriptases from avian myeloblastosis, human immunodeficiency, and Moloney murine leukemia viruses are functionally uncoupled*. J Biol Chem, 1991. **266**(12): p. 7423-31.
76. Bowerman, B., et al., *A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA*. Genes Dev, 1989. **3**(4): p. 469-78.
77. Farnet, C.M. and W.A. Haseltine, *Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex*. J Virol, 1991. **65**(4): p. 1910-5.

78. Stevens, S.W. and J.D. Griffith, *Human immunodeficiency virus type 1 may preferentially integrate into chromatin occupied by L1Hs repetitive elements*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(12): p. 5557-61.
79. Neumann, M., et al., *Splicing variability in HIV type 1 revealed by quantitative RNA polymerase chain reaction*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**(11): p. 1531-42.
80. Galai, N., et al., *Changes in markers of disease progression in HIV-1 seroconverters: a comparison between cohorts of injecting drug users and homosexual men*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995. **8**(1): p. 66-74.
81. Fauci, A.S., *Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy*. Science, 1993. **262**(5136): p. 1011-8.
82. Cao, Y., et al., *Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]*. N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 201-8.
83. Pantaleo, G., et al., *Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection [see comments]*. N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 209-16.
84. Graziosi, C., et al., *HIV-1 infection in the lymphoid organs*. AIDS, 1993. **7**(Suppl 2): p. S53-8.
85. Frost, S.D. and A.R. McLean, *Germinal centre destruction as a major pathway of HIV pathogenesis*. J Acquir Immune Defic Syndr, 1994. **7**(3): p. 236-44.
86. Lombardi, V.R., E. Maneiro, and R. Cacabelos, *Central nervous system damage during HIV infection*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1996. **18**(10): p. 707-22.
87. Keet, I.P., et al., *Predictors of rapid progression to AIDS in HIV-1 seroconverters*. Aids, 1993. **7**(1): p. 51-7.
88. Daar, E.S., H. Mohri, and D.D. Ho, *Virologic markers in the assessment of antiretroviral therapy*. AIDS, 1991. **5**(Suppl 2): p. S175-9.
89. Clark, S.J., et al., *High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection [see comments]*. N Engl J Med, 1991. **324**(14): p. 954-60.
90. Tamalet, C., et al., *Comparison of viral burden and phenotype of HIV-1 isolates from lymph nodes and blood*. AIDS, 1994. **8**(8): p. 1083-8.

91. Connor, R.I. and D.D. Ho, *Transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**(4): p. 321-3.
92. Bomsel, M. and V. David, *Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 114-6.
93. Patterson, B.K., et al., *Repertoire of chemokine receptor expression in the female genital tract: implications for human immunodeficiency virus transmission*. Am J Pathol, 1998. **153**(2): p. 481-90.
94. Lee, B., et al., *Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(9): p. 5215-20.
95. Granelli-Piperno, A., et al., *Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2733-7.
96. Ganesh, L., et al., *Infection of specific dendritic cells by CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 promotes cell-mediated transmission of virus resistant to broadly neutralizing antibodies*. J Virol, 2004. **78**(21): p. 11980-7.
97. Kawamura, T., et al., *R5 HIV productively infects Langerhans cells, and infection levels are regulated by compound CCR5 polymorphisms*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8401-6.
98. Agace, W.W., et al., *Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation*. Curr Biol, 2000. **10**(6): p. 325-8.
99. Pohlmann, S., F. Baribaud, and R.W. Doms, *DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV*. Trends Immunol, 2001. **22**(12): p. 643-6.
100. Kwon, D.S., et al., *DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection*. Immunity, 2002. **16**(1): p. 135-44.
101. van 't Wout, A.B., et al., *Evolution of syncytium-inducing and non-syncytium-inducing biological virus clones in relation to replication kinetics during the course of human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Virol, 1998. **72**(6): p. 5099-107.
102. Schuitemaker, H., et al., *Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of disease is associated*

- with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol*, 1992. **66**(3): p. 1354-60.
103. Connor, R.I., et al., *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**(4): p. 1772-7.
104. Rezza, G., et al., *The natural history of HIV infection in intravenous drug users: risk of disease progression in a cohort of seroconverters*. *AIDS*, 1989. **3**(2): p. 87-90.
105. Moss, A.R. and P. Bacchetti, *Natural history of HIV infection [published erratum appears in AIDS 1989 Jul;3(7):following A100] [see comments]*. *AIDS*, 1989. **3**(2): p. 55-61.
106. Mellanen, L., et al., *Matrix metalloproteinases-1, -3 and -8 and myeloperoxidase in saliva of patients with human immunodeficiency virus infection*. *Oral Dis*, 1996. **2**(4): p. 263-71.
107. *Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. Council of State and Territorial Epidemiologists; AIDS Program, Center for Infectious Diseases*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1987. **36**(Suppl 1): p. 1S-15S.
108. *CDC revises AIDS definition*. *Am Nurse*, 1993. **25**(3): p. 20.
109. Ezzell, C., *AIDS drug gets green light*. *Nature*, 1987. **329**(6142): p. 751.
110. Volberding, P.A., et al., *A comparison of immediate with deferred zidovudine therapy for asymptomatic HIV- infected adults with CD4 cell counts of 500 or more per cubic millimeter*. *AIDS Clinical Trials Group [see comments]*. *N Engl J Med*, 1995. **333**(7): p. 401-7.
111. Sterling, T.R., R.E. Chaisson, and R.D. Moore, *Initiation of highly active antiretroviral therapy at CD4+ T lymphocyte counts of >350 cells/mm³: disease progression, treatment durability, and drug toxicity*. *Clin Infect Dis*, 2003. **36**(6): p. 812-5.
112. Lalezari, J.P., et al., *Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(22): p. 2175-85.

