

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIÓLOGICAS

Departamento de Biología Celular



**RECUPERACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO EN
NIÑOS INFECTADOS POR EL VIH-1 EFECTOS DE LA
TERAPIA ANTIRRETROVIRAL**

**MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE
DOCTOR POR**

Rafael Correa Rocha

Bajo la dirección de la Doctora:

María Ángeles Muñoz-Fernández

Madrid, 2004

ISBN: 84-669-2469-8

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular



RECUPERACIÓN DEL SISTEMA
INMUNOLÓGICO EN NIÑOS INFECTADOS POR
EL VIH-1. EFECTOS DE LA TERAPIA
ANTIRRETROVIRAL

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por

RAFAEL CORREA ROCHA

Madrid, 2004

Tesis Doctoral

RECUPERACIÓN DEL SISTEMA INMUNOLÓGICO EN NIÑOS INFECTADOS POR EL VIH-1. EFECTOS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por el licenciado:

Rafael Correa Rocha

Director de Tesis:

Dra. M^a Ángeles Muñoz-Fernández

Doctora en Ciencias Biológicas, Doctora en Pediatría y Bióloga Adjunta del Servicio de Inmuno-Biología Molecular del Hospital Gregorio Marañón de Madrid.

V^oB^o El Director

*“Mi preocupación no es pensar
si soy grande o pequeño, sino si
crezco cada día.”*

Eduardo Chillida
(1924–2002)

A Marta, por 14 años de amistad

Agradecimientos

En primer lugar, y no es casual hacerlo en primer lugar, quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a la Dra. M^a Ángeles Muñoz Fernández, ella está haciendo posible que cumpla mi sueño de dedicarme a la investigación. Además de sus cualidades científicas y humanas, y su increíble capacidad de trabajo, ha hecho siempre todo lo posible y a veces lo imposible para satisfacer mis metas y objetivos científicos. Muchas gracias jefa.

A todos los miembros del laboratorio, que además de excelentes compañeros han sido buenos amigos. A Laura, Rosa, Elena, Áurea por su cariño y amistad. A José Luis por su ayuda y buen humor. José María por su apoyo estadístico incluso a 2000 Km. de distancia. A la Dra. Gurbindo por su inestimable ayuda y simpatía. A Milagros, Susana, Irene, Lola, Chelo, Isabel, Chusa, Alicia, Jesús, Jerónimo y todos los nuevos miembros que aún no he tenido la oportunidad de conocer, Almudena, Aránzazu, etc. Todos ellos han creado un ambiente óptimo tanto dentro como fuera del laboratorio.

Ya he perdido la cuenta de las cervezas que le debo a Salva por las muchas veces que me ha ayudado cada vez que le pedía algo desde Suiza. Siempre ha sido interesante y enriquecedor discutir con él nuestras ideas y dudas científicas, y también las no científicas...

No puedo dejar de mencionar a los buenos compañeros que tuve en la universidad y que a pesar de dispersar nuestras vidas por caminos muy diversos, seguimos manteniendo el contacto. A Belén, Lali, Alicia, Yago, Roberto, Israel, Álvaro, Javier, Jesús, Aurelio... un beso para ellas y abrazos para ellos.

También quiero mostrar mi agradecimiento a la Dra. Mónica de la Fuente, quien me introdujo en el mundo de la investigación dándome la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y a la Dra. Mónica del Río de la que tanto aprendí y que se ha convertido en gran amiga y modelo de persona.

A mi maravillosa familia. Diana y José, el nuevo miembro de la familia, por su apoyo incondicional, y a mis padres por todos los sacrificios que han hecho en su vida por mí y siguen haciendo. Sabéis que me cuesta expresar ciertas cosas, pero creo que sabéis lo que os quiero y lo que valoro todo lo que habéis hecho.

Je voudrais remercier aussi toutes les personnes du Laboratoire d'Immunopathologie du SIDA à Lausanne. Ils ont fait en sorte que je me suis senti vraiment à l'aise pendant la période que j'ai passée en Suisse.

Merci beaucoup au Professeur Giuseppe Pantaleo pour m'avoir offert la possibilité de travailler dans son laboratoire pendant ces deux ans.

Mes chaleureux remerciements à Radhika, Florence et Gianni. Ils ont été comme une famille pour moi pendant ces deux ans. Ils ont fait qu'à 2000 km de chez moi je ne me suis pas retrouvé seul.

A Massimo pour son excellent sens d'humour et son amitié, à Miguel, Alex et Gonzalo pour tous les moments drôles qu'on a passé ensemble - on a rigolé beaucoup ! A Patricia, Laura, Lucienne, Stefania, Cristina, Stéphanie, Elena, Valérie, Marie-Agnès, Donatella, Simone, Emmanuelle, Véronique, Séverine, Aude.... Tous ont été d'excellents collègues de travail et aussi de bons amis et ils ont créé une ambiance magnifique au laboratoire. Merci beaucoup.

Por último no puedo olvidar a los que, desafortunadamente, son los protagonistas de este trabajo... los niños.

Índice

| | |
|---|-----------|
| Agradecimientos..... | v |
| Índice..... | viii |
| Abreviaturas..... | xii |
| Summary..... | xv |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1 El virus de la Inmunodeficiencia Humana. Epidemiología del SIDA..... | 2 |
| 1.1.1 Estructura del VIH..... | 2 |
| 1.1.2 Ciclo de la infección | 5 |
| 1.1.3 Fenotipo viral y células diana del VIH | 7 |
| 1.1.4 Curso clínico de la infección por el VIH | 9 |
| 1.1.5 Mecanismos de transmisión..... | 13 |
| 1.1.6 Epidemiología..... | 13 |
| 1.1.6.1 Epidemia Mundial..... | 13 |
| 1.1.6.2 Epidemia en España..... | 14 |
| 1.2 Efectos Inmunológicos de la Infección por el VIH..... | 17 |
| 1.2.1 Efecto de la infección por el VIH sobre linfocitos T CD4+ | 17 |
| 1.2.2 Efecto de la infección por el VIH sobre linfocitos T CD8+ | 18 |
| 1.2.3 Efecto de la infección por el VIH sobre células B..... | 19 |
| 1.3 Transmisión Vertical del VIH. Infección Pediátrica..... | 21 |
| 1.3.1 Factores asociados a la transmisión vertical del VIH | 21 |
| 1.3.2 Tipos de transmisión vertical del VIH..... | 23 |
| 1.3.2.1 Infección prenatal o intrauterina..... | 23 |
| 1.3.2.2 Infección intraparto o perinatal..... | 23 |
| 1.3.3 Marcadores predictivos de la infección pediátrica por el VIH | 24 |
| 1.3.3.1 Recuento de linfocitos T CD4+ | 24 |
| 1.3.3.2 Recuento de linfocitos T CD8+ | 25 |
| 1.3.3.3 Carga viral plasmática | 26 |
| 1.3.3.4 Características biológicas de los aislados virales | 27 |
| 1.4 Respuesta Inmunológica y Mecanismos de Escape en la Infección por el VIH..... | 29 |
| 1.4.1 Respuesta humoral..... | 29 |
| 1.4.2 Respuesta celular | 30 |
| 1.4.2.1 Linfocitos T citotóxicos | 30 |
| 1.4.2.2 Linfocitos T CD4+..... | 31 |
| 1.4.3 Evasión viral de la respuesta inmune..... | 32 |
| 1.4.4 Terapias inmunoestimuladoras | 33 |
| 1.4.5 Papel del timo en la reconstitución inmune | 34 |
| 1.5 Terapias Antirretrovirales..... | 38 |
| 1.5.1 Tratamiento antirretroviral de la infección pediátrica por el VIH..... | 39 |
| 1.5.2 Estudios de resistencias en la infección pediátrica | 40 |
| 2. Objetivos | 41 |
| 3. Materiales y Métodos..... | 44 |
| 3.1 Sujetos de Estudio..... | 45 |
| 3.1.1 Análisis de la función tímica en la infección pediátrica | 45 |
| 3.1.2 Estudios de fenotipo viral | 45 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.1.3 | Determinación de los valores plasmáticos de IL-7 | 46 |
| 3.1.4 | Estudios de respuesta linfoproliferativa y producción de citocinas..... | 46 |
| 3.1.5 | Estudio de los valores de linfocitos T CD4+ VIH-específicos..... | 46 |
| 3.2 | Métodos de Estudio. | 48 |
| 3.2.1 | Procesamiento de las muestras | 48 |
| 3.2.1.1 | Extracción y procesamiento del suero | 48 |
| 3.2.1.2 | Extracción y procesamiento del plasma y células mononucleares de sangre periférica..... | 48 |
| 3.2.2 | Detección de anticuerpos anti-VIH. | 49 |
| 3.2.3 | Caracterización de los aislados virales | 49 |
| 3.2.3.1 | Cinética de replicación..... | 49 |
| 3.2.3.2 | Fenotipo del VIH | 49 |
| 3.2.4 | Cuantificación de carga viral | 50 |
| 3.2.5 | Determinación de poblaciones linfocitarias. | 50 |
| 3.2.5.1 | Cuantificación del porcentaje de linfocitos TCD4+ y TCD8+..... | 50 |
| 3.2.5.2 | Cuantificación del número absoluto de linfocitos TCD3+, TCD3+/CD4+ y TCD3+/CD8+ en sangre total..... | 51 |
| 3.2.5.3 | Descripción de la técnica de adquisición y análisis..... | 52 |
| 3.2.6 | Cuantificación de linfocitos T CD4+ VIH-específicos. | 53 |
| 3.2.7 | Cultivos celulares. | 53 |
| 3.2.7.1 | Cultivos de líneas celulares..... | 53 |
| 3.2.7.2 | Cultivo de PBMCs | 54 |
| 3.2.7.3 | Proliferación celular..... | 54 |
| 3.2.7.4 | Producción de citocinas por las PBMCs en cultivo..... | 55 |
| 3.2.7.5 | Cuantificación de la concentración plasmática de IL-7..... | 55 |
| 3.2.8 | Determinación de la producción tímica de nuevos linfocitos T | 56 |
| 3.2.8.1 | Extracción de DNA..... | 57 |
| 3.2.8.2 | Recta patrón | 57 |
| 3.2.8.3 | Control interno | 58 |
| 3.2.8.4 | Condiciones de la PCR | 59 |
| 3.3 | Análisis Estadístico. | 61 |
| 3.3.1 | Procesamiento de los datos | 61 |
| 3.3.2 | Análisis de distribución de variables | 61 |
| 3.3.3 | Métodos paramétricos..... | 62 |
| 3.3.4 | Métodos no paramétricos..... | 63 |
| 4. | Resultados. | 64 |
| 4.1 | Efecto de la Infección por el VIH sobre la Función Tímica..... | 65 |
| 4.2 | Importancia de la Función Tímica en Niños Infectados por el VIH..... | 68 |
| 4.3 | Efecto del Fenotipo Viral sobre la Función Tímica..... | 72 |
| 4.4 | Efecto de la Terapia Antirretroviral en la Recuperación de Linfocitos T CD4+.. | 74 |
| 4.5 | Papel de la Interleucina-7 en la Homeostasis de Linfocitos T CD4+..... | 75 |
| 4.6 | Respuestas Linfoproliferativas y Producción de Citocinas. | 77 |
| 4.7 | Respuestas VIH-específicas de los Linfocitos T CD4+..... | 79 |
| 5. | Publicaciones | 86 |
| | Artículo 1. Correa <i>et al. Pediatric Research</i> 52:207-212, 2002..... | 87 |
| | Artículo 2. Resino, Correa <i>et al. Clin. Exp. Immunol.</i> 132:105-112, 2003..... | 94 |
| | Artículo 3. Correa <i>et al. AIDS</i> 15:1959-1963, 2001..... | 102 |
| | Artículo 4. Correa <i>et al. AIDS</i> 16:1181-1187, 2002..... | 107 |

| | |
|--|------------|
| Artículo 5. Resino, Correa <i>et al.</i> <i>AIDS Res.Hum.Retroviruses</i> 18:1395-1406, 2002 | 110 |
| Artículo 6. Correa <i>et al.</i> <i>J. Clin. Immunol.</i> 23:401-406, 2003 | 122 |
| 6. Discusión | 128 |
| 6.1 Función Tímica en la Infección Pediátrica por el VIH..... | 132 |
| 6.2 Repoblación de Linfocitos T CD4+ tras la Terapia Antirretroviral..... | 138 |
| 6.3 Implicación de la Interleucina -7 en la Homeostasis de Linfocitos T CD4+..... | 140 |
| 6.4 Recuperación de Respuestas Inmunológicas tras la Reconstitución Inmune. | 143 |
| 7. Conclusiones | 151 |
| 8. Bibliografía | 153 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| Ag | Antígeno |
| AIDS | Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Acquired Immune Deficiency Syndrome) |
| CDC | Centro para el control y prevención de enfermedades (Center for Disease Control and Prevention) |
| CMV | Citomegalovirus |
| CTL | Linfocito T citotóxico (Cytotoxic T Lymphocyte) |
| CV | Carga Viral |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico (Desoxiribonucleic Acid) |
| E.E.M. | Error Estándar de la Media |
| ETS | Enfermedades de Transmisión Sexual |
| FITC | Isotiocianato de Fluoresceína |
| HAART | Terapia antirretroviral de alta eficacia (Highly active antiretroviral therapy) |
| HIV | Virus de la inmunodeficiencia humana (Human Immunodeficiency Virus) |
| HLA | Antígeno mayor de histocompatibilidad |
| HTLV | Virus linfotrópico T humano (Human T-lymphotropic virus) |
| IL-7 | Interleucina 7 |
| LTA | Asintomático a largo plazo (Long-Term Asymptomatic) |
| LTNP | No progresor a largo plazo (Long-term Non Progresor) |
| LTR | Secuencias repetidas largas (Long Terminal Repeat) |
| MHC | Complejo mayor de histocompatibilidad |
| MIP | Proteína inflamatoria de macrófagos (Macrophage Inflammatory Protein) |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero (Messenger Ribonucleic Acid) |
| NK | Células “asesinas naturales” (Natural Killer) |
| NSI | No formadoras de sincitios (Non-Syncytium Inducing) |

| | |
|--------------------|--|
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| Pb | Pares de bases |
| PBMCs | Células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells) |
| PBS | Tampón salino-fosfato (Phosphate Buffer Saline) |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) |
| PE | Ficoeritrina |
| PerCP | Proteína peridín clorofila |
| PHA | Fitohemaglutinina (Phytohemagglutinin) |
| RNA | Ácido ribonucleico (Ribonucleic Acid) |
| RP | Procesor rápido (Rapid Progressor) |
| RT | Retro-transcriptasa |
| SI | Formadoras de sincitios (Syncytium Inducing) |
| SIDA (sida) | Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida |
| TAR | Terapia antirretroviral |
| TARGA | Terapia antirretroviral de alta eficacia |
| TCR | Receptor de la célula T (T-cell Receptor) |
| TNF | Factor de necrosis tumoral (Tumor Necrosis Factor) |
| TRECs | Círculos de escisión del reordenamiento del receptor de la célula T (TCR Rearrangement Excision Circles) |
| TT | Toxoide Tetánico |
| UDI | Usuario de Drogas Inyectadas |
| VIH | Virus de la Inmunodeficiencia Humana |
| VL | Carga viral (Viral Load) |

Summary

Summary

Depletion of CD4⁺ T cells is a hallmark of HIV infection and is responsible for the immunodeficiency associated to this disease. Treatment of HIV with antiretroviral therapies results in apparent arrest of viral replication and increase in CD4⁺ T cell numbers. Nevertheless, despite continued long-term suppression of HIV replication and a slow but continued rise in the number of CD4⁺ T cells, the antiretroviral treatment does not appear to allow major reconstitution of impaired HIV-specific T cell responses. Consequently, the therapy cannot be interrupted and does not result in the acquisition of long-term nonprogressor status nor in virus eradication. Thus, the immune system constitutes an attractive alternative to eradicate the virus and to avoid the progression of the disease. The thymus, which is the organ responsible of the production of new T cells, could play a key role in the recovery and reconstitution of the immune system. A study in HIV-infected children, who conserve the functionality of the thymus, was performed to evaluate the immune reconstitution and its possible beneficial effect in the control of the infection.

The results demonstrate the inhibitory effect of HIV-infection on the thymic function and the crucial role of the thymus in the preservation of the CD4⁺ T cell population in infected children. The decrease of viral load after the antiretroviral therapy was associated with a repopulation of CD4⁺ T cells that were mainly of thymic origin. In addition, IL-7 seems to be implicated in the homeostatic mechanism that activates the thymic production of these CD4⁺ T cells. The thymic repopulation may allow the reconstitution of the repertoire of specificities of this population and might be associated with the preservation of diverse immunological parameters. The thymic repopulation of CD4⁺ T cells observed in children was associated with a preservation of HIV-specific memory CD4⁺ T cells that could confer protective immunity against HIV.

These results provide a better understanding of the HIV-infection in children and propose a rationale for enhancing thymic output as a mechanism to restore the immune system and to control the infection.

1. Introducción

1.1 El virus de la Inmunodeficiencia Humana. Epidemiología del SIDA.

El Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (sida) fue reconocido como nueva enfermedad por primera vez en Estados Unidos, cuando comenzaron a aparecer en New York, Los Angeles y San Francisco hombres jóvenes homosexuales con neumonía por *Pneumocistis Carinii* y sarcoma de Kaposi. La primera referencia en la literatura médica que alertaba al mundo de este nuevo síndrome de inmunodeficiencia apareció en Junio de 1981 y describía la aparición de neumonía por *Pneumocistis Carinii* en 5 hombres homosexuales en Los Angeles [1, 2]. Nuevos casos con un síndrome similar aparecieron entre usuarios de drogas por vía parenteral, hemofílicos y personas que habían recibido una transfusión, y en septiembre de 1982 el “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) publicó la definición de la enfermedad utilizando la actual designación de AIDS (Acquired Immuno Deficiency Syndrome) [3]. Análisis posteriores de muestras congeladas de suero y tejidos permitieron identificar individuos VIH positivos ya desde el año 1959 [4]. El hecho de que la mayoría de los primeros casos fueran hombres homosexuales y usuarios de drogas inyectadas sugirió que el sida era causado por un agente que se transmitía por vía sexual y que podía encontrarse en sangre periférica. El virus causante de la enfermedad fue aislado por primera vez en 1983 por Barre-Sinoussi del laboratorio de Luc Montagnier [5] y en 1984 se encontraron suficientes evidencias de que este virus era el responsable del sida [6, 7]. Finalmente, en 1986 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus decidió designar al virus como *human immunodeficiency virus* (HIV), en español *virus de la inmunodeficiencia humana* (VIH). Tras el descubrimiento a finales de 1986 por el grupo de Montaignier de otro subtipo del virus en el oeste de África, el VIH-2 [8], el virus inicial adoptó su denominación definitiva de VIH-1.

1.1.1 Estructura del VIH

El VIH es un Lentivirus de la familia Retroviridae. Los lentivirus han sido aislados en diferentes especies animales y se caracterizan por producir patologías de evolución lenta que se pueden agrupar en tres tipos de síndromes: neurológicos, autoinmunes y de inmunodeficiencia [9].

El virión del VIH, es una partícula esférica de 80 a 110 nanómetros, constituida por una envuelta lípido-proteica y una nucleocápside de forma cónica denominada *core*, en cuyo interior se encuentra el material genético y las enzimas necesarias para el ciclo viral [10]. La envuelta está formada por una bicapa fosfolipídica derivada de la célula huésped. Asociada a la bicapa hay dos glicoproteínas virales: gp120, proteína trimérica que sobresale hacia el exterior y permanece unida no covalentemente a la proteína gp41 que se encuentra anclada a la bicapa lipídica por una región transmembrana. En la parte interna de la membrana se encuentra la proteína p17 (Figura 1). La proteína p24 es el componente principal del núcleo, que recubre la nucleocápside. Ésta contiene dos copias del genoma viral que están recubiertas por la proteína p9, una molécula de ARN transferente que actúa como cebador en la iniciación de las síntesis del DNA viral, la retro-transcriptasa, la proteasa y la proteína p6 [11].

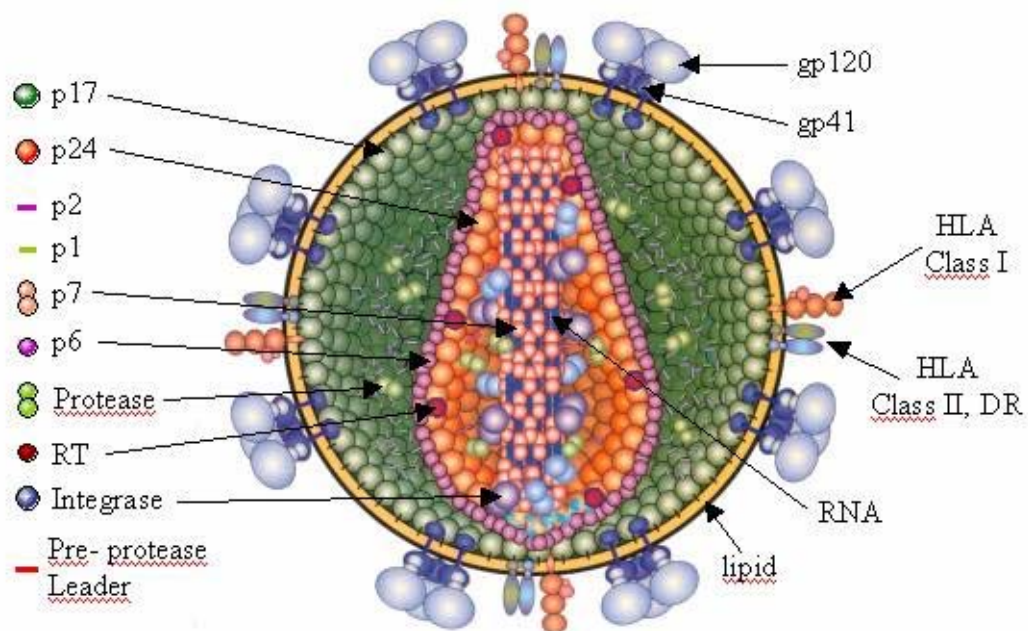


Figura 1. Estructura del VIH-1 o Virus de la Inmunodeficiencia Humana. El virión consta de una envuelta lípido-proteica y una nucleocápside de forma cónica.

El ácido nucleico del VIH está constituido por dos cadenas idénticas de ARN monocatenario de polaridad positiva. Su genoma tiene una longitud de 9,8 Kb y está formado por tres genes estructurales y siete genes reguladores. Además, en su forma de provirus, el genoma viral se encuentra flanqueado por unas secuencias repetidas largas (LTR *Long Terminal Repeat*) que le permiten la integración en el genoma celular, y en las que se localizan los elementos reguladores de iniciación de la transcripción viral [12] (Figura 2).

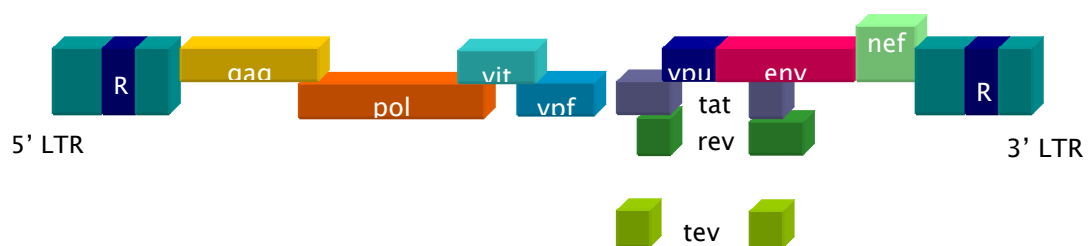


Figura 2. Organización genómica del VIH-1

Los tres genes estructurales, comunes a todos los retrovirus se denominan *gag*, *pol* y *env*, que codifican para las proteínas respectivas correspondientes a los antígenos internos, las enzimas (polimerasas) y la envuelta (Tabla 1). Los genes reguladores, entre otras funciones regulan la latencia o expresión del material genético viral integrado en el material celular (provirus) y se denominan: *tat*, *rev*, *vpr*, *vif*, *vpu*, *nef* y *vpt* (Tabla 1).

| Gen | Proteína | P.M. (kD) | Función |
|------------|-----------------------|-----------|---|
| <i>Env</i> | gp160 | 160 | Precursor preproteico |
| | gp120 | 120 | Proteína de la envuelta viral Interacción con el receptor CD4 |
| | gp41 | 41 | Fusión de membranas |
| <i>Gag</i> | p55 | 55 | Precursor preproteico |
| | p24 | 24/25 | Proteína de la nucleocápside |
| | p17 | 17 | Proteína de la matriz |
| | p9 | 9 | Ribonucleoproteína |
| | p6 | 6 | Ribonucleoproteína, esencial para la encapsidación viral |
| <i>Pol</i> | Transcriptasa inversa | 63 | Retrotranscripción. Actividad RNAsa H |
| | Integrasa | 11 | Integración |
| | Proteasa | 15 | Procesamiento postransduccional de las proteínas virales |
| <i>Tat</i> | Tat | 14 | Transactivador |
| <i>Rev</i> | Rev | 19 | Regulador del transporte y procesamiento del mRNA |
| <i>Nef</i> | Nef | 27 | Regulación negativa de CD4 y HLA I. Aumento de la infectividad viral. Incremento de la retrotranscripción |
| <i>Vif</i> | Vif | 23 | Aumenta la infectividad viral |
| <i>Vpr</i> | Vpr | 18 | Transactivador viral. Inducción de apoptosis. Transporte del complejo de preintegración |
| <i>Vpu</i> | Vpu | 15 | Aumenta la liberación de viriones |
| <i>Tev</i> | Tev | 26 | Activador de <i>tat</i> y <i>rev</i> |

Tabla 1. Genes del VIH y proteínas que codifican [13].

1.1.2 Ciclo de la infección

El ciclo biológico del VIH se inicia con su entrada en la célula diana mediante la interacción entre la gp120 y la molécula CD4 presente los linfocitos T “colaboradores” y en células de estirpe mononuclear-fagocítica, lo que determina el tropismo viral por estos tipos celulares [14, 15]. Además se requiere la interacción del VIH con algún receptor de quimiocinas que actuaría también como correceptor del VIH, siendo los más conocidos CCR5 y CXCR4 [16, 17]. Se han descrito también variantes virales capaces de unirse a CCR2, CCR3 o capaces de entrar en la célula a través de múltiples correceptores [18].

La unión de CD4 a gp120 provocaría cambios conformacionales en la envuelta viral que permitirían la exposición del dominio de interacción de la gp120 con los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4. La interacción con estos correceptores provocaría nuevos cambios conformacionales que expondrían el dominio N-terminal de la gp41, conduciendo a la fusión de membranas e internalización de la nucleocápside viral.

Una vez que la nucleocápside penetra en la célula, se produce la retrotranscripción de una de las hebras de ARN viral por la enzima retro-transcriptasa (RT) transportada por el propio virión [19]. Debido a la actividad DNA polimerasa y RNAsa de la RT, genera una doble hebra de DNA duplicando los LTR, que se sitúan en ambos extremos del genoma viral. Este DNA es transportado al núcleo y se integra al genoma celular por la acción de la *integrasa*, constituyendo lo que se denomina *provirus* integrado. En el proceso de transporte del DNA participan proteínas virales como *Vpr* y la proteína de la matriz p17 [20, 21], pero se ha demostrado que el proceso de retrotranscripción e integración no es dependiente únicamente de factores virales, sino también de factores celulares inducidos en el curso de procesos de activación celular. De esta manera, en linfocitos T CD4+ en reposo el genoma viral es retrotranscrito de forma incompleta, y no se produce la finalización de la retrotranscripción y la integración a menos que la célula sea activada [22], constituyendo un reservorio de DNA proviral no integrado susceptible de integración y replicación cuando la célula sea activada.

El provirus integrado en el genoma de la célula diana puede permanecer latente durante largos periodos de tiempo, puede replicarse de forma controlada, o bien experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada. La replicación del VIH se inicia con la síntesis del RNA mensajero a partir del DNA proviral integrado. Esta activación transcripcional depende de factores celulares que interaccionan con las secuencias reguladoras localizadas en el LTR viral [23]. El mRNA se sintetiza en forma de un único transcrito que es transportado al citosol y procesado en transcritos de distintos tamaños, que utilizando la maquinaria celular dan lugar a la formación de las proteínas virales en un proceso en el que es necesaria la acción de la proteína viral *Rev* [24]. Las proteínas virales una vez sintetizadas son procesadas con la participación de *Vif*, *Vpu* y la *proteasa* viral, para finalmente ensamblarse constituyendo las nuevas partículas virales que por gemación abandonan la célula diana.

Mediante el análisis de la carga viral (CV) y la aplicación de modelos matemáticos, se ha demostrado que en un sujeto infectado se producen diariamente del orden de 10^9 a

10^{10} partículas virales [25-27]. Esto supone que la vida media de un virión es de 0,3 días y la de un linfocito infectado en el que el VIH replica activamente de 1,2 días. Globalmente se ha calculado que cada célula infectada produce entre 10^4 y 10^5 partículas virales (la mayoría defectivas) [13]. Estas cifras indican que el VIH tiene una cinética de replicación muy agresiva, y superior a la de otros lentivirus.

1.1.3 Fenotipo viral y células diana del VIH

Las diferentes variantes del VIH muestran diferencias en sus propiedades biológicas, tales como el tropismo celular, capacidad para inducir sincitios y cinética de replicación, lo que ha mostrado jugar un papel clave en la patogénesis del sida. La propagación del VIH en cultivo conlleva efectos citopáticos tanto en PBMCs como en líneas celulares establecidas. El efecto citopático se caracteriza por la presencia de sincitios, que son el resultado de la fusión de al menos dos células (Figura 3).

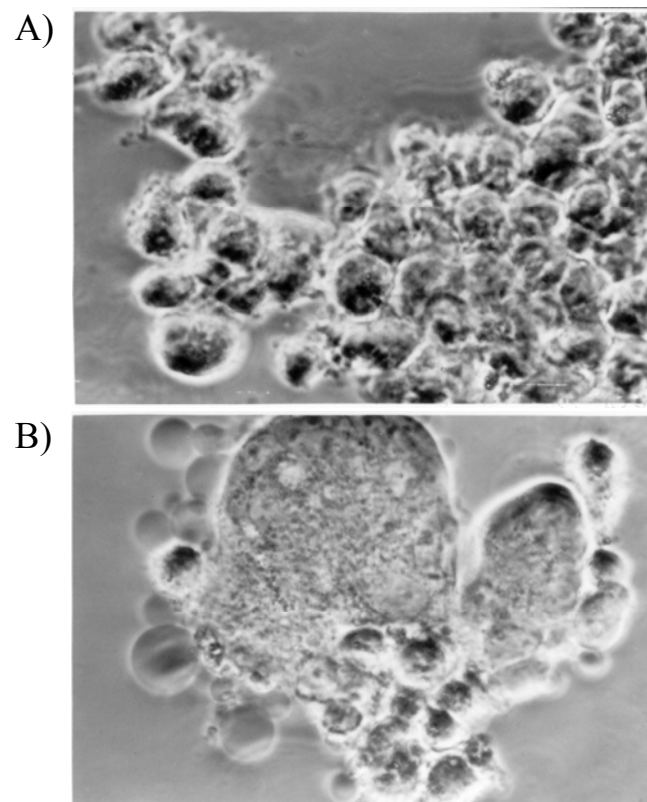


Figura 3. Cultivo de PBMCs en presencia de cepas de VIH no formadoras de sincitios (A) y formadoras de sincitios (B).

Respecto a la cinética de replicación se puede distinguir entre variantes del VIH con crecimiento lento y bajo (slow/low) y/o variantes de crecimiento rápido y alto (rapid/high) [28]. Los cultivos de los aislados virales con replicación lenta/baja se caracterizan por no inducir sincitios o presentar un número reducido de los mismos. Por el contrario, los aislados con cinética rápida/alta dan lugar a la aparición de numerosos sincitios en el cultivo, siendo más citopáticos. Basándose en estas propiedades, las variantes con cinética lenta/baja son también denominadas no inductoras de sincitios (NSI), mientras que las variantes con cinética rápida/alta son denominadas inductoras de sincitios (SI) [29, 30]. Los aislados SI replican fácilmente en líneas celulares establecidas, mientras que los aislados NSI no replican, o si lo hacen, es únicamente de forma transitoria [30, 31]. En la historia natural de la infección, las variantes NSI son las que se encuentran en los primeros estadios de la infección, mientras que las variantes SI suelen aparecer en estadios más avanzados y tiene valor pronóstico del desarrollo de la enfermedad y declive del número de linfocitos T CD4+. Se ha observado una reversión del fenotipo de SI a NSI con determinados tratamientos antirretrovirales [32].

Las distintas cepas virales se van a caracterizar además por el uso de un correceptor u otro en su entrada a la célula diana. De esta manera se ha comprobado que en la transmisión del virus se produce una selección de cepas que usan CCR5 como correceptor (cepas R5) que corresponde con aislados NSI [33]. Este fenómeno sería debido a que las células dendríticas y de Langerhans de la mucosa vaginal y rectal, que son las primeras células diana de la infección en adultos, expresan únicamente el receptor CCR5 en membrana mientras que el CXCR4 se encuentra internalizado [34]. El hecho de que las células por las que entre el virus en el nuevo hospedador expresen CCR5 explica que en la primoinfección se seleccionen las variantes virales R5 o NSI. En la mayoría de pacientes estas cepas R5 van siendo sustituidas por cepas que usan CXCR4 como receptor (cepas X4) y que serían aislados SI, lo cual está asociado con progresión a sida [35].

El VIH también infecta *in vitro* a una gama amplia de células primarias y líneas celulares establecidas que pueden o no expresar CD4 o correceptores del VIH [36, 37]. Se ha demostrado que el VIH es capaz de infectar células neuronales [38] y células de neuroblastoma [39], células de citotrofoblasto y líneas celulares trofoblásticas [40]. También se han encontrado aislados virales capaces de infectar linfocitos CD8+ a través de dicho receptor y sin la presencia de correceptor CCR5 o CXCR4 [41]. El VIH también ha demostrado ser capaz de infectar y destruir timocitos [42, 43] precursores de los linfocitos

T, afectando por tanto a la capacidad de regenerar los linfocitos T perdidos a causa de la infección.

1.1.4 Curso clínico de la infección por el VIH

El curso clínico de la infección por el VIH incluye por lo general tres fases: a) infección primaria, b) fase de latencia clínica, y c) la enfermedad de sida propiamente dicha. Durante la infección primaria aparece un síndrome similar a una mononucleosis aproximadamente de 3 a 6 semanas después de la infección [44]. En las primeras 2-8 semanas de infección se produce una caída significativa de linfocitos T CD4+ en periferia [45]. Cuando el paciente pasa a la fase de latencia clínica estos niveles de CD4 pueden recuperarse, pero normalmente no alcanzan los valores previos a la infección.

Se observa además una replicación masiva del virus tras la tercera semana de infección. Durante este periodo se detectan fácilmente virus infectivos y proteínas virales tanto en plasma como en fluido cerebro-espinal, y la cantidad de viriones varía entre 10^6 y 10^7 por mililitro de plasma [44, 46, 47]. Se ha comprobado que de 3 a 6 semanas después de la infección se detectan respuestas inmunes específicas frente al virus, que se asocian con una caída de la viremia y de los niveles de antígenos virales en plasma [48-51]. La caída de viremia en la infección primaria se ha asociado también a la aparición de linfocitos CTL específicos frente al VIH [52]. Las terapias antirretrovirales administradas durante esta fase de infección primaria han mostrado incrementar los valores de linfocitos T CD4+ y mejorar el curso clínico de la enfermedad en comparación con pacientes que no fueron tratados [53].

La mayoría (70-80%) de los individuos infectados, denominados como *progresores típicos*, experimentan tras la infección primaria un periodo de latencia clínica de entre 6 y 8 años [54-56]. A pesar de la ausencia de síntomas la infección por el VIH continua activa, como indica la persistencia de replicación por parte del VIH y la progresiva caída de linfocitos T CD4+ [55, 57-59]. Con respecto a la relación entre síntomas clínicos y valores de linfocitos T CD4+, se ha comprobado que los individuos que mantienen recuentos ≥ 500 CD4 por mm^3 permanecen por lo general libres de síntomas, que por el contrario sí son frecuentes en individuos con recuentos ≤ 500 CD4/ mm^3 . La progresión a la enfermedad de sida se asocia a una caída de linfocitos T CD4+ por debajo de 200

CD4/mm³, que se caracteriza por la aparición de síntomas persistentes y severos dada la mayor susceptibilidad a infecciones oportunistas o neoplasias como consecuencia de la caída de linfocitos T CD4+ [60].

Un 10-15% de los individuos infectados por el VIH, denominados *progresores rápidos*, experimentan una progresión a la enfermedad de sida inusualmente rápida a los 2 o 3 años de la infección primaria (Figura 4) [61]. En estos pacientes, la disminución de carga viral durante la infección primaria puede no ser muy eficaz y la carga viral puede aumentar muy rápidamente. Este control ineficaz del pico inicial de viremia y el rápido incremento de la misma durante el primer o segundo año de infección refleja un control ineficaz de la infección por parte del sistema inmune, como consecuencia de la aparición tardía de las respuestas inmunes primarias o la rápida desaparición de ciertas funciones inmunes observadas en estos progresores rápidos.

Los denominados *no progresores a largo plazo* o *LTNP*, constituyen un pequeño porcentaje (menos del 5%) de individuos que no experimentan progresión de la enfermedad durante largos periodos de tiempo (Figura 4) permaneciendo asintomáticos. Estos pacientes tienen recuentos de linfocitos T CD4+ dentro del rango normal que se mantienen estables por largos periodos de tiempo, también presentan valores bajos de viremia, y muestran una función inmune y arquitectura de los tejidos linfoides preservada [54, 62-66].

Por último existe un pequeño porcentaje de individuos *supervivientes a largo plazo*, que han experimentado una progresión a sida dentro del periodo de tiempo similar a los progresores típicos, pero tanto los parámetros clínicos como de laboratorio, aunque anormales, permanecen estables durante largos periodos de tiempo (Figura 4) [67]. Los mecanismos virológicos o inmunológicos responsables de prevenir esta progresión no están muy claros. Cambios en el genotipo y/o fenotipo del virus, así como la preservación de ciertas respuestas inmunes VIH-específicas podrían estar implicados.