113. Kilby, J.M., et al., *Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry [see comments]*. *Nat Med*, 1998. **4**(11): p. 1302-7.
114. Picker, L.J., et al., *Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition*. *J Immunol*, 1993. **150**(3): p. 1105-21.
115. Dutton, R.W., L.M. Bradley, and S.L. Swain, *T cell memory*. *Annu Rev Immunol*, 1998. **16**: p. 201-23.
116. Bleul, C.C., et al., *The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes [see comments]*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(5): p. 1925-30.
117. Mo, H., et al., *Expression patterns of the HIV type 1 coreceptors CCR5 and CXCR4 on CD4+ T cells and monocytes from cord and adult blood*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1998. **14**(7): p. 607-17.
118. Ostrowski, M.A., et al., *Both Memory and CD45RA+/CD62L+ Naive CD4(+) T Cells Are Infected in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals*. *J Virol*, 1999. **73**(8): p. 6430-6435.
119. Schnittman, S.M., et al., *Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(16): p. 6058-62.
120. Roederer, M., et al., *HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated with CD3/CD28*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(7): p. 1555-64.
121. Spina, C.A., H.E. Prince, and D.D. Richman, *Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro*. *J Clin Invest*, 1997. **99**(7): p. 1774-85.
122. Woods, T.C., et al., *Loss of inducible virus in CD45RA naive cells after human immunodeficiency virus- 1 entry accounts for preferential viral replication in CD45RO memory cells*. *Blood*, 1997. **89**(5): p. 1635-41.
123. Helbert, M.R., et al., *HIV infection of CD45RA+ and CD45RO+ CD4+ T cells*. *Clin Exp Immunol*, 1997. **107**(2): p. 300-5.
124. Roederer, M., et al., *CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults*. *J Clin Invest*, 1995. **95**(5): p. 2061-6.

125. Blaak, H., et al., *In vivo HIV-1 infection of CD45RA(+)CD4(+) T cells is established primarily by syncytium-inducing variants and correlates with the rate of CD4(+) T cell decline*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1269-74.
126. Chun, T.W., et al., *Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection [see comments]*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 183-8.
127. Levy, J.A., *Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection*. Microbiol Rev, 1993. **57**(1): p. 183-289.
128. Haase, A.T., *Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 625-56.
129. Koga, Y., et al., *High levels of heterodisperse RNAs accumulate in T cells infected with human immunodeficiency virus and in normal thymocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(12): p. 4521-5.
130. Pauza, C.D., J.E. Galindo, and D.D. Richman, *Reinfection results in accumulation of unintegrated viral DNA in cytopathic and persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of CEM cells*. J Exp Med, 1990. **172**(4): p. 1035-42.
131. Cao, J., et al., *Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 1996. **70**(3): p. 1340-54.
132. Casella, C.R. and T.H. Finkel, *Mechanisms of lymphocyte killing by HIV*. Curr Opin Hematol, 1997. **4**(1): p. 24-31.
133. Stewart, S.A., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces apoptosis following cell cycle arrest*. J Virol, 1997. **71**(7): p. 5579-92.
134. Ayyavoo, V., et al., *HIV-1 Vpr suppresses immune activation and apoptosis through regulation of nuclear factor kappa B [see comments]*. Nat Med, 1997. **3**(10): p. 1117-23.
135. Ahsan, N. and E. Langhoff, *Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus*. Semin Nephrol, 1998. **18**(4): p. 422-35.
136. Gandhi, R.T., et al., *HIV-1 directly kills CD4+ T cells by a Fas-independent mechanism*. J Exp Med, 1998. **187**(7): p. 1113-22.
137. Ascher, M.S. and H.W. Sheppard, *AIDS as immune system activation: a model for pathogenesis*. Clin Exp Immunol, 1988. **73**(2): p. 165-7.

138. Grossman, Z., et al., *Ongoing HIV dissemination during HAART*. Nat Med, 1999. **5**(10): p. 1099-104.
139. Hellerstein, M., et al., *Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1- infected humans [see comments]*. Nat Med, 1999. **5**(1): p. 83-9.
140. Kovacs, J.A., et al., *Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1731-41.
141. Kunkel, E.J., et al., *Expression of the chemokine receptors CCR4, CCR5, and CXCR3 by human tissue-infiltrating lymphocytes*. Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 347-55.
142. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis*. Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
143. Grossman, Z., et al., *Conservation of total T-cell counts during HIV infection: alternative hypotheses and implications*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **17**(5): p. 450-7.
144. Sachsenberg, N., et al., *Turnover of CD4+ and CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen*. J Exp Med, 1998. **187**(8): p. 1295-303.
145. Pakker, N.G., et al., *Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation [see comments]*. Nat Med, 1998. **4**(2): p. 208-14.
146. Saltini, C., et al., *Biased accumulation of T lymphocytes with "memory"-type CD45 leukocyte common antigen gene expression on the epithelial surface of the human lung*. J Exp Med, 1990. **171**(4): p. 1123-40.
147. Anton, P.A., et al., *Enhanced levels of functional HIV-1 co-receptors on human mucosal T cells demonstrated using intestinal biopsy tissue*. Aids, 2000. **14**(12): p. 1761-5.
148. Kewenig, S., et al., *Rapid mucosal CD4(+) T-cell depletion and enteropathy in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques*. Gastroenterology, 1999. **116**(5): p. 1115-23.
149. Smit-McBride, Z., et al., *Gastrointestinal T lymphocytes retain high potential for cytokine responses but have severe CD4(+) T-cell depletion at all stages of simian immunodeficiency virus infection compared to peripheral lymphocytes*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6646-56.