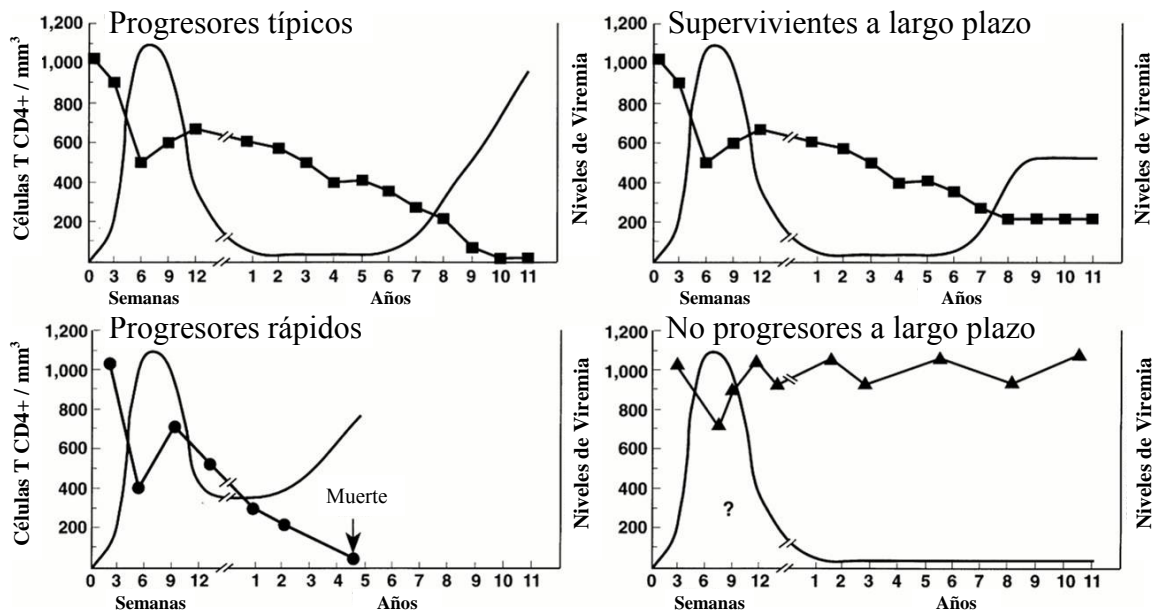


Figura 4. Representación esquemática de diferentes cursos de la infección en adultos por el VIH en base a la evolución de la carga viral y el recuento de linfocitos T CD4+. Tomado de Pantaleo *et al.* 1996 [68].

En niños VIH+, los patrones de evolución de la enfermedad son distintos a los descritos en adultos (Figura 5).

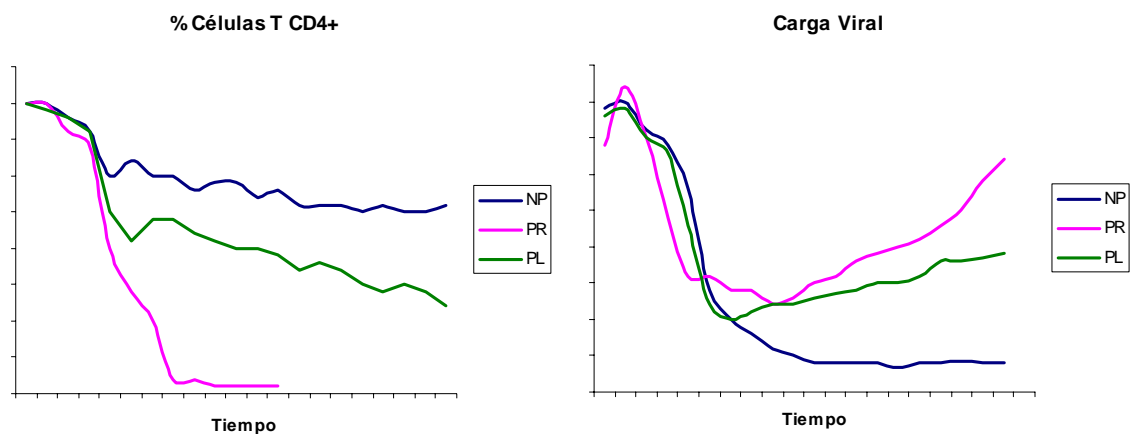


Figura 5. Representación esquemática de diferentes cursos de la infección en niños por el VIH en base a la evolución de la carga viral y el recuento de linfocitos T CD4+. NP: no progresores; PR: progresores rápidos; PL: progresores lentos.

Probablemente debido a que el curso natural de la infección por el VIH en niños presenta características diferenciales, los síntomas relacionados a la infección raramente aparecen al nacer pero se desarrollan en los meses o años siguientes [69, 70]. Antes de la aparición de la terapia antirretroviral de alta eficacia (HAART), aproximadamente un 25% de los niños progresaban rápidamente a sida o fallecían en el primer año de vida [69-72]. En los niños restantes la infección progresaba más lentamente, con alguna esperanza de sobrevivir durante la infancia [73]. La proporción de niños que presentaban una progresión rápida de la enfermedad era mayor que en adultos. Esto podría ser debido al grado de inmadurez de los niños al adquirir la infección, la dosis infectiva de virus y la ruta de transmisión. La menor capacidad de los linfocitos T en el neonato de producir citocinas como IFN- γ , IL-3, IL-4 y TNF, podrían limitar el desarrollo de las respuestas humorales y celulares apropiadas. Además, los niños infectados por el VIH se exponen por primera vez a patógenos oportunistas, y esta respuesta primaria es menos efectiva que la respuesta secundaria que se desencadena en individuos adultos. Por todos estos factores, la infección en niños por el VIH ha sido y es más agresiva y de curso más rápido que en adultos [10, 74]. Los valores de carga viral son superiores a los observados en adultos y la caída de CD4 es más marcada (Figura 6), lo que se ha asociado con una menor esperanza de vida en los niños.

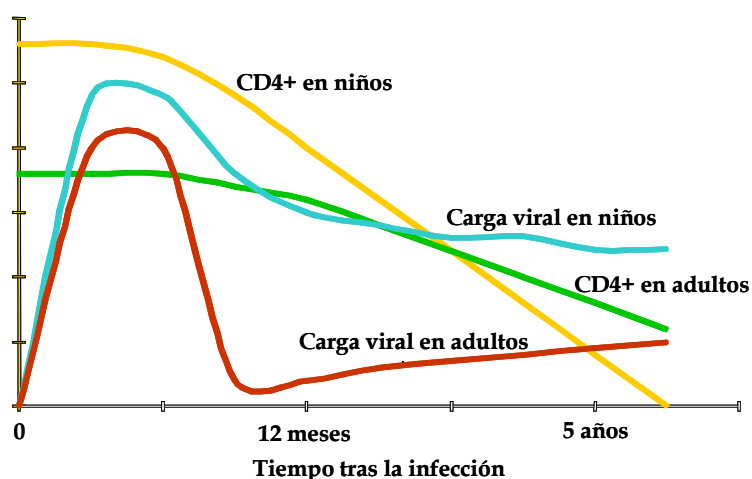


Figura 6. Comparación del curso típico de la infección por el VIH entre adultos y niños durante los primeros años tras la infección.

1.1.5 Mecanismos de transmisión

El VIH se transmite principalmente por tres vías: sexual (homosexual o heterosexual), parenteral (por intercambio de jeringuillas contaminadas entre drogadictos o por transfusiones de sangre infectada) y vertical (materno-fetal). La transmisión de madre a hijo puede acontecer en tres momentos diferentes: a) Transmisión prenatal, intraútero o transplacentaria; b) Transmisión intraparto o perinatal y c) Transmisión postnatal o posparto, que se discutirá con más detalle en el apartado 1.3.

1.1.6 Epidemiología

1.1.6.1 Epidemia Mundial

Desde que en 1981 se detectaron los primeros casos de sida en los EE.UU., las características y patrones de esta epidemia en el mundo han sufrido cambios muy importantes. Inicialmente se describieron casos en Norteamérica, el centro de África y Europa Occidental, y a partir de entonces, la epidemia del VIH se ha ido extendiendo a todos los continentes en mayor o menor medida. Aunque la transmisión parenteral ha tenido importancia en algunos lugares [75], a nivel mundial predomina el comportamiento del sida como una enfermedad de transmisión sexual [76].

Según los datos actualizados a Diciembre del 2003 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y ONUSIDA, actualmente el número de personas infectadas por el VIH en el mundo es de 40 millones (con un margen de variación de esta estimación entre 34 – 46 millones), de los que 37 millones son adultos y 2,5 millones son niños (menores de 15 años). En cuanto a la distribución por regiones del número de personas que viven con el VIH/sida a finales del 2003, el África subsahariana es la zona más afectada con una prevalencia en la población del 7,5 – 8,5 %, seguida de Asia meridional y sudoriental con una prevalencia de 0,4 – 0,8 %.

En el año 2003 se han producido un total de 5 millones de nuevas infecciones (4,2 millones en adultos y 700.000 en niños). Se estima que se han producido cerca de 14000 nuevas infecciones al día, de las cuales cerca de 2000 se han dado en menores de 15 años. En adultos (entre 15 y 49 años) casi el 50% de las nuevas infecciones se

han producido en mujeres y el 50% se han dado entre jóvenes de entre 15 y 24 años. El número de fallecidos por sida en el 2003 es de 3 millones de personas de las que 2,5 millones fueron adultos y 500.000 fueron niños menores de 15 años. Tanto en adultos como en niños más de 2/3 de las muertes por sida se dieron en la región de África subsahariana.

La principal vía de adquisición del VIH en la infancia es la vía vertical, en la que los niños adquieren el virus a través de sus madres infectadas. Por este motivo la infección infantil está íntimamente ligada con la infección en mujeres en edad fértil. Es del máximo interés, pensando en el futuro del sida infantil, conocer cual es la situación de las mujeres respecto a la infección por el VIH. Las estimaciones de ONUSIDA en el año 2002 cifraban en 18,5 millones las mujeres infectadas con edades comprendidas entre 15 y 49 años, de las cuales, 15 millones pertenecían al África subsahariana. La OMS estima que el sida a causado 3,1 millones de defunciones en niños desde el comienzo de la epidemia y la epidemia de sida ha dejado un total de 14 millones de huérfanos (niños que han perdido a su madre o a ambos padres por causa del sida antes de cumplir los 15 años de edad). Según un informe publicado conjuntamente en el año 2002 por UNICEF y la Secretaría de ONUSIDA, los huérfanos por sida, en comparación con los huérfanos por otras causas, tienen un mayor riesgo de malnutrición, enfermedad, malos tratos y explotación sexual.

1.1.6.2 Epidemia en España

Desde que apareció el primer caso de sida en España en 1981, el número de casos nuevos ha ido aumentando año tras año, hasta convertirse en un problema de salud pública de primera magnitud. Los estudios de seroprevalencia del VIH en hombres homosexuales y bisexuales reflejaron un rápido ascenso de la infección durante la primera mitad de los años 80, alcanzándose en algunas ciudades tasas superiores al 20% [77]. Estudios posteriores han detectado una inflexión en esta tendencia. El VIH también se extendió con rapidez durante los años ochenta en un colectivo numeroso de usuarios de drogas inyectadas (UDI), y desde muy pronto la inyección de drogas se convirtió en el principal factor de riesgo para el VIH en España. Sin embargo en los últimos años se observa un claro descenso de la seroprevalencia del VIH en UDI y está adquiriendo importancia la transmisión sexual del virus. Según los últimos datos

aportados por el Centro Nacional de Epidemiología actualizados hasta Junio de 2003, se estima que en el año 2002 se diagnosticaron en España 2329 casos de sida y la tasa se sitúa en 57 casos por millón de habitantes. Durante los primeros 6 meses de 2003 se estima que se diagnosticaron 1151 casos nuevos, lo que supone un descenso del 11% respecto al mismo periodo del año anterior. Desde 1996, con la introducción de la HAART, se produjo un rápido descenso en la incidencia de casos de sida, que en cinco años se redujo más de un 60%. El predominio de los varones 78,6% sobre las mujeres 21,4% se mantiene aunque en el año 1993 era de 80,8% y 19,2% respectivamente.

En 1982 se detectó el primer caso de sida pediátrico en España en un niño hemofílico, y en 1984 el primer caso de sida por transmisión madre-hijo [78]. Desde entonces el número de casos nuevos de sida en niños ha ido aumentando hasta alcanzar el máximo en 1988. La incidencia se redujo a la mitad en el año 1995, y el descenso más pronunciado se produjo en 1996 con motivo de la recomendación del tratamiento con zidovudina a las embarazadas infectadas por el VIH, tratamiento que se había demostrado muy eficaz en la reducción de la tasa de transmisión vertical del VIH [79]. Desde el año 2000 la incidencia de sida de transmisión madre-hijo se encuentra estabilizada en torno a 10 casos nuevos anuales y en el año 2003 no ha habido ninguna transmisión en la comunidad de Madrid. Esto destaca la importancia de mantener las medidas específicas para prevenir la transmisión madre-hijo.

El beneficio de las terapias antirretrovirales también se ha visto reflejado en un incremento acusado en la esperanza de vida de los niños infectados. En la actualidad, prácticamente la totalidad de los niños VIH reciben tratamiento antirretroviral (Figura 7).

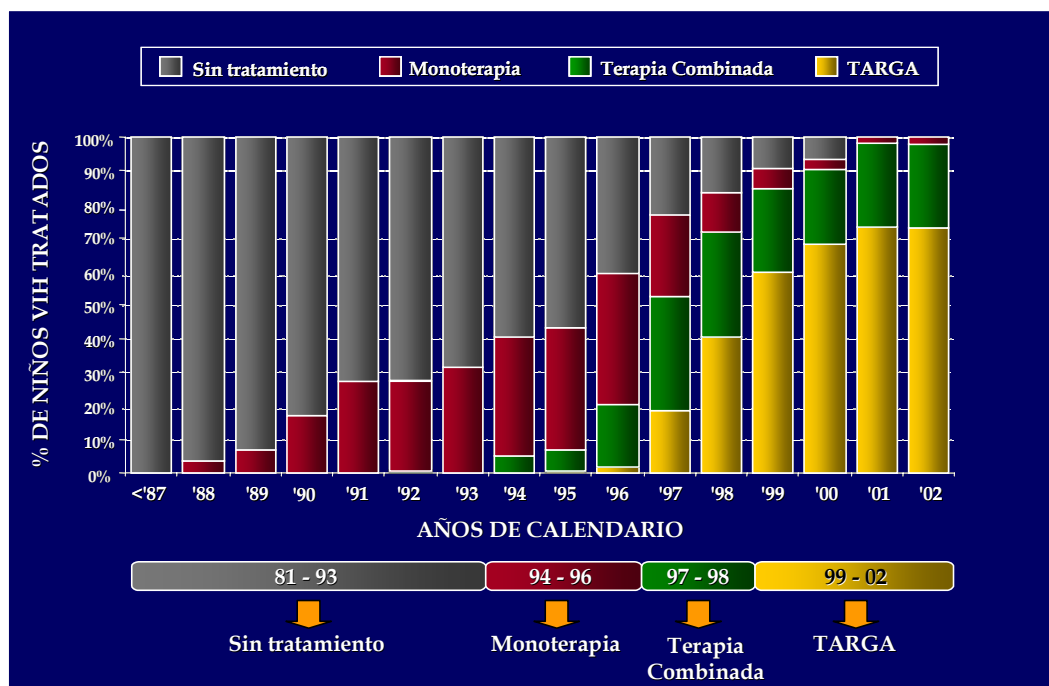


Figura 7. Evolución del porcentaje de niños VIH tratados con terapia antirretroviral a lo largo de la epidemia del sida en la comunidad de Madrid.

España es el país europeo con mayor número de casos de sida (63.574 casos acumulados desde 1981 hasta 2002). En el mismo periodo se han declarado 879 casos por transmisión vertical (93% de los casos de sida pediátrico), siendo el país europeo con más casos de sida por transmisión vertical. En el año 2002 se declaró 1 caso nuevo de sida por transmisión vertical. Desde el año 1981, el grupo de mujeres en el que se ha declarado más casos de sida es el que tiene edades comprendidas entre 20 y 39 años (9140 casos declarados), es decir, en edad fértil. El 71% de las mujeres habían adquirido la infección por ser usuarias de drogas inyectables, un 17% por vía heterosexual y el 12% restante desconocen la vía de transmisión. La vía de contagio heterosexual se ha incrementado de manera muy importante en los últimos cuatro años, llegando a representar el 40% de la transmisión a mujeres. En resumen, la epidemia del sida por transmisión vertical en España es de una magnitud importante, como refleja el hecho de que es el país de Europa que ha registrado más casos con esta forma de transmisión.

1.2 Efectos Inmunológicos de la Infección por el VIH.

El principal efecto de la infección por el VIH en el organismo es una progresiva pérdida del número de linfocitos T CD4+ en sangre periférica y en tejido linfoide [80]. Se observan defectos funcionales en las células, que incluyen fallos en la proliferación y en la producción de citocinas en respuesta a antígenos comúnmente encontrados y anergia para hipersensibilidad retardada en piel [81, 82]. Además de la profunda deficiencia inmune, el VIH también induce un estado de activación inmune crónica en los linfocitos T CD4+, T CD8+ y monocitos [83, 84]. Este hecho limita la capacidad del huésped para proveer defensas contra patógenos oportunistas, potenciando la propagación del VIH ya que los linfocitos T CD4+ activadas son más permisivos a la replicación del virus.

1.2.1 Efecto de la infección por el VIH sobre linfocitos T CD4+

Las infecciones oportunistas son principalmente debidas a defectos en número y funcionalidad de linfocitos T CD4+, como resultado directo o indirecto de la infección por el VIH. Los efectos directos incluyen infección y citotoxicidad con pérdida de linfocitos T CD4+. Los efectos indirectos incluyen disminución de la proliferación y diferenciación de linfocitos T CD4+, desregulación y disminución de la producción de IL-2 y otras citocinas, disminución de la expresión del receptor de IL-2, y formación de colonias defectivas y otras alteraciones a nivel de precursores como la infección de células progenitoras CD34+ de la médula ósea y timocitos. Estos defectos pueden contribuir a la falta de reconstitución o recuperación de linfocitos T en fases más tardías de la enfermedad [85, 86].

Las anormalidades en los linfocitos T CD4+ comienzan con una pérdida de la respuesta a antígenos de recuerdo como el toxoide tetánico, y disminución de la producción de IL-2, seguida de defectos en la respuesta proliferativa de los linfocitos T a aloantígenos. Seguidamente, con la caída constante de linfocitos T CD4+, aparecen defectos en la respuesta a estímulos mitogénicos [87].

La infección por el VIH se caracteriza por una inversión del cociente de linfocitos T CD4+/CD8+. Hasta las fases muy tardías de la enfermedad, el número total de células T CD3+ permanece relativamente constante con un aumento de linfocitos T CD8+ que contrapesan la pérdida de linfocitos T CD4+ [88]. Este fenómeno se ha llamado

homeostasis de linfocitos T y se ha observado en otras enfermedades [89]. En las fases más tardías de la enfermedad, los defectos en la linfopoiesis producen una incapacidad para mantener la homeostasis de linfocitos T, produciéndose una pérdida subsiguiente de ambos tipos celulares CD4+ y CD8+.

Los mecanismos responsables de los defectos de los linfocitos T CD4+ sólo se entienden parcialmente. Se ha demostrado la acción de proteínas virales para alterar función de los linfocitos T directamente, como la proteína gp41 que inhibe la proliferación frente a mitógenos en PBMCs. La interacción entre la gp120 y la molécula CD4 prima un estado de activación celular alterada en el que una segunda activación conduce a la apoptosis de la célula. La apoptosis se puede inducir *in vitro* con anticuerpos anti-CD4 que forman entrecruzamientos como las proteínas del VIH en individuos sanos, pero este efecto puede ser superado a través de uniones cruzadas con CD28 o CD2. Además, las células de los individuos VIH+ pueden ser anérgicas y pueden sufrir apoptosis en respuesta a entrecruzamientos de CD4 más rápidamente que las células de individuos no VIH.

Los linfocitos T CD4+ de los individuos VIH+ manifiestan una variedad de anormalidades fenotípicas. El porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CD28, ligando para B-7, es menor que el que presentan los individuos no infectados [90]. Además, las células CD28- no responden a señales de activación como a los anticuerpos anti-CD3 o mitógenos y expresan marcadores de activación como HLA-DR, CD38 y CD45RO [91]. En los individuos VIH+ se observa un aumento de linfocitos de memoria CD45RO+ y una pérdida de linfocitos *virgen* CD45RA+, siendo los linfocitos T CD4+CD45RO+ la principal fuente de replicación del VIH *in vivo* y produciendo mayor replicación del VIH *in vitro* que los linfocitos T CD4+CD45RA+ [92].

1.2.2 Efecto de la infección por el VIH sobre linfocitos T CD8+

El porcentaje o número absoluto de linfocitos T CD8+ varían a lo largo del curso de la enfermedad por el VIH. Después de la infección aguda, se observa un incremento de linfocitos T CD8+ por encima de los valores descritos en la población no VIH, que puede permanecer elevado por un período prolongado [93]. Este aumento de linfocitos T CD8+ durante todo el período de infección, menos en la fase tardía de la enfermedad, puede reflejar la expansión de linfocitos T citotóxicos (CTLs) CD8+ VIH-específicas [94].

Durante la progresión de la enfermedad, los linfocitos T CD8⁺ tienen un fenotipo anormal caracterizado por la expresión de ciertos marcadores de activación y la ausencia de expresión del receptor de IL-2. Las alteraciones en el fenotipo de los linfocitos T CD8⁺ en individuos VIH⁺ tienen importancia en el pronóstico [93, 95]. Así, individuos con linfocitos T CD8⁺ que expresen HLA-DR pero no CD38 después de la seroconversión experimentan una estabilización del número de linfocitos T CD4⁺ y un curso de la enfermedad más lento. Por el contrario, en los individuos con linfocitos T CD8⁺ que expresan HLA-DR y CD38 se observa una rápida disminución del número de linfocitos T CD4⁺ y peor pronóstico, progresando rápidamente a sida [96-98]. También en estos individuos se observa un aumento de linfocitos T CD8⁺/CD28⁻ [99] que reflejan la expansión del subconjunto de linfocito T CD8⁺/CD28⁻/CD57⁺ que contiene posiblemente a las CTLs activas. La pérdida de actividad CTL con la progresión de la enfermedad no se restringe a CTLs VIH-específicas, sino que también ha sido observada una pérdida de actividad citotóxica a otros antígenos comunes, incluso el virus de Epstein-Barr y la tuberculosis por *Mycobacterium tuberculosis* [100].

Además, durante la progresión de la enfermedad, se dañan otras funciones de los linfocitos T CD8⁺, como la pérdida de actividad no citolítica no restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) que produce supresión del VIH; también se observa una disminución en la liberación de factores celulares de supresión antiviral; pero en contraposición, no se observa disminución de las quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES [101-103].

1.2.3 Efecto de la infección por el VIH sobre células B

El número de células B circulantes puede disminuir durante la infección primaria por el VIH [104]; sin embargo, es un fenómeno normalmente transitorio que probablemente refleje una redistribución de las células B en los tejidos linfoides. Tras la infección aguda, se produce hipergammaglobulinemia e hiperactivación de las células B, conduciendo a un aumento de las distintas clases de inmunoglobulinas, sugiriéndose que una mayoría de células B activadas producen anticuerpos frente al VIH durante esta fase de la infección [105]. Por otra parte, la capacidad de respuesta de las células B a antígenos polisacáridos es reducida, probablemente debido en parte a la pérdida de linfocitos T CD4⁺, siendo en

parte responsable del aumento de ciertas infecciones bacterianas observadas en fases avanzadas de la enfermedad en individuos adultos, y estando asociada con la mortalidad causada por infecciones bacterianas en niños VIH+.

Además, las células B de los individuos VIH+ secretan cantidades elevadas de TNF- α e IL-6, citocinas que pueden inducir la replicación del VIH en los linfocitos T CD4+ infectadas [106].

Así, en varios estudios, se ha descrito un aumento global de las concentraciones de IgE en individuos VIH+, que aumentan con la progresión de la enfermedad [107] probablemente reflejen un trastorno regulador [108]. Aunque se desconocen los mecanismos implicados, se podría incluir hiperactivación de células B y desregulación de citocinas. También se ha encontrado una asociación entre concentraciones elevadas de IgE y emergencia de aislados virales SI/X4 [109]. En niños infectados por el VIH, se ha identificado una población de células B que no expresa CD23 (receptor de IgE) ni CD62L (L-selectina) que podrían estar implicadas en la desregulación de la IgE [110].

1.3 Transmisión Vertical del VIH. Infección Pediátrica.

La transmisión vertical del VIH ha experimentado un importante cambio en los últimos años con la introducción de la HAART durante el embarazo y con tratamiento antirretroviral durante las primeras semanas de vida del recién nacido [79].

1.3.1 Factores asociados a la transmisión vertical del VIH

Los factores asociados a la transmisión vertical del VIH son múltiples: factores maternos, virales, placentarios, fetales, obstétricos, neonatales y asociados a la lactancia (Tabla 2), pero se desconoce si existen otros factores o la influencia cuantitativa de los descritos anteriormente.

| |
|--|
| Factores maternos |
| <ul style="list-style-type: none"> • Categoría clínica e inmunológica • CV elevada. • Determinado fenotipo viral • Tropismo celular • Cinética de replicación • Capacidad citopática • Características del genotipo viral • Respuesta específica frente al VIH |
| Factores placentarios |
| <ul style="list-style-type: none"> • Susceptibilidad de las células de placenta al VIH • Desarrollo de la placenta • Integridad de la placenta |
| Factores fetales |
| <ul style="list-style-type: none"> • Edad gestacional en el momento de la exposición • Respuesta inmunitaria del feto • Susceptibilidad de las células a la infección por el VIH • Factores genéticos (HLA) |
| Factores obstétricos |
| <ul style="list-style-type: none"> • Tipo de parto (cesárea/vaginal) • Monitorización invasiva • Manipulación postnatal inmediata del recién nacido |
| Factores neonatales |
| <ul style="list-style-type: none"> • Integridad de las mucosas y de la piel • Integridad de la respuesta inmunitaria • Madurez gastrointestinal |
| Factores asociados a la lactancia materna |
| <ul style="list-style-type: none"> • Valor y duración de la CV en la leche • Ausencia de mecanismos protectores de la infección • Inmunidad específica local frente al VIH |

Tabla 2. Factores asociados a la transmisión vertical del VIH.

1.3.2 Tipos de transmisión vertical del VIH

Debido a la información que aportan las técnicas de diagnóstico (PCR o cultivo), se puede determinar el momento en que se infecta el niño por transmisión vertical en la historia natural de la infección. Aproximadamente entre un 10-30% de los niños se infectan antes del parto (infección prenatal o intrauterina). El restante 70% de niños se puede infectar durante el parto (infección intraparto o perinatal) [71, 111-113]. También existe un pequeño porcentaje de niños que se infectan durante la lactancia, al transmitirse el VIH a través de la leche materna, por lo que en los países desarrollados está contraindicada la lactancia materna.

1.3.2.1 Infección prenatal o intrauterina

Se suele dar en niños con manifestaciones clínicas precoces de la infección por el VIH o con infecciones oportunistas definitorias de sida [114] y más del 80% de estos niños fallecen antes de los dos años de vida [35]. Así, parece que la infección viral sigue un patrón llamado de infección precoz y de evolución rápidamente progresiva [69, 115]. Estos niños se infectaron intra-útero en fases precoces del embarazo, momento en que el timo y el sistema inmunológico del feto son aún muy inmaduros y no pueden llegar a desarrollarse adecuadamente al verse infectados por el VIH [116, 117]. Además, se considera que la infección es intrauterina cuando los estudios directos de detección del VIH (PCR y/o cultivo del VIH) son positivos antes de las 48 horas de vida [79, 111, 113, 118-120].

1.3.2.2 Infección intraparto o perinatal

Estos niños no presentan signos o síntomas clínicos al nacer, con un tiempo medio de evolución a sida de 5 años [73, 121-123]. En el caso de infección intraparto, las técnicas de detección directas del VIH (PCR y cultivo) dan resultados negativos dentro de la primera semana de vida del recién nacido y resultados positivos entre los 7 y los 90 días de vida en nuevas muestras analizadas [79, 120]. En este caso, el patrón sería de infección tardía y de evolución más lenta [69, 115]. Este grupo de niños corresponde a los niños infectados al final de la gestación o en el momento del parto. Su sistema inmune, aunque inmaduro y virgen, es capaz de iniciar una respuesta frente

al VIH que les permite durante meses o años convivir con la infección, lo que se traduce en una mayor supervivencia.

El VIH también se puede transmitir durante la lactancia materna (transmisión postnatal o posparto) [111, 124]. Por lo tanto, se debe desaconsejar la lactancia a mujeres VIH+. No obstante, en los países en vías de desarrollo, la morbilidad y mortalidad que representa la contraindicación de la lactancia materna son muy superiores al riesgo adicional que tienen los niños de infectarse por el VIH.

Las características inmunológicas, virológicas y clínicas de estos dos tipos de patrones de infección indican que la infección se ha producido en distintos momentos durante la maduración fetal, y por tanto de la maduración inmunológica [125, 126]. En dos extensos estudios de cohortes, la progresión a sida se estimó en un 19% durante el primer año de vida, descendiendo posteriormente a un 4,5% por año, indicando que el mayor riesgo de progresión sucede en el primer año de vida [127, 128].

1.3.3 Marcadores predictivos de la infección pediátrica por el VIH

1.3.3.1 Recuento de linfocitos T CD4+

La interpretación clínica del número de linfocitos T CD4+ en los niños debe realizarse en función de la edad. El número y porcentaje de linfocitos T CD4+ en niños no VIH son mayores que en adultos, igualándose a los valores del adulto a partir de los 6 años de vida [114, 129]. El CDC ha desarrollado un sistema específico para clasificar el nivel de inmunosupresión en los niños, según el número y porcentaje de linfocitos T CD4+ (Tabla 3). Aunque el número absoluto de linfocitos T CD4+ varía según la edad, el porcentaje de linfocitos T CD4+ que define cada categoría inmunológica no lo hace [78]. Por ello, la variación en el porcentaje de linfocitos T CD4+ puede considerarse un mejor marcador de progresión de la enfermedad en niños que el número absoluto [130]. En niños y adultos infectados, el recuento de linfocitos T CD4+ es un marcador pronóstico [131].

El número y porcentaje de linfocitos T CD4+ se utilizan, junto con otras medidas, para tomar decisiones sobre tratamientos antirretrovirales. Sin embargo, la

cuantificación de linfocitos T CD4+ presenta una gran variación intrapaciente, siendo menor cuando los pacientes están clínicamente estables. Por tanto, es aconsejable no realizar modificaciones en la terapia por cambios en los valores de linfocitos T CD4+ hasta confirmarlo en una segunda determinación, con un mínimo de 1 semana entre ambas.

| Categoría inmunológica | Valores de linfocitos T CD4+ en Niños según Edad | | | | | |
|-----------------------------|--|-------|-----------|-------|-----------|-------|
| | <12 meses | | 1-5 años | | 6-12 años | |
| | / μ l | % | / μ l | % | / μ l | % |
| 1: Sin inmunosupresión | >1.500 | >25 | >1.000 | >25 | >500 | >25 |
| 2: Inmunosupresión moderada | 750-1.499 | 15-24 | 500-999 | 15-24 | 200-499 | 15-24 |
| 3: Inmunosupresión severa | <750 | <15 | <500 | <15 | <200 | <15 |

Tabla 3. Categorías inmunológicas en niños según el recuento absoluto y relativo de linfocitos T CD4+ sobre los linfocitos totales dependiendo del rango de edad.

1.3.3.2 Recuento de linfocitos T CD8+

En recién nacidos, el porcentaje de linfocitos T CD8+ aumenta con la edad, aunque no en el mismo grado en que se produce la caída del porcentaje de linfocitos T CD4+ [129]. Aunque se ha reconocido la importancia de los linfocitos T CD8+ en el control de la infección por el VIH [132, 133] son pocos los estudios que han examinado el valor pronóstico del número de linfocitos T CD8+ en sangre periférica en individuos VIH+ [134-136], siendo nuestro grupo el que más trabajos ha aportado sobre el papel de este marcador en niños VIH [93, 95, 137-139]. Un estudio de seguimiento en pacientes hemofílicos adultos con infección por el VIH mostró que el aumento del número absoluto de linfocitos T CD8+ predecía precozmente el descenso de linfocitos T CD4+ y la progresión clínica de la infección por el VIH [134]. También se ha encontrado que los linfocitos T CD8+ juegan un papel importante en la predicción de las alteraciones neurológicas [95, 140]. Además, se ha demostrado que el

aumento de la subpoblación de linfocitos T CD8 citotóxicos, se asocia en niños, con progresión más lenta a sida [93, 141], mejor respuesta a tratamiento [142], y con mayor supervivencia [143].

1.3.3.3 Carga viral plasmática

Durante el periodo de infección primaria en adultos, la CV inicial se eleva para después descender, coincidiendo con la respuesta inmune humoral y celular. Los valores de CV descienden 2-3 \log_{10} hasta alcanzar un valor bajo y estable, aproximadamente a los 6-12 meses tras la infección aguda, reflejando el continuo equilibrio entre producción viral y eliminación inmune [144-146]. Varios estudios en adultos han indicado que una CV baja en el momento de la estabilización se asocia con una progresión más lenta y una mejor supervivencia, frente a aquellos individuos con CV elevadas [147]. Sobre la base de dichos datos, se han elaborado recomendaciones para la utilización de la CV en la toma de decisiones sobre el comienzo o cambio de terapia antirretroviral (TAR) en adultos VIH+ [147], que son así mismo aplicables a los niños mayores de 3 años.

La CV en los niños infectados verticalmente difiere de la de los adultos, persistiendo elevada por un periodo prolongado [146, 148]. La CV es habitualmente baja al nacer (<10.000 copias/ml, 4 \log_{10}), incrementándose a los 2 meses de vida (con un rango que oscila desde indetectable hasta 10 millones de copias/ml, 7 \log_{10}) y descendiendo lentamente en ausencia de TAR [149, 150]. Este descenso es más acusado durante los primeros 12-24 meses de vida (0,6 \log_{10} /año), para pasar a ser más suave hasta aproximadamente los 4-5 años de edad (0,3 \log_{10} /año). El modelo descrito refleja probablemente un sistema inmune inmaduro, menos eficaz para contener la replicación viral y posiblemente, con un número mayor de células susceptibles a la infección por el VIH.

En niños menores de 12 meses de edad, una CV >100.000 copias/ml (5 \log_{10}) se correlaciona con progresión de la enfermedad y mortalidad, incrementándose esta probabilidad si el porcentaje de linfocitos T CD4+ es $<15\%$ [93, 125]. Los datos de los niños con más de 30 meses de edad son similares a los datos de estudios realizados en adultos infectados, en los que el riesgo de progresión de la enfermedad aumenta

sustancialmente cuando la CV es superior a 10.000-20.000 copias/ml (4-4,3 log₁₀) [147, 151].

A pesar de que estos datos indican que una CV alta se asocia con progresión de la enfermedad, durante el primer año de vida la interpretación de su valor es difícil, porque los valores de CV son altos y existe un marcado solapamiento entre los valores de la CV de los niños que van a progresar rápidamente a sida y aquellos que no [145, 148]. Los datos indican que los valores basales del porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y CV y los cambios en estos parámetros ayudan a determinar el riesgo de mortalidad en los niños infectados, recomendándose el empleo de ambos marcadores conjuntamente para predecir con mayor precisión el pronóstico de la infección [148, 150].

En la actualidad, la profilaxis con Zidovudina (ZDV) en el recién nacido durante el parto y las siguientes cuatro semanas, hace que la CV sea más baja. Además, una vez que el niño está diagnosticado de infección por el VIH se le debe administrar el TAR más adecuado según las características genéticas de sus aislados virales para mantener la CV indetectable [152], siendo en los niños tratados de gran utilidad para su seguimiento la CV y los valores de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺.

1.3.3.4 Características biológicas de los aislados virales

Durante la infección primaria, se detectan habitualmente aislados virales NSI/R5, dado que el sistema inmune del paciente es capaz de controlar el crecimiento de las cepas SI/X4. En el caso de los pacientes pediátricos, el porcentaje de aislados virales SI/X4 encontrados durante las primeras semanas de vida es mayor que en adultos [125]. La presencia y la persistencia de aislados con fenotipo SI/X4 tras la infección primaria se asocia con una rápida disminución de linfocitos T CD4⁺ y puede afectar al curso posterior de la infección [93, 150]. El paso de aislados NSI/R5 a SI/X4 durante el seguimiento se asocia con una caída brusca de linfocitos T CD4⁺ [31, 153], lo que sugiere que estas variantes SI/X4 pueden estar directa o indirectamente implicadas en los mecanismos desencadenantes de la depleción de los linfocitos T CD4⁺.

Pocos estudios han correlacionado la evolución clínica en niños infectados verticalmente con las características del aislado viral [154, 155]. Datos de laboratorio indican que en niños sin tratamiento antirretroviral o en condiciones subóptimas, la presencia de aislados virales con fenotipo SI/X4 y/o cinética R/A se asocia con

progresión a sida [93, 125] y a muerte [156], sugiriendo que estas características biológicas del VIH tienen mayor poder predictivo que la CV en los niños VIH+. Las cepas SI/X4 suelen aparecer de un año y medio a dos años antes de la progresión a sida. Actualmente, con los nuevos tratamientos antirretrovirales se empiezan a observar cambios en la interpretación de la correlación entre cinética R/A y fenotipo SI y cinética L/B y fenotipo NSI.