150. Veazey, R.S., et al., *Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection*. Science, 1998. **280**(5362): p. 427-31.
151. Vajdy, M., et al., *Differential effects of simian immunodeficiency virus infection on immune inductive and effector sites in the rectal mucosa of rhesus macaques*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 485-95.
152. Brenchley, J.M., et al., *CD4+ T Cell Depletion during all Stages of HIV Disease Occurs Predominantly in the Gastrointestinal Tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 749-59.
153. Mehandru, S., et al., *Primary HIV-1 Infection Is Associated with Preferential Depletion of CD4+ T Lymphocytes from Effector Sites in the Gastrointestinal Tract*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 761-70.
154. Schuurman, H.J., et al., *The thymus in acquired immune deficiency syndrome. Comparison with other types of immunodeficiency diseases, and presence of components of human immunodeficiency virus type 1*. Am J Pathol, 1989. **134**(6): p. 1329-38.
155. Papiernik, M., et al., *Thymic abnormalities in fetuses aborted from human immunodeficiency virus type 1 seropositive women*. Pediatrics, 1992. **89**(2): p. 297-301.
156. Rosenzweig, M., D.P. Clark, and G.N. Gaulton, *Selective thymocyte depletion in neonatal HIV-1 thymic infection*. Aids, 1993. **7**(12): p. 1601-5.
157. Haynes, B.F., et al., *Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection*. J Clin Invest, 1999. **103**(4): p. 453-60.
158. Zaitseva, M.B., et al., *CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3103-13.
159. Kitchen, S.G. and J.A. Zack, *CXCR4 expression during lymphopoiesis: implications for human immunodeficiency virus type 1 infection of the thymus*. J Virol, 1997. **71**(9): p. 6928-34.
160. Berkowitz, R.D., et al., *CCR5- and CXCR4-utilizing strains of human immunodeficiency virus type 1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 10108-17.
161. Clark, D.R., et al., *Peripheral blood from human immunodeficiency virus type 1-infected patients displays diminished T cell generation capacity*. J Infect Dis, 1997. **176**(3): p. 649-54.

162. Moses, A., J. Nelson, and G.C. Bagby, Jr., *The influence of human immunodeficiency virus-1 on hematopoiesis*. Blood, 1998. **91**(5): p. 1479-95.
163. Mir, N., et al., *HIV-disease and bone marrow changes: a study of 60 cases*. Eur J Haematol, 1989. **42**(4): p. 339-43.
164. Biberfeld, P., et al., *Immunohistopathology of lymph nodes in HTLV-III infected homosexuals with persistent adenopathy or AIDS*. Cancer Res, 1985. **45**(9 Suppl): p. 4665s-4670s.
165. Dummer, W., et al., *Autologous regulation of naive T cell homeostasis within the T cell compartment*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2460-8.
166. Kaldjian, E.P., et al., *Spatial and molecular organization of lymph node T cell cortex: a labyrinthine cavity bounded by an epithelium-like monolayer of fibroblastic reticular cells anchored to basement membrane-like extracellular matrix*. Int Immunol, 2001. **13**(10): p. 1243-53.
167. Margolick, J.B., et al., *Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. The Multicenter AIDS Cohort Study [see comments]*. Nat Med, 1995. **1**(7): p. 674-80.
168. Douek, D.C., L.J. Picker, and R.A. Koup, *T cell dynamics in HIV-1 infection*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 265-304.
169. Haynes, B.F., et al., *The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 529-60.
170. Gudmundsdottir, H. and L.A. Turka, *A closer look at homeostatic proliferation of CD4+ T cells: costimulatory requirements and role in memory formation*. J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3699-707.
171. Cohen Stuart, J., et al., *Reconstitution of naive T cells during antiretroviral treatment of HIV-infected adults is dependent on age*. Aids, 2002. **16**(17): p. 2263-6.
172. Fry, T.J., et al., *A potential role for interleukin-7 in T-cell homeostasis*. Blood, 2001. **97**(10): p. 2983-90.
173. Napolitano, L.A., et al., *Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 73-79.

174. Goodwin, R.G., et al., *Cloning of the human and murine interleukin-7 receptors: demonstration of a soluble form and homology to a new receptor superfamily*. Cell, 1990. **60**(6): p. 941-51.
175. Noguchi, M., et al., *Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-7 receptor*. Science, 1993. **262**(5141): p. 1877-80.
176. Lin, J.X., et al., *The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15*. Immunity, 1995. **2**(4): p. 331-9.
177. Peschon, J.J., et al., *Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice*. J Exp Med, 1994. **180**(5): p. 1955-60.
178. von Freeden-Jeffry, U., et al., *Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine*. J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1519-26.
179. Gutierrez-Ramos, J.C., C. Olsson, and R. Palacios, *Interleukin (IL1 to IL7) gene expression in fetal liver and bone marrow stromal clones: cytokine-mediated positive and negative regulation*. Exp Hematol, 1992. **20**(8): p. 986-90.
180. Madrigal-Estebas, L., et al., *Human small intestinal epithelial cells secrete interleukin-7 and differentially express two different interleukin-7 mRNA Transcripts: implications for extrathymic T-cell differentiation*. Hum Immunol, 1997. **58**(2): p. 83-90.
181. Heufler, C., et al., *Interleukin 7 is produced by murine and human keratinocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(3): p. 1109-14.
182. Golden-Mason, L., et al., *Expression of interleukin 7 (IL-7) mRNA and protein in the normal adult human liver: implications for extrathymic T cell development*. Cytokine, 2001. **14**(3): p. 143-51.
183. de Saint-Vis, B., et al., *The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1666-76.
184. Sorg, R.V., et al., *Human dendritic cells express functional interleukin-7*. Immunobiology, 1998. **198**(5): p. 514-26.
185. Kroncke, R., et al., *Human follicular dendritic cells and vascular cells produce interleukin-7: a potential role for interleukin-7 in the germinal center reaction*. Eur J Immunol, 1996. **26**(10): p. 2541-4.

186. Schluns, K.S., et al., *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo*. Nat Immunol, 2000. **1**(5): p. 426-32.
187. Plum, J., et al., *Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4239-45.
188. Sudo, T., et al., *Interleukin 7 production and function in stromal cell-dependent B cell development*. J Exp Med, 1989. **170**(1): p. 333-8.
189. Yu, Q., et al., *IL-7 Receptor Signals Inhibit Expression of Transcription Factors TCF-1, LEF-1, and ROR{gamma}: Impact on Thymocyte Development*. J Exp Med, 2004. **200**(6): p. 797-803.
190. Namen, A.E., et al., *B cell precursor growth-promoting activity. Purification and characterization of a growth factor active on lymphocyte precursors*. J Exp Med, 1988. **167**(3): p. 988-1002.
191. Okamoto, Y., et al., *Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2851-8.
192. Grabstein, K.H., et al., *Regulation of T cell proliferation by IL-7*. J Immunol, 1990. **144**(8): p. 3015-20.
193. Borger, P., et al., *IL-7 differentially modulates the expression of IFN-gamma and IL-4 in activated human T lymphocytes by transcriptional and post-transcriptional mechanisms*. J Immunol, 1996. **156**(4): p. 1333-8.
194. Gringhuis, S.I., et al., *Interleukin-7 upregulates the interleukin-2-gene expression in activated human T lymphocytes at the transcriptional level by enhancing the DNA binding activities of both nuclear factor of activated T cells and activator protein-1*. Blood, 1997. **90**(7): p. 2690-700.
195. Jourdan, P., et al., *Cytokines and cell surface molecules independently induce CXCR4 expression on CD4+ CCR7+ human memory T cells*. J Immunol, 2000. **165**(2): p. 716-24.
196. Boise, L.H., et al., *Growth factors can enhance lymphocyte survival without committing the cell to undergo cell division*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(12): p. 5491-5.
197. Vella, A.T., et al., *Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3810-5.
198. Fry, T.J., et al., *Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts*. Blood, 2001. **97**(6): p. 1525-33.

199. Tan, J.T., et al., *IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **10**: p. 10.
200. Mackall, C.L., et al., *IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1491-7.
201. McCune, J.M., et al., *High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection [see comments]*. J Clin Invest, 1998. **101**(11): p. 2301-8.
202. Smith, K.Y., et al., *Thymic size and lymphocyte restoration in patients with human immunodeficiency virus infection after 48 weeks of zidovudine, lamivudine, and ritonavir therapy*. J Infect Dis, 2000. **181**(1): p. 141-7.
203. Vignano, A., et al., *Early immune reconstitution after potent antiretroviral therapy in HIV-infected children correlates with the increase in thymus volume*. Aids, 2000. **14**(3): p. 251-61.
204. Douek, D.C., et al., *Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection [see comments]*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 690-5.
205. Okamoto, Y., et al., *Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function*. Blood, 2002. **99**(8): p. 2851-8.
206. Fry, T.J., et al., *IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected nonhuman primates*. Blood, 2003. **101**(6): p. 2294-9.
207. Alpdogan, O., et al., *IL-7 enhances peripheral T cell reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 1095-107.
208. Bolotin, E., et al., *Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count*. Bone Marrow Transplant, 1999. **23**(8): p. 783-8.
209. Mackall, C.L., et al., *Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy*. N Engl J Med, 1995. **332**(3): p. 143-9.
210. Sheppard, H.W., et al., *The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels*. AIDS, 1993. **7**(9): p. 1159-66.
211. Munoz, A., et al., *Long-term survivors with HIV-1 infection: incubation period and longitudinal patterns of CD4+ lymphocytes*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1995. **8**(5): p. 496-505.

212. Clerici, M., et al., *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**(6): p. 1012-9.
213. Rowland-Jones, S., et al., *HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 59-64.
214. Fowke, K.R., et al., *Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya [see comments]*. Lancet, 1996. **348**(9038): p. 1347-51.
215. Barcellini, W., et al., *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**(7): p. 691-4.
216. Rowland-Jones, S.L., et al., *HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant*. Lancet, 1993. **341**(8849): p. 860-1.
217. Roos, M.T., et al., *Viral phenotype and immune response in primary human immunodeficiency virus type 1 infection*. J Infect Dis, 1992. **165**(3): p. 427-32.
218. Tersmette, M., et al., *Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality*. Lancet, 1989. **1**(8645): p. 983-5.
219. Richman, D.D. and S.A. Bozzette, *The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression*. J Infect Dis, 1994. **169**(5): p. 968-74.
220. Connor, R.I., et al., *Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals*. J Exp Med, 1997. **185**(4): p. 621-8.
221. Bjorndal, A., et al., *Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype*. J Virol, 1997. **71**(10): p. 7478-87.
222. Shioda, T., J.A. Levy, and C. Cheng-Mayer, *Small amino acid changes in the V3 hypervariable region of gp120 can affect the T-cell-line and macrophage tropism of human immunodeficiency virus type 1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(20): p. 9434-8.
223. Wei, X., et al., *Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 117-22.

224. Coffin, J.M., *HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy [see comments]*. Science, 1995. **267**(5197): p. 483-9.
225. Goulder, P.J., et al., *Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 212-7.
226. Price, D.A., et al., *Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(5): p. 1890-5.
227. Borrow, P., et al., *Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus [see comments]*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 205-11.
228. Collins, K.L., et al., *HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes*. Nature, 1998. **391**(6665): p. 397-401.
229. Pantaleo, G., et al., *Evidence for rapid disappearance of initially expanded HIV-specific CD8+ T cell clones during primary HIV infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(18): p. 9848-53.
230. McKinney, D.M., et al., *The antiviral activity of HIV-specific CD8+ CTL clones is limited by elimination due to encounter with HIV-infected targets*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 861-7.
231. Finzi, D., et al., *Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy [see comments]*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1295-300.
232. Wong, J.K., et al., *Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia [see comments]*. Science, 1997. **278**(5341): p. 1291-5.
233. Kirchhoff, F., et al., *Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection [see comments]*. N Engl J Med, 1995. **332**(4): p. 228-32.
234. Greenough, T.C., J.L. Sullivan, and R.C. Desrosiers, *Declining CD4 T-cell counts in a person infected with nef-deleted HIV-1 [letter]*. N Engl J Med, 1999. **340**(3): p. 236-7.
235. Chowers, M.Y., et al., *Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene*. J Virol, 1994. **68**(5): p. 2906-14.