1.4 Respuesta Inmunológica y Mecanismos de Escape en la Infección por el VIH.

La respuesta inmune frente a las infecciones virales abarca prácticamente todos los mecanismos efectores del sistema inmunológico [157]. Esta respuesta inmune engloba respuestas específicas e inespecíficas y pueden ser de tipo humoral o celular. La respuesta inmunológica frente a las infecciones virales ha de ser completa, en el sentido de ser capaz de neutralizar tanto las partículas virales solubles como de reconocer y destruir las células infectadas por el virus. Asimismo, esta respuesta debe ser lo suficientemente amplia como para evitar que la variabilidad antigénica permita al virus escapar del sistema inmune [158, 159].

1.4.1 Respuesta humoral

Inmunidad específica. Los individuos VIH+ desarrollan una intensa respuesta de antígenos dirigidos frente a prácticamente todas las proteínas virales, normalmente entre 1 y 3 meses después de la infección [157, 160]. Sin embargo, muchos de los anticuerpos generados frente al VIH van dirigidos a restos o *debris* de viriones y no tienen ningún efecto antiviral [161]. Los primeros anticuerpos que se detectan son los dirigidos frente a proteínas estructurales del VIH como p24 y p17. Más tarde, aparecen anticuerpos frente a *Env* y *Pol* y frente a proteínas reguladoras y accesorias como *Rev*, *Tat*, *Vpr*, *Vpu*, *Vif* y *Nef* [162]. Los anticuerpos que neutralizan el VIH antes de su entrada en las células, denominados anticuerpos neutralizantes, van dirigidos principalmente a la envuelta del VIH [163] y podrían tener un efecto antiviral *in vivo*. La mayoría de estos anticuerpos son contra una región hipervariable de la subunidad gp120 de *Env*, el denominado *loop* V3.

El papel preciso de estos anticuerpos en el control del VIH en los individuos infectados permanece incierto. En primer lugar, durante la fase aguda de la infección se observa en los pacientes una marcada caída de la CV antes de que se detecten los anticuerpos neutralizantes [52]. Por otro lado, no se observa una correlación entre el hecho de controlar la CV a largo plazo y la magnitud de la respuesta de anticuerpos neutralizantes [164]. Por último, si bien se ha observado que la inmunización pasiva con anticuerpos es

capaz de proteger en monos de la infección frente a aislados virales de laboratorio, se requiere una alta concentración de anticuerpos para que esta protección sea eficaz frente a aislados primarios [165, 166].

Sin embargo, el VIH es capaz de eludir estas respuestas de anticuerpos gracias principalmente a su alta tasa de mutación que producen variaciones antigénicas que hacen al virus resistente a estos anticuerpos [163, 167]. Además, la disposición de los dominios hipervariables (como V1 y V2) puede dificultar la accesibilidad por parte de los anticuerpos a aquellas zonas de gp120 críticas para la entrada del virus [163]. También la glicosilación de la envuelta puede enmascarar epítomos importantes para el reconocimiento por parte de los anticuerpos [168, 169].

Inmunidad inespecífica. Además de los anticuerpos, existen numerosos factores solubles que son activos frente a la infección por el VIH. Los virus en general y el VIH en concreto, son sensibles a la inhibición por complemento. Los interferones también juegan un papel antiviral frente al VIH y se ha demostrado en experimentos de terapia génica que la expresión del gen del interferón beta induce resistencia a la infección en las células transducidas [170]. Probablemente todos estos mecanismos de inmunidad inespecífica representan una cierta barrera frente a la infección por el VIH, pero son insuficientes para permitir un control eficaz de la replicación viral.

1.4.2 Respuesta celular

En la infección por el VIH se produce una respuesta celular antiviral en las distintas poblaciones: linfocitos T colaboradores, linfocitos T citotóxicos y células de estirpe *natural killer* (NK).

Inmunidad específica

1.4.2.1 Linfocitos T citotóxicos

Los individuos VIH+ desarrollan respuestas CTL específicas intensas frente a genes estructurales y reguladores del VIH [94, 171, 172]. Así, los linfocitos T CD8+ pueden controlar el VIH por al menos dos mecanismos diferentes [173]. En primer

lugar, las células CTL específicas frente al virus pueden lisar las células infectadas al reconocer péptidos virales unidos a moléculas MHC clase I en la superficie celular, y eliminar estas células antes de que liberen nuevos viriones [174]. En segundo lugar, los linfocitos T CD8⁺ pueden inhibir la replicación del VIH al secretar β quimiocinas como MIP-1 α , MIP-1 β y RANTES, que se unen a correceptores para VIH en la superficie de los linfocitos T CD4⁺ bloqueando la entrada del virus. Estas β quimiocinas se encuentran en los mismos gránulos que contienen las proteínas citolíticas y se liberan de manera antígeno específica cuando las células CTL encuentran su antígeno en el contexto HLA adecuado [175]. Además estas quimiocinas también potencian la actividad citolítica de las células CTL, favoreciendo por tanto el control del VIH por parte de los linfocitos T CD8⁺ [176].

La caída de viremia que se da en la fase aguda de la infección se correlaciona con la aparición de células CTL específicas frente al VIH [52, 177]. Además, las CTL obtenidas de individuos VIH⁺ son capaces de inhibir *in vitro* la replicación viral en linfocitos T CD4⁺ autólogas [174]. Por otro lado, en individuos infectados al transferir CTL específicas frente al VIH se ha observado un reclutamiento de estas células en las áreas de infección del virus [178].

Sin embargo, se ha observado que en ausencia de linfocitos colaboradores (T CD4⁺) algunas de estas células CTL específicas no son funcionales y no producen IFN- γ ni son capaces de lisar células infectadas [179]. También se han observados diversas alteraciones en los linfocitos T CD8⁺ de individuos crónicamente infectados, como ausencia de perforina o actividad citolítica disminuida [180], o alteraciones en la maduración de estas células que pueden afectar a la eficacia de estas respuestas *in vivo* [181].

1.4.2.2 Linfocitos T CD4⁺

La principal consecuencia de la infección por el VIH es una progresiva depleción de los linfocitos T CD4⁺. La consecuencia más dramática en el repertorio inmune de los individuos infectados es la ausencia selectiva de linfocitos colaboradores o *helper* específicos frente al VIH que se asocia con la disminución de actividad CTL. Este hecho podría explicar porque el sistema inmunológico es incapaz de controlar el virus a pesar de la presencia de CTL.

En individuos no progresores (LTNP) se han observado marcadas respuestas linfoproliferativas frente a antígenos del VIH [182, 183] y se ha descrito que existe una correlación inversa entre estas respuestas linfoproliferativas y la CV. Los individuos con las respuestas CD4 más elevadas son los que tienen CV más bajas, mientras que los que tienen respuestas CD4 bajas tienen los valores más altos de CV [183]. En estos individuos, se observó una asociación marcada entre las respuestas de linfocitos T colaboradores y una mayor respuesta CTL [184]. También se ha observado que los linfocitos T CD4+ específicos, determinados mediante la expresión intracelular de IFN- γ , persisten en individuos con infección crónica por el VIH [185], aunque la frecuencia de estas células específicas es inferior en individuos con infección crónica que en LTNP. Además, se ha observado que en pacientes con infección crónica la frecuencia de linfocitos T CD4+ específicos frente al VIH es muy inferior a la de linfocitos específicos frente a CMV [186].

En base a estos estudios y los realizados en otras infecciones virales, los linfocitos T CD4+ parecen jugar un papel crítico en el mantenimiento de una respuesta inmune efectiva. La pérdida de control inmunológico en individuos infectados por el VIH podría deberse a la destrucción selectiva por parte del virus de esta población de linfocitos T CD4+.

Inmunidad inespecífica. En cuanto a los mecanismos de inmunidad celular no específicos (no restringidos por el sistema HLA), se ha descrito la existencia de actividad de tipo ADCC (citotoxicidad celular anticuerpo-dependiente), así como una actividad citotóxica natural (NK) frente al VIH en individuos seropositivos [187, 188].

1.4.3 Evasión viral de la respuesta inmune

A pesar de que el VIH parece inducir una respuesta inmune vigorosa, en la mayoría de los pacientes la replicación viral persiste y termina por destruir el sistema inmunológico. Los mecanismos por los que el VIH puede eludir al sistema inmunológico pueden ser diversos [189-191]. Las características de la envuelta del VIH pueden conferir resistencia a la neutralización por anticuerpos. Por otro lado, la rápida replicación del virus y con una alta tasa de errores produce mutaciones y variaciones antigénicas que permiten evadir las

respuestas tanto celulares como humorales [192]. El VIH también puede evadir la respuesta CTL y NK por una inhibición selectiva de los alelos MHC clase I [193-196]. Finalmente como ya se ha mencionado, el virus puede infectar y destruir directamente los linfocitos T CD4+ específicos, afectando también a las respuestas CTL.

1.4.4 Terapias inmunoestimuladoras

Aunque las TAR han mostrado su eficacia disminuyendo la replicación del VIH, presentan limitaciones como son los efectos secundarios que ocasionan y la pérdida de eficacia tras la aparición de resistencias. Por esta razón, es necesario encontrar nuevas estrategias para tratar la infección por el VIH. Entre estas nuevas estrategias la inmunoterapia es una prometedora alternativa que está siendo estudiada para tratar la infección. Este interés se basa en el hecho de que el sistema inmune es capaz de controlar por sí solo la mayoría de infecciones virales, incluyendo algunas que se establecen de forma crónica en las personas infectadas. Además, se han hallado recientemente evidencias de que el control inmunológico del VIH es posible en algunos individuos infectados. Estos hallazgos hacen pensar que las terapias innovadoras dirigidas a potenciar las repuestas frente al virus podrían conducir a un control a largo plazo por parte del sistema inmune de esta infección, que es fatal en la mayoría de personas.

Las terapias inmunoestimuladoras pueden estar dirigidas a incrementar la inmunidad de forma no específica, o bien favorecer la inmunidad específica frente al VIH. Las estrategias que se han estudiado frente a la infección por el VIH son muchas [197]. Entre ellas se encuentran la administración de citocinas como IL-2 e IL-12, transferencia de linfocitos T CD4+ y CTL, terapias con anticuerpos, vacunas terapéuticas de DNA o utilizando vectores virales, terapia génica, inmunización con células dendríticas o interrupciones estructuradas del tratamiento antirretroviral.

El tratamiento con IL-2 fue una de las primeras terapias inmunoestimuladoras en ensayarse. Los ensayos clínicos mostraron que IL-2 incrementa el recuento de linfocitos T CD4+ en individuos infectados por el VIH [198, 199]. Sin embargo, no está claro si este incremento se traduce o no en beneficios clínicos, lo que unido a la toxicidad de la IL-2 hace necesario realizar más estudios en orden a clarificar estas cuestiones.

El interés en las terapias con células dendríticas reside en que estas células están especializadas en capturar antígenos que pueden presentar a los linfocitos T pudiendo generar respuestas antígeno específicas de linfocitos T CD4+ y CD8+ [200-202]. Por ello, existe un gran interés en un posible uso de estas células dendríticas como adyuvantes de inmunógenos VIH como péptidos o proteínas completas.

La utilización de vectores virales ha mostrado expandir la inmunidad frente al VIH y en animales experimentales ha demostrado tener un carácter protector frente a la infección [203]. Estrategias que usan una inmunización por DNA seguida de vacunación con virus atenuados de *vaccinia* han mostrado ser capaces de controlar la viremia en macacos [204] haciendo pensar que en humanos estas terapias inmunoestimuladoras también podrían conducir a un control de la viremia.

1.4.5 Papel del timo en la reconstitución inmune

Los linfocitos T se forman a partir de células precursoras que migran desde la médula ósea hasta el timo, donde estos precursores llamados timocitos, proliferan y se diferencian en linfocitos T. En esta diferenciación se producen cambios fenotípicos y el reordenamiento de genes que dan lugar al receptor de la célula T (TCR) que permite el reconocimiento antigénico. El timo es por tanto el órgano linfoide primario responsable de la formación de linfocitos T maduros y está constituido por numerosos lóbulos cada uno de los cuales presenta dos zonas claramente diferenciadas, la corteza o córtex y otra zona más interna o médula tímica.

El repertorio TCR se establece en las primeras etapas de vida y se estima que contiene alrededor de 10^8 especificidades distintas. Las células formadas en el timo colonizan el sistema inmunológico periférico como linfocitos T virgen o *naive*. Tras la respuesta inmune, en la cual los linfocitos T ejercen su papel colaborador (CD4+) o citotóxico (CD8+), estas células mueren o se diferencian en linfocitos memoria. Dado que los linfocitos T presentan una vida media muy prolongada, no era posible saber si el repertorio TCR presente en un individuo de, por ejemplo, 70 años ha sido generado exclusivamente en su infancia o si ha habido una generación continua de nuevo repertorio a lo largo de su vida [205].

En humanos, el timo está completamente formado antes del nacimiento. El grado de producción de linfocitos T por el timo es máximo antes del periodo de pubertad, tras el cual comienza a sufrir una involución asociada a la edad que hizo pensar en un momento determinado que en el adulto este órgano no era funcional [206-209]. Hasta la edad de 20 años el timo presenta más de un 80% de tejido linfoide. Debido a la involución tímica asociada a la edad, esta proporción disminuye paulatinamente por la infiltración de tejido no linfoide hasta alcanzar un porcentaje inferior del 5% de tejido linfoide a partir de la edad de 40 años [209]. Sin embargo, la reciente aparición de un marcador que permite analizar la producción tímica de nuevos linfocitos T ha permitido comprobar que, si bien la función tímica es muy inferior en la edad adulta, existe una pequeña producción de nuevos linfocitos T incluso en personas cercanas a los 70 años [210].

Este marcador proviene del mecanismo por el que se genera el repertorio TCR. En el timo se forman dos tipos de linfocitos T: una mayoría que expresa un TCR formado por cadenas α y β y una pequeña proporción que expresan un TCR de cadenas γ y δ . Todas estas cadenas están codificadas por genes que se encuentran en los segmentos *V*, *D* y *J* (*variable*, *diversity* y *junctional* respectivamente) que son reordenados durante el proceso de maduración del linfocito T en un proceso denominado recombinación *V(D)J* [211]. Durante este proceso de recombinación el locus TCR- δ es específicamente deleccionado en todas los linfocitos T de tipo α - β , que tras la unión de sus extremos, forma un DNA circular extracromosómico denominado TRECs (*TCR rearrangement excision circles*) [212-215]. Estos elementos circulares son estables, permanecen en los linfocitos T cuando éstas pasan del timo a la periferia, no son duplicados durante el proceso de mitosis y son por tanto diluidos en cada ciclo de división celular [215, 216] (Figura 8).

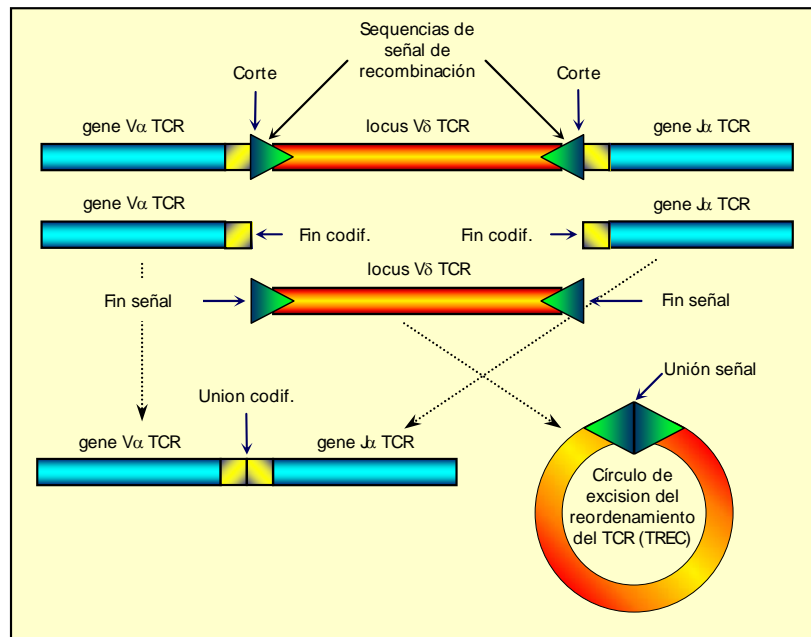


Figura 8. Reordenamiento de genes $V(D)J$ durante la formación del TCR de tipo α - β . La delección del locus TCR- δ seguida de la unión de sus extremos conduce a la formación de los círculos de escisión del TCR (TRECs). Imagen adaptada de Rodewald (1998) [205].

Las características mencionadas de estos TRECs los convierten en buenos marcadores de función tímica, ya que su detección y cuantificación en sangre periférica es indicativa de la producción tímica de nuevos linfocitos T [210]. La detección de estos elementos en linfocitos T α - β *naive* o vírgenes, pero no en linfocitos memoria ni en linfocitos de tipo γ - δ confirma el carácter específico de este marcador. Además se ha comprobado que existe una correlación inversa entre la edad y los valores de TRECs, en clara concordancia con la involución tímica asociada a la edad. Los valores de TRECs en un individuo de 35 años son 5 veces inferiores a los observados en la infancia y a la edad de 65 años son del orden de 50 veces inferiores [210].

La principal consecuencia de la infección por el VIH es una destrucción masiva de linfocitos T CD4 que conduce a una inmunodeficiencia severa. Por esta razón, la recuperación de la población de linfocitos T es clave para evitar la progresión de la enfermedad en estos pacientes. Gracias al uso de terapias antirretrovirales que disminuyen de forma marcada la replicación del virus se ha comprobado que es posible recuperar parte de la población CD4 deplecionada postulando una posible reconstitución inmune [217-

219]. Sin embargo, aunque se consiga normalizar el recuento de linfocitos T CD4+ se ha visto que la restauración fenotípica y funcional de estas células es incompleta [220]. Por todo ello, uno de los objetivos más importantes en el tratamiento de la infección por el VIH es restaurar el sistema inmunológico con el fin de que éste sea capaz de controlar la infección

El aumento de linfocitos T CD4+ observado tras la instauración de terapias antirretrovirales puede tener distinto origen: puede deberse a un aumento en la producción tímica de nuevos linfocitos T, pero también puede darse por una redistribución de células retenidas en los órganos linfoides que al disminuir la carga viral pasan a la periferia, o a una expansión periférica de las células pre-existentes [218], e incluso por una reversión del fenotipo de células memoria a células vírgenes [221]. El origen de estas células va a ser clave en el proceso de reconstitución inmune, ya que una redistribución o expansión periférica sólo aumentara el número de células de los clones que han sobrevivido a la infección. Teniendo en cuenta que los linfocitos T CD4+ VIH-específicos son preferentemente deplecionadas [222] y que por tanto estos clones específicos son los más susceptibles a desaparecer, la redistribución o expansión periférica no permitirían la recuperación de estos clones y limitaría el repertorio de linfocitos T a las células memoria que hayan sobrevivido a la infección, reduciendo la capacidad para responder a nuevos antígenos [223-225]. Sin embargo, la producción tímica de nuevos linfocitos T sí permitiría recuperar el repertorio de especificidades incluyendo los linfocitos específicos frente al VIH. Por todo ello, el timo puede jugar un papel clave en la reconstitución inmune, y este papel puede ser especialmente importante en los niños infectados ya que conservan la funcionalidad del timo y por tanto una mayor capacidad de regenerar las células perdidas a causa de la infección.

1.5 Terapias Antirretrovirales.

Los progresos recientes en el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad por el VIH combinados con el desarrollo de agentes antirretrovirales potentes, ha incrementado el número de opciones de tratamientos antirretrovirales. Además, el conocimiento de la capacidad del virus de producir viriones nuevos de forma continua en el tejido linfóide a lo largo del curso de infección por el VIH, incluso durante la fase clínicamente latente [58], y la alta tasa de replicación viral [25, 27, 226] ha favorecido la utilización de regímenes de terapias antirretrovirales combinada en las fases iniciales de la infección. La rápida tasa de replicación viral junto con la tasa alta de mutaciones incrementan la probabilidad de aparición de cepas mutantes resistentes a los fármacos antirretrovirales con los que está en contacto el virus si no se suprime completamente la replicación viral [192]. Más recientemente, los ensayos clínicos han mostrado caídas de la CV en sangre periférica y en tejido linfóide procedentes de individuos que fueron tratados con terapias combinadas que incluía inhibidores de la proteasa [227-229].

Existen varios pasos en el ciclo biológico del VIH que son diana de los agentes antirretrovirales actualmente disponibles. La RT es una enzima de importancia capital en el ciclo biológico de los retrovirus. Con anterioridad a la aparición del sida, se habían descrito algunos inhibidores de su función, especialmente en retrovirus de animales. Los ***inhibidores de la RT*** fueron los primeros agentes desarrollados para el tratamiento de la infección por el VIH y siguen siendo componentes imprescindibles de los regímenes terapéuticos anti-VIH. Existen tres grupos de fármacos con capacidad de inhibir la RT: los *análogos de nucleósidos* (ITIN), compuestos derivados de las bases púricas o pirimidínicas que actúan como terminadores de cadena durante la síntesis del ADN viral al estar ausente el extremo 3'-OH necesario para la elongación de la cadena de ADN; *análogos de nucleótidos*; y *no análogos de nucleósidos* (ITINN), que se unen directa y específicamente a la RT de una forma no competitiva.

Los ***inhibidores de la proteasa*** (IP) del VIH actúan en otro punto del ciclo biológico y se unen a la poliproteína precursora de Gag entre las posiciones de las proteínas p24 y p17, componentes del virión y necesarias para la infectividad del virus [230], bloqueando el proceso de maduración del virión. La combinación de agentes que pueden inhibir la infección *de novo* de las células (es decir, inhibidores de RT) con agentes que llevan a la

descarga defectiva de viriones no infectivos de células ya infectadas por el VIH (es decir, inhibidores de la proteasa), dan como resultado una actividad antiviral potente; por esto, los IP se han convertido rápidamente en fármacos de opción para el tratamiento de infección por el VIH en combinación con inhibidores de la RT [231, 232].

También se han desarrollado *fármacos que interfieren en la fusión*, como el fármaco T20, que actúa sobre el proceso de fusión de la envuelta viral y la membrana celular, mecanismo necesario para la entrada del virus en la célula hospedadora. Se está trabajando en el desarrollo de fármacos orientados hacia un nuevo objetivo del ciclo vital del VIH, la integración del ADN viral (provirus) en el ADN de la célula hospedadora, que está facilitada por la acción de la integrasa [233]. La nueva familia de fármacos, los *inhibidores de la integrasa*, tiene como objetivo impedir que el VIH se "integre" en el núcleo de la célula, con lo que no sería posible la posterior replicación del virus.

1.5.1 Tratamiento antirretroviral de la infección pediátrica por el VIH

El tratamiento antirretroviral en los niños VIH ha seguido las directrices marcadas para los adultos. Muchos de los fármacos comercializados no disponen de presentación pediátrica y dado que la farmacocinética y farmacodinámica varían con la edad, las dosis utilizadas en niños no han sido las óptimas en algunos de estos fármacos.

El hecho de que un 25% de los niños infectados presenten tras la infección una evolución rápidamente progresiva de la enfermedad, hace necesario el establecimiento del tratamiento antirretroviral tras el diagnóstico, lo antes posible [234].

El objetivo de la terapia antirretroviral es aumentar la duración y calidad de la vida del paciente infectado por el VIH. Esto se consigue suprimiendo la replicación viral hasta valores indetectables, en una fase de la infección suficientemente temprana para que las funciones del sistema inmune aún se conserven, así como la capacidad de recuperación de los linfocitos T CD4+. Sin embargo, esta supresión no siempre se consigue con un solo régimen terapéutico, debido a la aparición de variantes virales resistentes después de un tratamiento prolongado [235], por lo que frecuentemente éste debe ser modificado. Los fármacos antirretrovirales inhibidores de la RT, y sobre todo los IP, han mejorado sustancialmente la perspectiva de tratamiento al aumentar el arsenal terapéutico, disponiéndose actualmente de aproximadamente 17 fármacos antirretrovirales. Sin

embargo, estos fármacos presentan problemas de eficacia, aparición de efectos secundarios y toxicidad. Por otra parte, la utilización de inhibidores de la RT no permite destruir ni inhibir la replicación viral en aquellas células en las que el VIH se encuentra integrado en el genoma del huésped. Los IP, al actuar pos-transcripcionalmente, impiden la producción de partículas virales infectivas, pero no destruyen la célula infectada. En esta situación, a pesar de la eficacia inicial de los tratamientos utilizados, la erradicación del virus del organismo y el bloqueo de la generación de resistencias son todavía una perspectiva lejana. Por otra parte, los macrófagos tisulares, constituyen reservorios que replican de forma crónica el VIH y diseminan la infección viral mediante interacción con otras células del sistema inmune.

Estos datos indican que las nuevas terapias no son capaces de destruir las células que se encuentran ya infectadas por el VIH. Se hace pues necesario pensar y diseñar nuevas estrategias terapéuticas que permitan neutralizar los reservorios de la infección utilizando distintos enfoques [236-238].

1.5.2 Estudios de resistencias en la infección pediátrica

En la actualidad, a los pacientes pediátricos en el momento del diagnóstico y en el curso de la infección por el VIH, se les realiza estudios genotípicos de las regiones de retro-transcriptasa y de la proteasa, que permiten detectar las mutaciones que confieren resistencias a fármacos antirretrovirales y así administrar el tratamiento antirretroviral más eficaz a cada niño [138, 152, 239]. La aparición de mutaciones que confieren resistencias a los fármacos antirretrovirales está directamente relacionada con fracaso virológico al tratamiento e incremento de la CV.

2. Objetivos

Tras la constatación de que las terapias antirretrovirales, a pesar de su mostrada eficacia disminuyendo la replicación del virus, no permiten erradicar el virus, podemos afirmar que la enfermedad del sida sigue siendo, 20 años después de su aparición, una enfermedad incurable que acaba con millones de vidas, sobre todo en los países subdesarrollados.

El fracaso de los fármacos antirretrovirales en erradicar la infección, ha centrado el interés en el propio sistema inmunológico del individuo infectado como alternativa para controlar o erradicar el virus. Ante estos precedentes, el objetivo que se planteó para la realización de esta Memoria, fue estudiar el proceso de recuperación o reconstitución del sistema inmunológico en la infección por el VIH. Dada la involución que sufre el sistema inmune con la edad, principalmente a nivel de la síntesis de nuevos linfocitos T, se consideró que era en niños donde mejor se podría ver reflejada la capacidad potencial del sistema inmune para regenerarse en primer lugar, y en consecuencia controlar de forma efectiva la infección. La constatación de dicha capacidad potencial, abriría nuevas alternativas en el tratamiento de la enfermedad tanto en adultos como en niños mediante la utilización de terapias inmunoestimuladoras, con la esperanza de erradicar el virus, o al menos convertir la infección por el VIH en una enfermedad crónica no mortal. Los objetivos concretos que se plantearon fueron los siguientes:

- Estudiar el efecto del VIH en la función tímica, principal responsable de la regeneración de linfocitos T.
- Determinar el papel que ejerce el timo en el mantenimiento de la población de linfocitos T procedentes de niños infectados por el VIH.
- Estudiar el efecto de las terapias antirretrovirales sobre la función tímica y su relación con el estado inmunológico del niño.
- Analizar los mecanismos homeostáticos que pudieran estar implicados en el mantenimiento o recuperación de la población de linfocitos T.
- Determinar el beneficio que aporta la recuperación o reconstitución del sistema inmunológico en el mejor control de la infección y en la progresión de la enfermedad.

3. Materiales y Métodos

3.1 Sujetos de Estudio.

Los estudios se realizaron con muestras procedentes de 187 niños VIH+ que fueron seguidos en la Sección de Inmuno-Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y del Hospital 12 de Octubre de Madrid. Se realizó un estudio de cohortes bicéntrico retrospectivo entre Mayo de 1990 y Mayo de 2003, con un seguimiento desde su primera consulta y en sucesivas visitas cada 2-3 meses hasta el final del estudio. En cada visita se recogieron los datos clínicos, el porcentaje de linfocitos TCD4+, TCD8+, la carga viral, las características biológicas de los aislados virales y la función tímica mediante la determinación de los valores de células TRECs positivas.

Los niños fueron diagnosticados como infectados por el VIH utilizando métodos de detección directa del VIH previamente descritos (DNA-PCR y cultivo viral) [240]. El factor de riesgo de transmisión fue por vía vertical en todos los niños. Debido a que se trabaja con muestras provenientes de niños de corta edad, la cantidad de células o de muestras disponibles era limitada, por lo que fue inviable hacer todos los estudios con una misma cohorte. De esta manera para cumplir los objetivos proyectados se realizaron distintos diseños de estudio.

3.1.1 Análisis de la función tímica en la infección pediátrica

Los estudios de seguimiento de la función tímica a lo largo de la edad, así como la evolución de los parámetros virológicos e inmunológicos con los tratamientos antirretrovirales se llevaron a cabo con muestras provenientes de 90 niños infectados seguidos desde su nacimiento hasta los 15 años de edad. Como grupo control se utilizaron muestras provenientes de 37 niños no infectados de edades comprendidas entre 0 y 15 años.

3.1.2 Estudios de fenotipo viral

Para determinar la influencia del fenotipo viral sobre la función tímica, se analizaron 90 muestras de niños pertenecientes a la cohorte mencionada, que habían recibido en su mayoría terapia combinada y cuya edad media era de 4,9 años (rango: 0,3 – 10,8 años). Además se

realizó un estudio longitudinal en tres niños de 5 meses, 9 meses y 10 años respectivamente en el periodo en el que se observó un cambio del fenotipo viral.

3.1.3 Determinación de los valores plasmáticos de IL-7

El análisis de los valores de IL-7 se realizó en muestras de plasma previamente congeladas a -70°C procedentes de 5 niños incluidos en la cohorte descrita. Los valores de IL-7 se cuantificaron cada 2-5 meses (dependiendo de la disponibilidad de muestras) a lo largo del seguimiento realizado a los niños desde su nacimiento.

3.1.4 Estudios de respuesta linfoproliferativa y producción de citocinas

El estudio de las respuestas linfoproliferativas y de producción de citocinas de las PBMCs de niños con distinta progresión de la enfermedad se realizó en 21 niños VIH+ divididos en 2 grupos dependiendo de su evolución inmunológica y virológica: a) 7 niños asintomáticos tras 7 o más años de infección por el VIH, b) 14 niños con progresión rápida de la enfermedad. También se realizó un estudio en 32 niños con distinta respuesta a la terapia antirretroviral, agrupándolos en 8 niños asintomáticos a largo plazo, 11 niños respondedores a HAART y 13 niños no respondedores a HAART. Como grupo control se estudiaron muestras procedentes de 17 niños no infectados de edades equivalentes a las de los grupos de niños VIH+.

3.1.5 Estudio de los valores de linfocitos T CD4+ VIH-específicos

La determinación del porcentaje de linfocitos T CD4+ específicos frente al VIH se realizó en el *Laboratoire de Immunopatologie du SIDA* del *Centre Hospitalier Universitaire Vaudois* en Lausanne (Suiza) con muestras procedentes de 24 niños infectados verticalmente por el VIH obtenidas entre Abril y Mayo del 2003 en la Sección de Inmuno-Pediatría del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. La edad media de los niños fue de 10,7 años (E.E.M.: $\pm 0,71$).

Todos los estudios se llevaron a cabo según los criterios establecidos en la Declaración de Helsinki (Edimburgo, 2000) y en el Convenio para la protección de los Derechos Humanos

y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Oviedo, 1997). Igualmente, se siguió la normativa sobre la protección de datos de carácter personal que exige la legislación española (Ley Orgánica 15/1999) y fue revisado y evaluado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario “Gregorio Marañón”. En todos los casos se obtuvo consentimiento de los padres o representantes legales de los niños para la realización del estudio.

3.2 Métodos de Estudio.

3.2.1 Procesamiento de las muestras

3.2.1.1 Extracción y procesamiento del suero

Las muestras de sangre utilizadas en el estudio se obtuvieron por venopunción de los pacientes. Para la obtención de suero, las muestras se recogieron en tubo de vidrio seco, se mantuvieron a temperatura ambiente y se procesaron durante la primera hora siguiente a la extracción. El tubo con la sangre se somete a centrifugación durante 10 minutos a 3500 r.p.m. tras la cual el suero queda en la parte superior del tubo separado del resto de componentes sanguíneos. Dicho suero se recuperó mediante una pipeta pasteur y se congeló inmediatamente para su conservación a -70°C .

3.2.1.2 Extracción y procesamiento del plasma y células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción en tubos de vidrio con anticoagulante EDTA (VACUTAINER®). La sangre se depositó lentamente en tubos de 10 ml, que contenían 3 ml de Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) formando dos fases dadas la distinta densidad del Ficoll y la sangre. Los tubos se centrifugaron a 800 g durante 30 minutos a 24°C y tras ello se recogió el plasma, que se congeló directamente a -70°C , y la banda correspondiente a las PBMCs, las cuales se lavaron con medio RPMI 1640 (Seromed Biochrom. Berlín, Alemania) y finalmente se resuspendieron en medio de cultivo RPMI suplementado con suero fetal de ternera previamente testado (FCS) (Seromed, Biochrom), L-glutamina 2mM (Flow. Irving, Escocia), 50 U/ml de penicilina (Flow) y 50 U/ml de estreptomycin (Flow).

3.2.2 Detección de anticuerpos anti-VIH

La determinación de anticuerpos anti-VIH se realizó mediante un ensayo comercial (New Lav Blot I, Sanofi Pasteur. París, Francia), destinado a la detección de estos anticuerpos por inmunotransferencia (Western-Blot) [241].

3.2.3 Caracterización de los aislados virales

3.2.3.1 Cinética de replicación

Se cocultivaron 2×10^6 PBMCs del paciente con 2×10^6 PBMCs de un donante sano previamente estimuladas con PHA (blastos) en placas de 24 pocillos con 2 ml de medio RPMI suplementado con 20% de FCS y 20U/ml de IL-2. Semanalmente se añadieron 2×10^6 de blastos en 1ml de medio fresco, y dos veces por semana se recogieron los sobrenadantes para determinar la concentración de Ag p24 [150]. La detección y cuantificación de Ag p24 se realizó mediante un enzimoimmunoensayo tipo "sándwich" para la detección de antígenos asociados al virus VIH (INNOTEST HIV Antigen mAb, Innogenetics. Gent, Bélgica).

La cinética de replicación se consideró rápida cuando en el cocultivo se detectaron valores de Ag p24 a día tres de iniciado y lenta si los valores de Ag p24 no se detectaron hasta pasados siete días o más del cocultivo celular. Se consideró cinética de replicación alta si en el cocultivo los valores de Ag p24 eran persistentemente altos (> 200 pg/ml) y baja si estaban por debajo de 200 pg/ml [242].

3.2.3.2 Fenotipo del VIH

Las células MT-2 se incubaron con sobrenadantes provenientes del cultivo de aislamiento del virus (1ml) o con PBMCs obtenidas del cocultivo. Cada ensayo se realizó por duplicado. Cada 3-4 días se reemplazó la mitad del medio por medio completo fresco y se midieron los valores de Ag p24. Se analizó por microscopía de contraste de fase la formación de sincitios. Se consideraron como aislados inductores de sincitios, los cultivos en los que al microscopio se observaban células multinucleadas gigantes o sincitiales y tenían valores de Ag p24 detectables. Además, como las células MT-2 expresan el

receptor CD4 y el co-receptor de quimiocinas CXCR4, pero no el CCR5, ésta línea celular fue utilizada para diferenciar virus X4 o SI de R5 o NSI. Las cepas virales NSI no infectan a la línea celular MT-2 porque no expresa el receptor CCR5. También se usaron las cepas virales BAL (R5 o NSI) y NL-3 (X4 o SI) como control de seguimiento del cultivo y de la formación de sincitios [93].

3.2.4 Cuantificación de carga viral

Los valores de RNA viral se cuantificaron en el plasma de los niños VIH mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando un ensayo comercial de RT-PCR *Amplacor-HIV Monitor™ Test* (Roche Diagnostics. Basel, Suiza) [243] con una sensibilidad de 400 copias de ARN viral por ml.

3.2.5 Determinación de poblaciones linfocitarias

3.2.5.1 Cuantificación del porcentaje de linfocitos TCD4+ y TCD8+

Aproximadamente $2,5 \times 10^5$ PBMCs aisladas de sangre periférica se incubaron con combinaciones de los monoclonales anti-CD4 conjugado con ficoeritrina (PE)/anti-CD3 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y anti-CD8(PE)/anti-CD3(FITC) para identificar los linfocitos T CD4+ y CD8+ que expresaban CD3 (CD4+CD3+; CD8+CD3+) y Leucogate (anti-CD45+anti-CD14) (Becton Dickinson, Franklin, NJ) para identificar el porcentaje de PBMCs [244]. En todos los casos se utilizó un control de fluorescencia inespecífica, usando una inmunoglobulina del mismo isotipo que el de los anticuerpos monoclonales específicos, y que no presentó reactividad con células sanguíneas humanas. Después de 30 minutos de incubación, a 4°C y resguardadas de la luz, las células se lavaron 2 veces a 400xg, durante 5 minutos, a 4°C, con RPMI-1640 suplementado con un 2% de FCS y azida sódica (0,05%), para eliminar el exceso de anticuerpo marcado con fluorocromo. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro FACScan (Becton-Dickinson) usando el programa de adquisición Lysis II (Becton-Dickinson) dentro de las dos horas siguientes a la tinción de las células [245]. Las condiciones óptimas de los distintos parámetros (sensibilidad y amplificación de los

detectores FSC, SSC, FL1, FL2, compensación entre FL1 y FL2) para la adquisición, se determinaron usando el reactivo Calibrite (Becton-Dickinson) y el programa AutoComp (Becton-Dickinson) de forma periódica.

3.2.5.3 Descripción de la técnica de adquisiciones y análisis

3.2.5.2 Cuantificación del número absoluto de linfocitos TCD3+, TCD3+/CD4+ y TCD3+/CD8+ en sangre total

La técnica empleada para el análisis del número total de linfocitos T de sangre periférica fue la técnica de TRUCOUNT™ (Becton-Dickinson) en sangre total. Se añadieron 50µl de sangre total anticoagulada con EDTA a tubos de TRUCOUNT™ que contienen aproximadamente unas 50000 bolitas liofilizadas (según lote).