236. Garcia, J.V. and A.D. Miller, *Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef*. *Nature*, 1991. **350**(6318): p. 508-11.
237. Miller, M.D., et al., *The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages*. *J Exp Med*, 1994. **179**(1): p. 101-13.
238. Miller, M.D., et al., *Expression of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nef gene during HIV-1 production increases progeny particle infectivity independently of gp160 or viral entry*. *J Virol*, 1995. **69**(1): p. 579-84.
239. Kanki, P.J., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 subtypes differ in disease progression*. *J Infect Dis*, 1999. **179**(1): p. 68-73.
240. Galai, N., et al., *African HIV-1 subtype C and rate of progression among Ethiopian immigrants in Israel [letter]*. *Lancet*, 1997. **349**(9046): p. 180-1.
241. Kuanusont, C., et al., *HIV-1 subtypes and male-to-female transmission in Thailand*. *Lancet*, 1995. **345**(8957): p. 1078-83.
242. Del Amo, J., et al., *Disease progression and survival in HIV-1-infected Africans in London*. *AIDS*, 1998. **12**(10): p. 1203-9.
243. Tapia, N., et al., *Influence of human immunodeficiency virus type 1 subtype on mother-to-child transmission*. *J Gen Virol*, 2003. **84**(Pt 3): p. 607-13.
244. Kalams, S.A., et al., *Association between Virus-Specific Cytotoxic T-Lymphocyte and Helper Responses in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection*. *J Virol*, 1999. **73**(8): p. 6715-6720.
245. Schmidt, G., et al., *Densitometric analysis of Western blot (immunoblot) assays for human immunodeficiency virus antibodies and correlation with clinical status*. *J Clin Microbiol*, 1987. **25**(10): p. 1993-8.
246. Cheingsong-Popov, R., et al., *Relation between humoral responses to HIV gag and env proteins at seroconversion and clinical outcome of HIV infection*. *Bmj*, 1991. **302**(6767): p. 23-6.
247. Montefiori, D.C., et al., *Neutralizing and infection-enhancing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in long-term nonprogressors*. *J Infect Dis*, 1996. **173**(1): p. 60-7.
248. Lifson, A.R., et al., *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**(5): p. 959-65.

249. Moriuchi, H., et al., *CD8+ T-cell-derived soluble factor(s), but not beta-chemokines RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta, suppress HIV-1 replication in monocyte/macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(26): p. 15341-5.
250. Abdelwahab, S.F., et al., *HIV-1-suppressive factors are secreted by CD4+ T cells during primary immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 15006-10.
251. Arai, K.I., et al., *Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 783-836.
252. Balkwill, F.R. and F. Burke, *The cytokine network*. Immunol Today, 1989. **10**(9): p. 299-304.
253. Powrie, F. and R.L. Coffman, *Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention*. Immunol Today, 1993. **14**(6): p. 270-4.
254. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
255. Romagnani, S., *Lymphokine production by human T cells in disease states*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 227-57.
256. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
257. Moonis, M., et al., *CCR5 and CXCR4 expression correlated with X4 and R5 HIV-1 infection yet not sustained replication in Th1 and Th2 cells*. Aids, 2001. **15**(15): p. 1941-9.
258. Clerici, M. and G.M. Shearer, *A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection [see comments]*. Immunol Today, 1993. **14**(3): p. 107-11.
259. Tanaka, M., et al., *Reduction in interleukin-2-producing cells but not Th1 to Th2 shift in moderate and advanced stages of human immunodeficiency virus type-1-infection: direct analysis of intracellular cytokine concentrations in CD4+ CD8-T cells*. Scand J Immunol, 1999. **50**(5): p. 550-4.
260. Folks, T.M., et al., *Cytokine-induced expression of HIV-1 in a chronically infected promonocyte cell line*. Science, 1987. **238**(4828): p. 800-2.
261. Duh, E.J., et al., *Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(15): p. 5974-8.

262. Osborn, L., S. Kunkel, and G.J. Nabel, *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(7): p. 2336-40.
263. Baier, M., et al., *HIV suppression by interleukin-16 [letter; comment] [see comments]*. Nature, 1995. **378**(6557): p. 563.
264. Valentin, A., et al., *Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: implications for viral phenotypic switch and disease progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8886-91.
265. Kinter, A.L., et al., *HIV replication in IL-2-stimulated peripheral blood mononuclear cells is driven in an autocrine/paracrine manner by endogenous cytokines*. J Immunol, 1995. **154**(5): p. 2448-59.
266. Poli, G. and A.S. Fauci, *The effect of cytokines and pharmacologic agents on chronic HIV infection*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1992. **8**(2): p. 191-7.
267. Buonaguro, L., et al., *Effects of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the expression of inflammatory cytokines*. J Virol, 1992. **66**(12): p. 7159-67.
268. De Francesco, M.A., et al., *HIV-1 matrix protein p17 increases the production of proinflammatory cytokines and counteracts IL-4 activity by binding to a cellular receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(15): p. 9972-7.
269. Weissman, D., G. Poli, and A.S. Fauci, *Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 induction of virus*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1994. **10**(10): p. 1199-206.
270. Wang, J., et al., *IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(5): p. 642-9.
271. Kwa, D., et al., *Association between an interleukin-4 promoter polymorphism and the acquisition of CXCR4 using HIV-1 variants*. Aids, 2003. **17**(7): p. 981-5.
272. Pedroza-Martins, L., et al., *Impact of cytokines on replication in the thymus of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from infants*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 6929-43.
273. Dean, M., et al., *Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene*. Hemophilia Growth and

- Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study [see comments] [published erratum appears in Science 1996 Nov 15;274(5290):1069]. Science, 1996. 273(5283): p. 1856-62.*
274. Liu, R., et al., *Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply- exposed individuals to HIV-1 infection.* Cell, 1996. **86**(3): p. 367-77.
275. Michael, N.L., et al., *Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta32.* J Virol, 1998. **72**(7): p. 6040-7.
276. Huang, Y., et al., *The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression [see comments].* Nat Med, 1996. **2**(11): p. 1240-3.
277. Zimmerman, P.A., et al., *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**(1): p. 23-36.
278. McDermott, D.H., et al., *CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. Multicenter AIDS Cohort Study (MACS).* Lancet, 1998. **352**(9131): p. 866-70.
279. Quillent, C., et al., *HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene [see comments].* Lancet, 1998. **351**(9095): p. 14-8.
280. Kostrikis, L.G., et al., *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**(12): p. 10264-71.
281. Reynes, J., et al., *CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1.* J Infect Dis, 2000. **181**(3): p. 927-32.
282. Kostrikis, L.G., et al., *A chemokine receptor CCR2 allele delays HIV-1 disease progression and is associated with a CCR5 promoter mutation [see comments].* Nat Med, 1998. **4**(3): p. 350-3.

283. Anzala, A.O., et al., *CCR2-64I allele and genotype association with delayed AIDS progression in African women. University of Nairobi Collaboration for HIV Research [letter]*. Lancet, 1998. **351**(9116): p. 1632-3.
284. Zou, Y.R., et al., *Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 595-9.
285. Ostrowski, M.A., et al., *Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals*. J Immunol, 1998. **161**(6): p. 3195-201.
286. Derdeyn, C.A., et al., *Correlation between circulating stromal cell-derived factor 1 levels and CD4+ cell count in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals*. AIDS Res Hum Retroviruses, 1999. **15**(12): p. 1063-71.
287. Ikegawa, M., et al., *Elevated plasma stromal cell-derived factor 1 protein level in the progression of hiv type 1 infection/aids*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2001. **17**(7): p. 587-95.
288. Soriano, A., et al., *Plasma stromal cell-derived factor (SDF)-1 levels, SDF1-3'A genotype, and expression of CXCR4 on T lymphocytes: their impact on resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection and its progression*. J Infect Dis, 2002. **186**(7): p. 922-31.
289. Winkler, C., et al., *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) [see comments]*. Science, 1998. **279**(5349): p. 389-93.
290. Hendel, H., et al., *Distinctive effects of CCR5, CCR2, and SDF1 genetic polymorphisms in AIDS progression*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1998. **19**(4): p. 381-6.
291. van Rij, R.P., et al., *The role of a stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant in the clinical course of HIV-1 infection*. AIDS, 1998. **12**(9): p. F85-90.
292. Brambilla, A., et al., *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**(1): p. 311-5.
293. Balotta, C., et al., *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**(2): p. 285-9.

294. Malnati, M.S., et al., *Increased plasma levels of the C-C chemokine RANTES in patients with primary HIV-1 infection*. J Biol Regul Homeost Agents, 1997. **11**(1-2): p. 40-2.
295. Aukrust, P., F. Muller, and S.S. Froland, *Circulating levels of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection: effect of potent antiretroviral therapy*. J Infect Dis, 1998. **177**(4): p. 1091-6.
296. Clerici, M., et al., *Chemokine production in HIV-seropositive long-term asymptomatic individuals*. AIDS, 1996. **10**(12): p. 1432-3.
297. Scala, E., et al., *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**(9): p. 4485-92.
298. Polo, S., et al., *Longitudinal analysis of serum chemokine levels in the course of HIV-1 infection*. AIDS, 1999. **13**(4): p. 447-54.
299. Saha, K., et al., *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**(1): p. 876-81.
300. Cocchi, F., et al., *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**(25): p. 13812-7.
301. Weinberg, A., S. Krisanaprakornkit, and B.A. Dale, *Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications*. Crit Rev Oral Biol Med, 1998. **9**(4): p. 399-414.
302. Quinones-Mateu, M.E., et al., *Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication*. Aids, 2003. **17**(16): p. F39-48.
303. Kaslow, R.A., et al., *Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection*. Nat Med, 1996. **2**(4): p. 405-11.
304. Kroner, B.L., et al., *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**(3): p. 275-80.

305. Plummer, F.A., et al., *Resistance to HIV-1 infection among highly exposed sex workers in Nairobi: what mediates protection and why does it develop?* Immunol Lett, 1999. **66**(1-3): p. 27-34.
306. Goletti, D., et al., *Effect of Mycobacterium tuberculosis on HIV replication. Role of immune activation.* J Immunol, 1996. **157**(3): p. 1271-8.
307. Grivel, J.C., et al., *Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6.* Nat Med, 2001. **7**(11): p. 1232-5.
308. Fauci, A.S., *Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease.* Nature, 1996. **384**(6609): p. 529-34.
309. Glushakova, S., et al., *Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency.* Nat Med, 1998. **4**(3): p. 346-9.
310. Este, J.A., et al., *Shift of clinical human immunodeficiency virus type 1 isolates from X4 to R5 and prevention of emergence of the syncytium-inducing phenotype by blockade of CXCR4.* J Virol, 1999. **73**(7): p. 5577-85.
311. Mummidi, S., et al., *Genealogy of the CCR5 locus and chemokine system gene variants associated with altered rates of HIV-1 disease progression.* Nat Med, 1998. **4**(7): p. 786-93.
312. Pablos, J.L., et al., *Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin.* Am J Pathol, 1999. **155**(5): p. 1577-86.
313. Poznansky, M.C., et al., *Active movement of T cells away from a chemokine.* Nat Med, 2000. **6**(5): p. 543-8.
314. Jansson, M., et al., *Coreceptor usage and RANTES sensitivity of non-syncytium-inducing HIV-1 isolates obtained from patients with AIDS.* J Hum Virol, 1999. **2**(6): p. 325-38.
315. Berger, E.A., P.M. Murphy, and J.M. Farber, *Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 657-700.
316. Koot, M., et al., *Prognostic value of HIV-1 syncytium-inducing phenotype for rate of CD4+ cell depletion and progression to AIDS [see comments].* Ann Intern Med, 1993. **118**(9): p. 681-8.
317. Kitchen, S.G., C.H. Uittenbogaart, and J.A. Zack, *Mechanism of human immunodeficiency virus type 1 localization in CD4-negative thymocytes: differentiation from a CD4-positive precursor allows productive infection.* J Virol, 1997. **71**(8): p. 5713-22.