Después se añadieron 20 µl del reactivo TriTEST que contenía la mezcla de anticuerpos monoclonales correspondiente. Se dejaron incubar unos 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Después se añadieron 450 µl del reactivo de lisis (FACS Lysing Solution), se mezclaron bien con el vórtex y se volvieron a incubar otros 15 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente [246].

Pasado este tiempo, las muestras ya estaban preparadas para pasar por el citómetro, pero antes hubo que resuspenderlas para reducir la agregación. La adquisición se realizó con el sistema FACS Loader, que agita los tubos inmediatamente antes de la adquisición. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur (Becton-Dickinson) usando el programa de adquisición CELLQuest (Becton-Dickinson) inmediatamente tras la tinción de las células. Las condiciones óptimas de los distintos parámetros (sensibilidad y amplificación de los detectores FSC, SSC, FL1, FL2, compensación entre FL1 y FL2) para la adquisición, se determinaron usando el reactivo CaliBRITE (Becton-Dickinson). También se utilizó como control de calidad de forma rutinaria el TRUCOUNT™ Control Beads.

Se realizó una puerta para seleccionar la población linfocitaria en un diagrama de puntos de SSC frente a FL-3 y se adquirieron los eventos necesarios hasta que el número de linfocitos incluidos en esta puerta sumó 3000 eventos. Se cuantificó el porcentaje y número de eventos marcados con los anticuerpos específicos para CD3, CD4 y CD8 dentro de esta puerta de linfocitos y el número de bolas marcadas que fueron adquiridas fuera de la puerta. El número absoluto de células positivas en cada muestra se calculó

dividiendo el número de células positivas por el número de bolas y multiplicando después por la concentración de bolas TRUCOUNTTM [247].

3.2.5.3 Descripción de la técnica de adquisición y análisis

La adquisición se llevó a cabo en un citómetro FACScan (Becton-Dickinson) usando el programa de adquisición Lysis II (Becton-Dickinson) dentro de las dos horas siguientes a la tinción de las células. Los parámetros óptimos para la adquisición (sensibilidad del detector, amplificación del detector, compensación) se determinaron usando el reactivo Calibrite (Becton-Dickinson) y el programa AutoComp (Becton-Dickinson) de forma periódica. Se adquirieron 5000 eventos usando una puerta de adquisición para linfocitos T CD4+ o T CD8+ respectivamente. Dicha puerta se definió usando los parámetros de baja SSC y positividad para CD4, o baja SSC y alta expresión de CD8 [247].

El análisis de los datos se realizó con el programa de análisis Lysis II (Becton-Dickinson). Los criterios que se siguieron fueron los siguientes:

- a) En la selección de los linfocitos T CD4+, se minimizó la contaminación de monocitos realizando una adquisición de linfocitos T CD4+ de alta intensidad y bajo SSC. En la selección de los linfocitos T CD8+, se minimizó la contaminación de células NK adquiriendo sólo las células que expresaban CD8+ de alta intensidad y bajo SSC.
- b) Se utilizaron los controles isotípicos adecuados (IgG1-FITC; IgG1-PE) para valorar la tinción inespecífica, la cual se sustrajo del resto de los resultados. En los diagramas de puntos correspondientes al control, los cuadrantes se ajustaron de tal forma que más del 99% de los eventos estuviesen comprendidos en el cuadrante correspondiente a las células dobles negativas.
- c) Las cifras absolutas de las distintas subpoblaciones analizadas se calcularon multiplicando el valor en porcentaje por el número total de linfocitos T CD4+ y T CD8+.

3.2.6 Cuantificación de linfocitos T CD4+ VIH-específicos

Los linfocitos T CD4+ VIH-específicos se identificaron mediante la medida de la producción intracelular de IFN- γ e IL-2 en presencia de un antígeno viral. Se estimularon entre 2 a 4 millones de PBMCs resuspendidas en 2 ml de RPMI 1640 Gutamax-1 que contenía un 10% de suero fetal bovino, con 5 μ g/ml del antígeno p55 *gag* (Protein Sciences, Meriden, CT), con 200 ng/ml de Enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB, Calbiochem, La Jolla, CA) en el caso del control positivo, o PBS para los controles negativos no estimulados. La incubación se llevó a cabo durante 12-14 horas a 37°C en presencia de 0,5 μ g/ml de anticuerpo anti-CD28 purificado (Becton Dickinson) y 1 μ g/ml de *GolgiPlug* (Becton Dickinson). Tras las 14 horas de incubación se procedió al marcaje permeabilizando y fijando las células con *FACS Permeabilising Solution* (Becton Dickinson) y marcando con anti IFN- γ (APC), IL-2(PE) (Pharmingen, San Diego, CA), CD4(PE-Cy5) y CD69(FITC) (Becton Dickinson) como marcador de activación. La adquisición se llevó a cabo en un citómetro FACSCalibur y para el análisis se utilizó el programa CellQuest (Becton Dickinson). Se adquirieron entre 150.000 y $1,5 \times 10^6$ eventos. Los controles negativos nunca excedieron 0,01-0,02% y se consideraron positivas aquellas muestras estimuladas que tenían un fondo o *background* inferior al 20% del porcentaje total de células positivas para las citocinas analizadas.

3.2.7 Cultivos celulares

3.2.7.1 Cultivos de líneas celulares

La línea celular MT-2 (leucemia de linfocitos T con DNA de HTLV-I integrado) [248] crece en suspensión. Se cultivó con RPMI 1640 suplementado con 20% FCS, 0,3% Bicarbonato sódico, L-glutamina 2mM, 50U/ml de penicilina y 50U/ml de estreptomina en botellas de 25 cm² a una concentración de 5×10^5 células/ml a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂ [155]. Esta línea celular se utilizó para la detección de la formación de sincitios por los aislados primarios VIH procedentes de las PBMCs de los niños. El ensayo se realizó cuando las células estaban en fase de crecimiento exponencial cultivando 2×10^5 de células MT-2 por pocillo en una microplaca de 24 pocillos.

3.2.7.2 Cultivo de PBMCs

Se cultivaron 2×10^6 células/ml PBMC procedentes de los niños incluidos en los estudios en medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de FCS (Seromed, Biochrom), L-glutamina 2mM (Flow), 50 U/ml de penicilina (Flow) y 50 U/ml de estreptomicina (Flow). Los cultivos se realizaron en placas de 24 pocillos a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. En uno de los pocillos las células se estimularon con 1µg/ml de PHA y en el otro no se añadió ningún estímulo, utilizándose como pocillo control. Los cultivos se mantuvieron durante 72 horas, al cabo de las cuales se recogió el sobrenadante, se centrifugó para eliminar los restos celulares y se almacenó a -70°C hasta su utilización [93]. La viabilidad celular fue siempre mayor del 90% medida por exclusión por azul tripán.

3.2.7.3 Proliferación celular

Se cultivaron PBMCs procedentes de los niños incluidos en el estudio, a una concentración de 10×10^5 células en 100µl de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de FCS (Seromed, Biochrom), L-glutamina 2mM (Flow), 50 U/ml de penicilina (Flow) y 50 U/ml de estreptomicina (Flow). Los cultivos se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos con fondo plano a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

Los cultivos de PBMCs se mantuvieron durante 96 horas. La proliferación celular se determinó por incorporación de timidina tritiada (H³) (Amersham. Buckinghamshire, UK) en el DNA de las células; para ello se añadió 1µCi/pocillo de (H³)-Timidina durante las últimas 18 horas del cultivo. Posteriormente las células se recogieron utilizando un colector de células automático (Skatron. Lier, Noruega). La precipitación del DNA de estas células se llevó a cabo con agua destilada sobre filtros (Skatron). Una vez que los filtros se secaron, se colocaron en placas de 24 pocillos con 1ml de líquido de centelleo (Optiphase Hisafe II, Wallac. Turku, Finlandia) para efectuar su lectura en un contador de centelleo (1450 Microbeta Trilux, Wallac).

En el estudio de marcadores de sangre periférica, se montaron cultivos con 2×10^5 células en 200µl de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de FCS (Seromed, Biochrom), L-glutamina 2mM (Flow), 50 U/ml de penicilina (Flow) y 50 U/ml de estreptomicina (Flow). Los cultivos se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo plano

a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. Los cultivos se realizaron por cuadruplicado, con los estímulos siguientes: 1 µg/ml de PHA, 4 µg/ml de Pockweed (PWM), 1 µg/ml anti-CD3+ 1 µg/ml anti-CD28, o ningún estímulo, utilizándose como pocillo control. Los cultivos de PBMCs se mantuvieron durante 72 horas, al cabo de las cuales se recogieron 100 µl de sobrenadante, se centrifugó para eliminar los restos celulares y se almacenó a –70°C hasta su utilización. A cada pocillo se le añadieron 100 µl de medio de cultivo RPMI suplementado con 10% de FCS (Seromed, Biochrom), L-glutamina 2mM (Flow), 50 U/ml de penicilina (Flow) y 50 U/ml de estreptomicina (Flow), que además contenía 1 µCi de (H³)-Timidina (Amershan). Tras 6 horas, se detuvo el cultivo y se determinó la incorporación de timidina tritiada (H³) en el DNA de las células.

3.2.7.4 Producción de citocinas por las PBMCs en cultivo

La cuantificación de las citocinas se realizó a partir de los sobrenadantes de cultivo almacenado a –70°C utilizando inmunoensayos comerciales y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificaron mediante ELISA los valores de IL-5 (Bio Source Internacional, Camarillo CA), TNF-α e IFN-γ (Bender Medical Systems Diagnostics, Viena, Austria) por triplicado.

3.2.7.5 Cuantificación de la concentración plasmática de IL-7

La concentración de interleucina 7 se determinó por duplicado siguiendo las instrucciones del fabricante en muestras de plasma sanguíneo almacenadas a -80°C mediante un ensayo ELISA de alta sensibilidad que detecta tanto la IL-7 libre como la que se encuentra unida a proteínas transportadoras (Quantikine HS Human IL-7 kit. R&D Systems. Abingdon, UK).

3.2.8 Determinación de la producción tímica de nuevos linfocitos T

El ensayo que permite cuantificar la producción de nuevos linfocitos T se basa en la cuantificación de un marcador presente en los linfocitos T que han emigrado recientemente del timo tras su maduración. El estudio de este marcador denominado TREC (*TCR Rearrangement Excision Circles*) se realiza en PBMCs totales o en subpoblaciones aisladas de linfocitos T CD4⁺ o T CD8⁺ procedentes de una muestra de sangre de menos de 1 ml. Tras el conteo de las células se realiza una extracción de DNA en condiciones adecuadas para su utilización en PCR.

Las técnicas disponibles de QC-PCR, densitometrado de bandas, etc. no proporcionan la exactitud y sensibilidad requerida para poder cuantificar de forma exacta el número de copias presentes en la muestra, ya que la determinación se realiza al final de la PCR cuando se ha alcanzado el “*plateau*” de la amplificación (Figura 9) y la cantidad de producto amplificado no es proporcional al número de copias de partida.

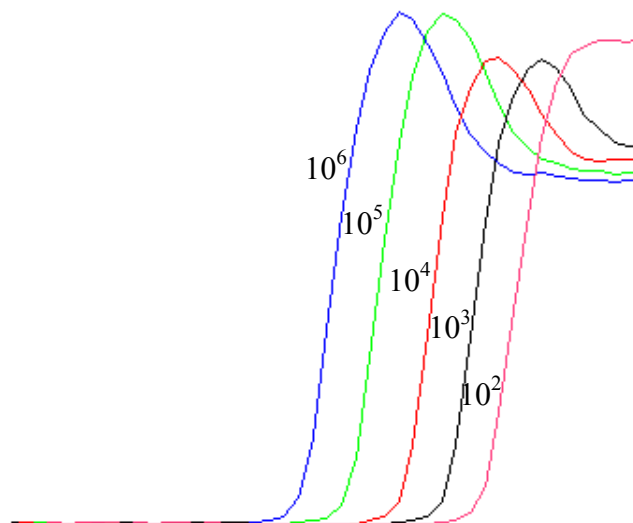


Figura 9. Cantidad de producto amplificado en el desarrollo de una PCR con diluciones seriadas de una muestra con 10^6 copias de la secuencia molde. Al final de la PCR las diferencias desaparecen, sin embargo el inicio del incremento logarítmico sí es proporcional al número de copias de partida.

Sin embargo, la aparición de termocicladores con detector de fluorescencia, permite monitorizar el desarrollo de la PCR en tiempo real mediante la incorporación a la mezcla de reacción de sondas marcadas o de *SYBR green*. Gracias a esta tecnología se puede determinar en que momento se produce el incremento logarítmico de amplificación que será proporcional al número de copias de partida de la secuencia molde. De esta manera, se puede cuantificar de forma precisa el porcentaje de células TREC positivas que sería representativo de la producción de nuevos linfocitos T y por tanto de la función tímica.

3.2.8.1 Extracción de DNA

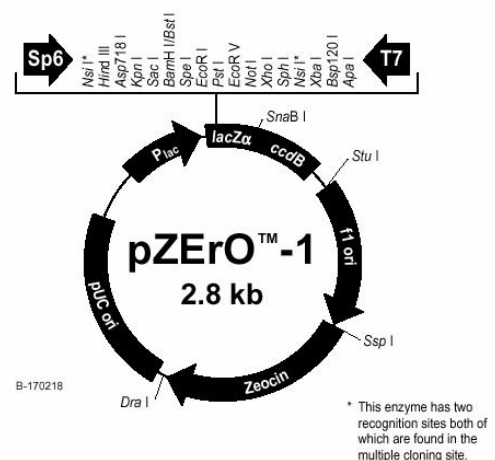
Se cuentan las células, se dispensa 1×10^6 de éstas en un tubo “eppendorf” y se centrifugan para eliminar el sobrenadante. El sedimento seco se puede congelar hasta su utilización o se puede realizar la lisis celular. Para la lisis celular se añade al sedimento 10 μ l de proteinasa K 100 μ g/ml por cada 1×10^5 células (Proteinase K PCR Grade de Roche disuelta en TRIS 10 mM pH 8 grado biología molecular de Sigma) y se incuba a 56° durante 1 hora; después se inactiva la proteinasa K a 95° durante 15 minutos y se centrifuga, quedándonos con el sobrenadante que contiene el DNA.

3.2.8.2 Recta patrón

Para obtener valores del número de TRECs por 10^5 células se realizó una recta patrón con un número conocido de copias de TRECs utilizando un plásmido que tenía insertada parte de la secuencia de los TRECs proporcionado por D. Douek [210].

El estándar es un plásmido comercial (pZero blunt, Invitrogen) que tiene insertada una secuencia correspondiente a los TRECs de 375 pb. y que contiene un gen de resistencia a Zeocina que permite su purificación. Una vez crecido el plásmido y disuelto en agua se cuantifica la cantidad de DNA por absorbancia a 260 nm, dado que se conoce el peso exacto

de una molécula de estándar (plásmido + secuencia TRECs $\rightarrow 4,19 \times 10^{-18}$ g) se puede



saber el número exacto de copias. Haciendo diluciones seriadas se dispensan alícuotas de 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 y 100 moléculas de estándar que se amplificarán junto con las muestras problema para obtener una recta patrón. Tras realizar la PCR se comprobó la calidad de la recta patrón obtenida, siendo considerada como aceptable si tenía un error menor de 0,1 y una $r = 1$ (Figura 10).

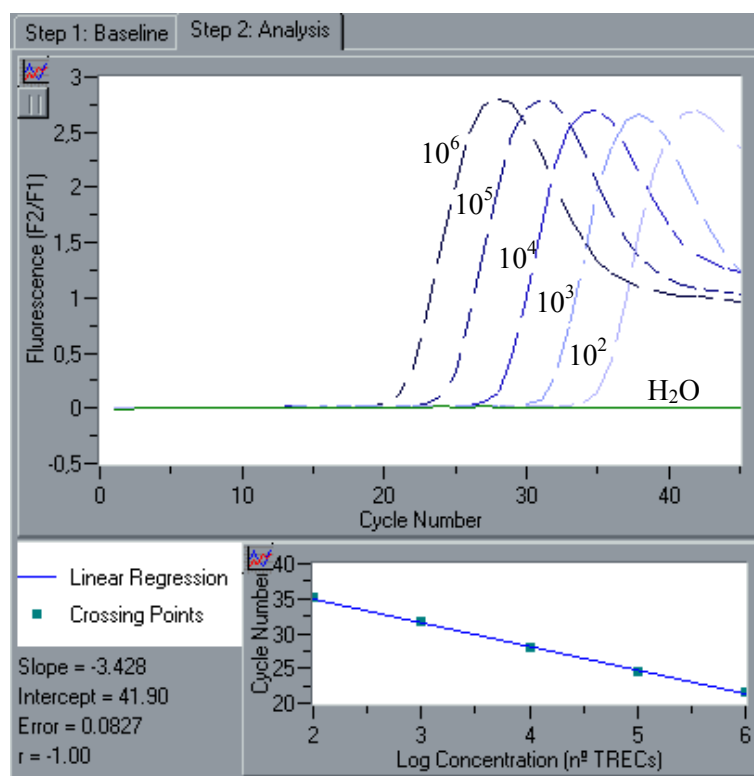


Figura 10. Recta patrón obtenida a partir de la amplificación de una dilución seriada de un plásmido que contiene la secuencia de TRECs.

3.2.8.3 Control interno

En todas las muestras se siguió el mismo procedimiento de extracción y siempre la mezcla de reacción contuvo el DNA correspondiente a 50.000 células. Además, se llevó a cabo un control interno a las muestras para estar seguros de que se añadía la misma cantidad de DNA en las PCR utilizando el *LightCycler Control Kit DNA* (Roche). Mediante esta PCR se amplifica el gen de la β -globina, que es un gen constitutivo del que todas las células presentan una copia, pudiendo determinar la cantidad de DNA en $ng/\mu l$

presente en la PCR. Como recta patrón para el control interno, se utilizó una muestra de DNA genómico humano de concentración conocida que está incluida en el producto.

3.2.8.4 Condiciones de la PCR

En primer lugar se utilizó *SYBR green* (molécula fluorescente que se intercala en todos los fragmentos de DNA de doble hélice) para optimizar las condiciones de la PCR y después se diseñaron Sondas de Hibridación (TIB Molbiol. Berlín, Alemania) específicas de la secuencia a amplificar. Se probaron distintas combinaciones de cebadores y sondas hasta dar con una combinación (Figura 11) con la que se obtenía una amplificación adecuada y que tanto con curvas “melting” como en geles de agarosa (Figura 12) mostraba que se estaba amplificando únicamente el fragmento deseado de los TRECs. Además cada PCR se repitió con las mismas condiciones en días distintos, viendo que la reproducibilidad era muy buena, con variaciones por debajo del 10%. Tras la optimización, las condiciones de la PCR utilizadas son las siguientes: Para la mezcla de reacción se utiliza el producto *LightCycler – FastStart DNA Master Hybridization Probes* (Roche) y se añaden 3,5 mM de MgCl₂, 0,5 μM de cada uno de los cebadores o “primers” y 0,2 μM de cada sonda; En el termociclador se realiza un primer ciclo de 10 min. a 95°C, seguido de 45 ciclos a 95°C (20 seg.), 60°C (20 seg.) y 72°C (20 seg.).

```

AAAGAGGGCAGCCCTCTCCAAGGCAAATGGGGCTCCTGTG
GGGAACAGAGGGGTGCCTCTGTCAACAAAGGTGATGC CACA
      TREC fw
TCCCTTTCAACCATGCT GACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTG
CCCACTCCTGTGCACGGTGATGCATAGGCACCTGCACCCCG
      TREC LCR
TGCCTAAACCCTGCAGCTGGCACGG GCCCTGTCTGCTCTTC
      TREC FLU
ATTCACCGTTC TCACGAGTTGCAATGACAAGTTCAGCC CTCC
      TREC R
ATGTCA CACTGTGTTTTCCATCCTGGG GAGTGTTCACAGCT
ATCCAAGCCCCACGCTGACGAATCACGGCCGAAAACACAC
TCTGATGCCAGCACAGACCACGGAGCAAATGTCAGACAAGA
TAG

```

Figura 11. Secuencia insertada en el plásmido correspondiente a los TRECs en la que se indican los cebadores y sondas de hibridación utilizados.