318. Ho, D.D., et al., *Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection [see comments]*. Nature, 1995. **373**(6510): p. 123-6.
319. Leonard, R., et al., *Cytopathic effect of human immunodeficiency virus in T4 cells is linked to the last stage of virus infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(10): p. 3570-4.
320. Hazenberg, M.D., et al., *T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 285-9.
321. Hazenberg, M.D., et al., *Increased cell division but not thymic dysfunction rapidly affects the T-cell receptor excision circle content of the naive T cell population in HIV-1 infection [In Process Citation]*. Nat Med, 2000. **6**(9): p. 1036-42.
322. Hazenberg, M.D., et al., *T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART)*. Blood, 2000. **95**(1): p. 249-55.
323. Ho, D.D., et al., *Recombinant human interferon alfa-A suppresses HTLV-III replication in vitro*. Lancet, 1985. **1**(8429): p. 602-4.
324. Sudo, T., et al., *Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(19): p. 9125-9.
325. Wolf, S.S. and A. Cohen, *Expression of cytokines and their receptors by human thymocytes and thymic stromal cells*. Immunology, 1992. **77**(3): p. 362-8.
326. Namen, A.E., et al., *Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7*. Nature, 1988. **333**(6173): p. 571-3.
327. Chene, L., et al., *Thymocyte-thymic epithelial cell interaction leads to high-level replication of human immunodeficiency virus exclusively in mature CD4(+) CD8(-) CD3(+) thymocytes: a critical role for tumor necrosis factor and interleukin-7*. J Virol, 1999. **73**(9): p. 7533-42.
328. Chene, L., et al., *High-level replication of human immunodeficiency virus in thymocytes requires NF-kappaB activation through interaction with thymic epithelial cells*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 2064-73.
329. Uittenbogaart, C.H., et al., *Effect of cytokines on HIV-induced depletion of thymocytes in vivo [In Process Citation]*. Aids, 2000. **14**(10): p. 1317-25.

330. Weitzmann, M.N., et al., *Interleukin-7 stimulates osteoclast formation by up-regulating the T-cell production of soluble osteoclastogenic cytokines*. *Blood*, 2000. **96**(5): p. 1873-8.
331. Berkowitz, R.D., S. Alexander, and J.M. McCune, *Causal relationships between HIV-1 coreceptor utilization, tropism, and pathogenesis in human thymus [In Process Citation]*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. **16**(11): p. 1039-45.
332. Bonyhadi, M.L., et al., *HIV induces thymus depletion in vivo*. *Nature*, 1993. **363**(6431): p. 728-32.
333. Stanley, S.K., et al., *Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse*. *J Exp Med*, 1993. **178**(4): p. 1151-63.
334. Llano, A., et al., *Stromal-cell-derived factor 1 prevents the emergence of the syncytium-inducing phenotype of HIV-1 in vivo*. *Aids*, 2001. **15**(14): p. 1890-2.
335. Ioannidis, J.P., et al., *Effects of CCR5-Delta32, CCR2-64I, and SDF-1 3'A alleles on HIV-1 disease progression: An international meta-analysis of individual-patient data*. *Ann Intern Med*, 2001. **135**(9): p. 782-95.
336. Walker, C.M., et al., *CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication*. *Science*, 1986. **234**(4783): p. 1563-6.
337. Blackbourn, D.J., et al., *Suppression of HIV replication by lymphoid tissue CD8+ cells correlates with the clinical state of HIV-infected individuals*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(23): p. 13125-30.
338. Paxton, W.A., et al., *Relative resistance to HIV-1 infection of CD4 lymphocytes from persons who remain uninfected despite multiple high-risk sexual exposure*. *Nat Med*, 1996. **2**(4): p. 412-7.
339. Furci, L., et al., *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**(3): p. 455-60.
340. Zagury, D., et al., *C-C chemokines, pivotal in protection against HIV type 1 infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(7): p. 3857-61.
341. Rosenberg, E.S., et al., *Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia*. *Science*, 1997. **278**(5342): p. 1447-50.
342. Zagury, D., et al., *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**(7): p. 3851-6.

343. Garzino-Demo, A., et al., *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**(21): p. 11986-91.
344. Paxton, W.A., et al., *RANTES production from CD4+ lymphocytes correlates with host genotype and rates of human immunodeficiency virus type 1 disease progression*. J Infect Dis, 2001. **183**(11): p. 1678-81.
345. Mackewicz, C.E., et al., *Do beta-chemokines have clinical relevance in HIV infection?* J Clin Invest, 1997. **100**(4): p. 921-30.
346. McKenzie, S.W., et al., *Serum chemokine levels in patients with non-progressing HIV infection*. AIDS, 1996. **10**(9): p. F29-33.
347. Vicenzi, E., et al., *Hemophilia and nonprogressing human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]*. Blood, 1997. **89**(1): p. 191-200.
348. Weiss, L., et al., *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**(6): p. 1621-4.
349. Zanussi, S., et al., *Serum levels of RANTES and MIP-1 alpha in HIV-positive long-term survivors and progressor patients*. AIDS, 1996. **10**(12): p. 1431-2.
350. Swingler, S., et al., *HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages*. Nat Med, 1999. **5**(9): p. 997-103.
351. Gordon, C.J., et al., *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**(1): p. 684-94.
352. Trkola, A., et al., *The CC-chemokine RANTES increases the attachment of human immunodeficiency virus type 1 to target cells via glycosaminoglycans and also activates a signal transduction pathway that enhances viral infectivity*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6370-9.
353. Llano, A., et al., *Interleukin-7 in plasma correlates with CD4 T-cell depletion and may be associated with emergence of syncytium-inducing variants in human immunodeficiency virus type 1-positive individuals*. J Virol, 2001. **75**(21): p. 10319-25.
354. Steffens, C.M., et al., *Interleukin-7-treated naive T cells can be productively infected by T- cell-adapted and primary isolates of human immunodeficiency virus 1*. Blood, 2002. **99**(9): p. 3310-8.

355. Holme, P.A., et al., *Enhanced activation of platelets with abnormal release of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection*. FASEB J, 1998. **12**(1): p. 79-89.
356. Grivel, J.C. and L.B. Margolis, *CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue*. Nat Med, 1999. **5**(3): p. 344-6.
357. Barretina, J., et al., *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**(4): p. 461-7.
358. Malnati, M.S., et al., *Increased plasma levels of the C-C chemokine RANTES in patients with primary HIV- 1 infection*. J Biol Regul Homeost Agents, 1997. **11**(1-2): p. 40-2.
359. Douek, D.C., et al., *HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells*. Nature, 2002. **417**(6884): p. 95-8.
360. Fry, T.J., et al., *IL-7 therapy dramatically alters peripheral T-cell homeostasis in normal and SIV-infected non-human primates*. Blood, 2002. **31**: p. 31.
361. Wagner, L., et al., *Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans*. Nature, 1998. **391**(6670): p. 908-11.
362. Ruiz, L., et al., *HIV dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection*. AIDS, 2001. **15**(9): p. F19-27.
363. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: from bench to clinic*. Blood, 2002. **99**(11): p. 3892-904.
364. Berger, E.A., et al., *A new classification for HIV-1 [letter]*. Nature, 1998. **391**(6664): p. 240.
365. Llano, A., et al., *Interleukin-7-Dependent Production of RANTES That Correlates with Human Immunodeficiency Virus Disease Progression*. J Virol, 2003. **77**(7): p. 4389-95.
366. Este, J.A., et al., *Development of resistance of human immunodeficiency virus type 1 to dextran sulfate associated with the emergence of specific mutations in the envelope gp120 glycoprotein*. Mol Pharmacol, 1997. **52**(1): p. 98-104.
367. Zaitseva, M., et al., *Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2609-17.

368. Dezzutti, C.S., et al., *Stromal-derived factor-1 chemokine gene variant is associated with the delay of HIV-1 disease progression in two longitudinal cohorts*. *Aids*, 2000. **14**(7): p. 894-6.
369. Meyer, L., et al., *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**(5): p. 624-6.
370. Fry, T.J. and C.L. Mackall, *Interleukin-7: master regulator of peripheral T-cell homeostasis?* *Trends Immunol*, 2001. **22**(10): p. 564-71.
371. Ducrey-Rundquist, O., M. Guyader, and D. Trono, *Modalities of interleukin-7-induced human immunodeficiency virus permissiveness in quiescent T lymphocytes*. *J Virol*, 2002. **76**(18): p. 9103-11.
372. Scripture-Adams, D.D., et al., *Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype*. *J Virol*, 2002. **76**(24): p. 13077-82.
373. Nugeyre, M.T., et al., *IL-7 stimulates T cell renewal without increasing viral replication in simian immunodeficiency virus-infected macaques*. *J Immunol*, 2003. **171**(8): p. 4447-53.
374. Dardalhon, V., et al., *IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(16): p. 9277-82.
375. Romano, J.W., et al., *RANTES and MIP-1beta mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells: transcript quantification using NASBA technology*. *J Immunol Methods*, 2001. **255**(1-2): p. 115-24.
376. Muller, P., et al., *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**(4): p. 263-70.
377. Oliva, A., et al., *Natural killer cells from human immunodeficiency virus (HIV)-infected individuals are an important source of CC-chemokines and suppress HIV-1 entry and replication in vitro*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(1): p. 223-31.
378. Kameyoshi, Y., et al., *Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils*. *J Exp Med*, 1992. **176**(2): p. 587-92.

379. Mayanja-Kizza, H., et al., *Activation of beta-chemokines and CCR5 in persons infected with human immunodeficiency virus type 1 and tuberculosis.* J Infect Dis, 2001. **183**(12): p. 1801-4.
380. Vlahakis, S.R., et al., *G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways.* J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5546-54.
381. Marozsan, A.J., et al., *Mechanisms involved in stimulation of human immunodeficiency virus type 1 replication by aminooxypentane RANTES.* J Virol, 2001. **75**(18): p. 8624-38.
382. Dolei, A., et al., *Increased replication of T-cell-tropic HIV strains and CXC-chemokine receptor-4 induction in T cells treated with macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta and RANTES beta-chemokines.* AIDS, 1998. **12**(2): p. 183-90.
383. Kelly, M.D., et al., *Dichotomous effects of beta-chemokines on HIV replication in monocytes and monocyte-derived macrophages.* J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3091-5.
384. Kinter, A., et al., *CC-chemokines enhance the replication of T-tropic strains of HIV-1 in CD4(+) T cells: role of signal transduction.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11880-5.
385. Marechal, V., et al., *Opposite effects of SDF-1 on human immunodeficiency virus type 1 replication.* J Virol, 1999. **73**(5): p. 3608-15.