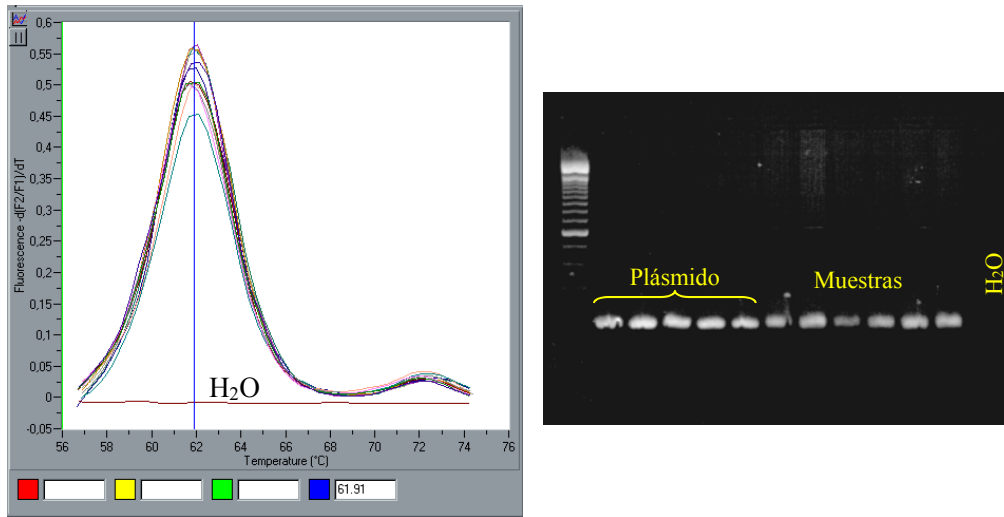


Figura 12. Curva “Melting” y Gel de Agarosa al 2 % de las muestras problema y del plásmido usado para la recta patrón.

3.3 Análisis Estadístico.

3.3.1 Procesamiento de los datos

Se determinaron los valores de porcentaje y células/mm³ de linfocitos T CD4+ y CD8+. En la determinación de correlaciones entre CD4 y las distintas variables se utilizaron los valores de porcentaje de CD4 y no los recuentos absolutos, ya que se ha comprobado que, a diferencia del porcentaje, el número absoluto varía con la edad [78]. Además el porcentaje de CD4 se considera un mejor marcador de progresión de la infección en niños [130]. Por tanto, dado que los niños incluidos en el estudio son de edades distintas, se consideró adecuado utilizar los valores de porcentaje como variable representativa de la población de linfocitos T CD4+.

Para la producción de citocinas en cultivos de PBMCs y la proliferación se utilizaron los valores de producción de citocinas del pocillo control y del pocillo con PHA y se calculó el incremento de producción de citocinas respecto al control. Se estandarizaron los valores de las concentraciones de citocinas en los cultivos de cada paciente según los valores del grupo control. El comportamiento de los valores de citocinas entre los diferentes grupos resultó tener una distribución bastante asimétrica, por ello, se utilizaron como medida de centralización la mediana y como medida de dispersión el rango intercuartílico (RIQ).

3.3.2 Análisis de distribución de variables

Previamente al análisis estadístico se comprobó si los datos a analizar seguían una distribución normal dentro de cada grupo y si las varianzas eran homogéneas, en cuyo caso se aplicó un método paramétrico. En los casos en los que las variables no cumplían los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas, o el tamaño muestral era muy pequeño, se utilizaron métodos no paramétricos.

Para comprobar la bondad de ajuste a la normalidad de cada una de las variables analizadas en este estudio se usó el *test de Kolmogorov-Smirnov* para una muestra. Esta prueba compara la función de distribución acumulada observada para una variable, con una distribución teórica normal. La Z de Kolmogorov-Smirnov se calcula a partir de la diferencia mayor (en valor absoluto) entre las funciones de distribución acumulada teórica y observada

[249, 250]. Para comprobar que las varianzas de los grupos a comparar son homogéneas, se realizó el *test de Levene* cuya hipótesis nula es que las varianzas son iguales.

3.3.3 Métodos paramétricos

❖ Coeficiente de correlación lineal de Pearson

Este coeficiente permite estudiar la fuerza de asociación lineal entre dos variables. Dicha fuerza será nula (asociación lineal inexistente) si $r=0$, aumentando a medida que el valor de r se aproxima a 1 o a -1. El signo del coeficiente r indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo [249].

❖ Modelo de regresión lineal múltiple

Se utilizó este modelo para estudiar si las correlaciones observadas entre variables eran secundarias a factores como la edad, tratamiento, etc. Mediante este análisis se analizan tres o más variables simultáneamente y se realiza el ajuste de variables que puedan dar lugar a fenómenos de confusión incluyéndolas como covariables [251].

❖ T de Student para muestras independientes

Cuando se necesitó comparar las medias de una determinada variable entre dos grupos y dichas variables cumplían los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizó la *t de Student*. La distribución *t* de Student es muy parecida a la distribución normal pero no requiere disponer de un parámetro de dispersión poblacional y tiene en cuenta el tamaño de la muestra [252]. Cuando las varianzas no eran homogéneas, se aplicó el *test de Welch*.

❖ Análisis de la varianza

La comparación de las medias de cada variable cuando se estudiaban más de dos grupos se efectuó mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Las variables deben cumplir los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Este análisis estudia la variabilidad entre los grupos y dentro de los grupos. La *F Snedecor* detectará si las medias de al menos un grupo difiere del resto [253]. Si existen diferencias significativas entre los distintos grupos se realizan las denominadas comparaciones *post hoc* para determinar entre qué

grupos concretos se dan estas diferencias como las pruebas de *Bonferroni* o *Scheffe* cuando las varianzas son homogéneas o la prueba de *Tamhane* cuando no son homogéneas.

3.3.4 Métodos no paramétricos

Las pruebas estadísticas no paramétricas se utilizaron cuando la muestra fue pequeña o la distribución de los datos en la población fue libre (los datos no procedían de poblaciones normales y con igualdad de varianzas).

❖ U de Mann-Whitney

Contrasta si dos muestras de dos subpoblaciones tienen la misma distribución. Las observaciones de ambos grupos se combinan y clasifican con respecto al rango promedio asignado en caso de producirse empates. Si la posición de las poblaciones es idéntica, deberán mezclarse aleatoriamente los rangos en ambas muestras.

❖ Análisis de correlación de Spearman

Variante de coeficiente de correlación de Pearson. Es una medida de asociación que se calcula a partir de la asignación de rangos a los valores ordenados. Dicha asociación será nula si $R=0$, aumentando a medida que el valor de R se aproxima a 1 ó a -1. El signo del coeficiente R indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo.

4. Resultados

Con el fin de evaluar el proceso de reconstitución inmunológica en los niños infectados por el VIH en primer lugar se estudió el papel que juega el timo en este proceso. Si bien se ha comprobado que tanto en adultos como en niños es posible una recuperación de la población de linfocitos T CD4+ debido a las TAR, la procedencia de estas células CD4 va a ser un factor clave en la capacidad para recuperar el repertorio de especificidades de dichas células y recuperar la capacidad inmunológica para responder al VIH y demás infecciones oportunistas. Un incremento en el número de linfocitos T CD4+ debido a una redistribución o expansión periférica no permitiría una recuperación de los clones perdidos a causa de la infección, principalmente los clones específicos frente al VIH. Sin embargo, una repoblación de linfocitos por parte del timo si podría recuperar los clones específicos frente al VIH y otros patógenos oportunistas que hayan sido eliminados a causa de la infección. Si además se tiene en cuenta que el niño no ha sufrido la involución tímica asociada a la edad, puede que conserve la capacidad para repoblar la población de linfocitos T CD4+ y recuperar un sistema inmunológico adecuado.

4.1 Efecto de la Infección por el VIH sobre la Función Tímica.

Dado que el VIH ha mostrado ser capaz de infectar y destruir timocitos [42, 43] alterando la función tímica [254] y la producción de nuevos linfocitos T [210], se determinó en primer lugar cual era el efecto de la infección por el VIH en la función tímica de los niños infectados. Para ello se compararon los valores de TRECs desde el nacimiento hasta la edad de 15 meses en 15 niños no infectados y 8 niños infectados verticalmente por el VIH (Artículo 1 (pg 87). Correa *et al. Pediatric Research* 52:207-212, 2002). Este estudio se amplió posteriormente incluyendo un total de 90 niños infectados y 37 niños no infectados con un seguimiento desde el nacimiento hasta la edad de 15 años, cuyos resultados se muestran en la Figura 14.

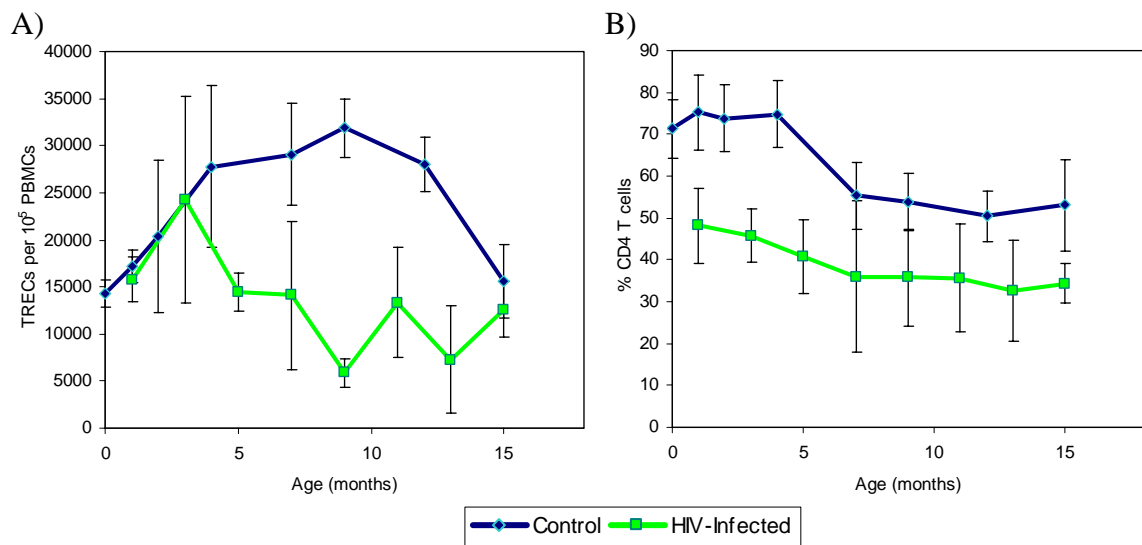


Figura 13. Valores de TRECs por 10⁵ PBMCs (A) y porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (B) en niños infectados y no infectados por VIH desde el nacimiento hasta la edad de 15 meses. (**Artículo 1. Figure 1** (pg 90). Correa *et al. Pediatric Research* 52:207-212, 2002).

Los resultados muestran que la infección por el VIH produce una marcada inhibición de la función tímica que se ve reflejada en los valores significativamente menores de TRECs observados en los niños VIH+ en comparación con los niños no infectados.

Desde el nacimiento a la edad de 15 meses los valores de TRECs ($P < 0,01$) y el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ ($P < 0,001$) fueron significativamente inferiores en niños infectados por el VIH ($n=8$) que en niños no infectados ($n=15$) (Figura 13). Además, se observó que durante los 3 primeros meses de vida no existían diferencias en los valores de TRECs entre los niños infectados y no infectados.

Cuando se amplió el estudio hasta la edad de 15 años se obtuvieron resultados similares. Los valores de TRECs ($P < 0,001$) y el porcentaje de CD4 ($P < 0,001$) fueron significativamente inferiores en los niños infectados ($n=90$) que en los no infectados ($n=37$) (Figura 14).

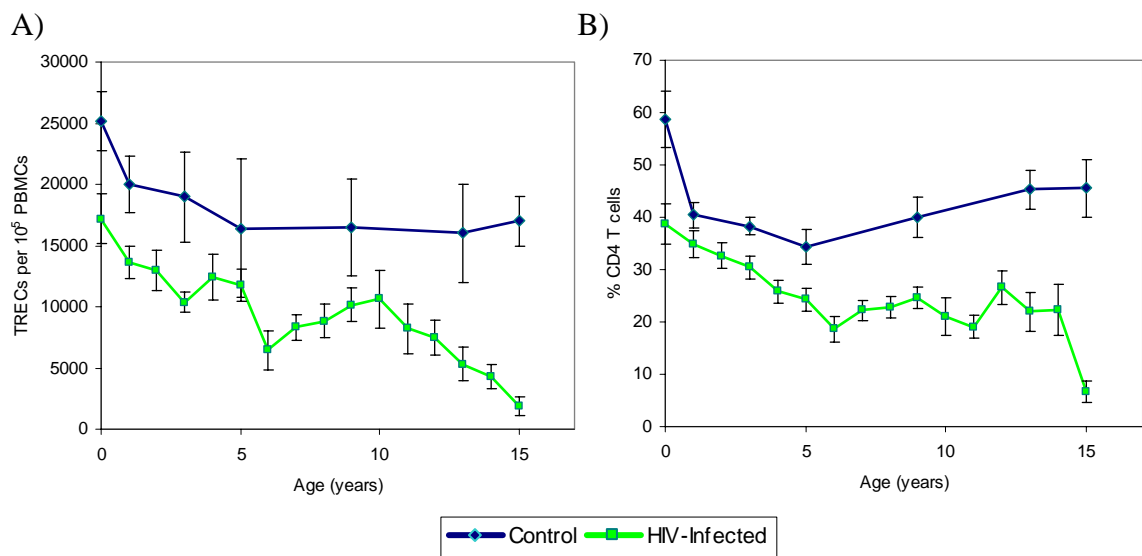


Figura 14. Valores de TRECs por 10^5 PBMCs (A) y porcentaje de linfocitos T CD4⁺ (B) en niños infectados y no infectados por VIH de 0 a 15 años de edad.

Los resultados muestran claramente que los niños infectados por el VIH tienen valores significativamente inferiores de TREC que los niños no infectados. Sin embargo, cabe indicar que dentro del grupo de niños infectados se observaron diferencias en cuanto a los valores de TRECs dependiendo de su estadio clínico o inmunológico (**Artículo 2** (pg 94). Resino, Correa *et al.* *Clin. Exp. Immunol.* 132:105-112, 2003). Los niños definidos como progresores rápidos (RP) presentaban valores muy inferiores de TRECs (media= 783 TRECs/ 10^5 PBMCs) en comparación con niños no infectados de la misma edad (media= 13720 TRECs/ 10^5 PBMCs), mientras que los niños definidos como asintomáticos a largo plazo (LTA) presentaron valores de TRECs similares (media= 10804 TRECs/ 10^5 PBMCs) a los observados en los niños no infectados (**Artículo 2.** *Figure 1a* (pg 99)).

4.2 Importancia de la Función Tímica en Niños Infectados por el VIH.

Para determinar que influencia tiene la producción tímica de nuevos linfocitos T en los valores periféricos de estas células se analizó la correlación existente entre los valores de TRECs y los porcentajes de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en 182 muestras procedentes de niños VIH+ de edades comprendidas entre 0 y 15 años. Los resultados muestran que existe una correlación positiva entre los valores de TRECs y el porcentaje de linfocitos T CD4+ (Coef. Pearson =0,78; $P<0,001$) (Figura 15A). Sin embargo, estos valores de TRECs correlacionaban negativamente con el porcentaje de linfocitos T CD8+ (Coef. Pearson = -0,40; $P<0,001$) (Figura 15B), que probablemente fueran secundarios a la correlación inversa que existía entre el porcentaje de linfocitos T CD4+ y CD8+.

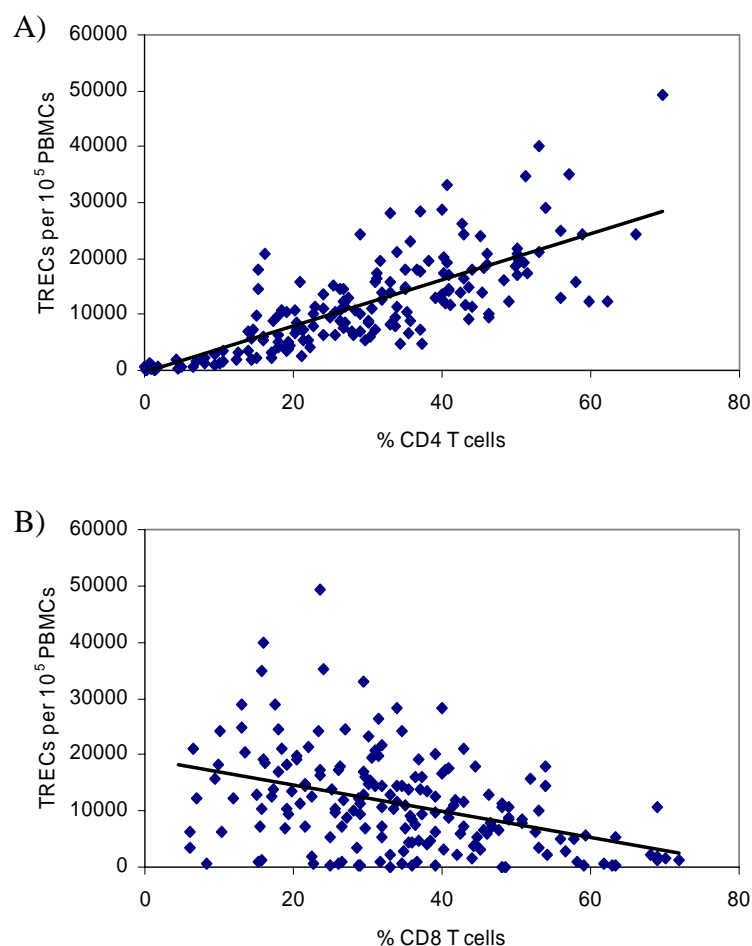


Figura 15. Correlación entre valores de TRECs por 10^5 PBMCs y porcentaje de linfocitos T CD4+ (A) y T CD8+ (B) en niños infectados por VIH.

Además, al realizar un estudio de seguimiento en varios niños infectados, se observó que cuando se producía un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ siempre coincidía con un incremento en los valores de TRECs (**Artículo 1. Figure 3** (pg 92)). Mientras que no existía correlación alguna entre los valores de TRECs y las variaciones en el porcentaje de linfocitos T CD8+ ($P>0,05$) (Figura 16).

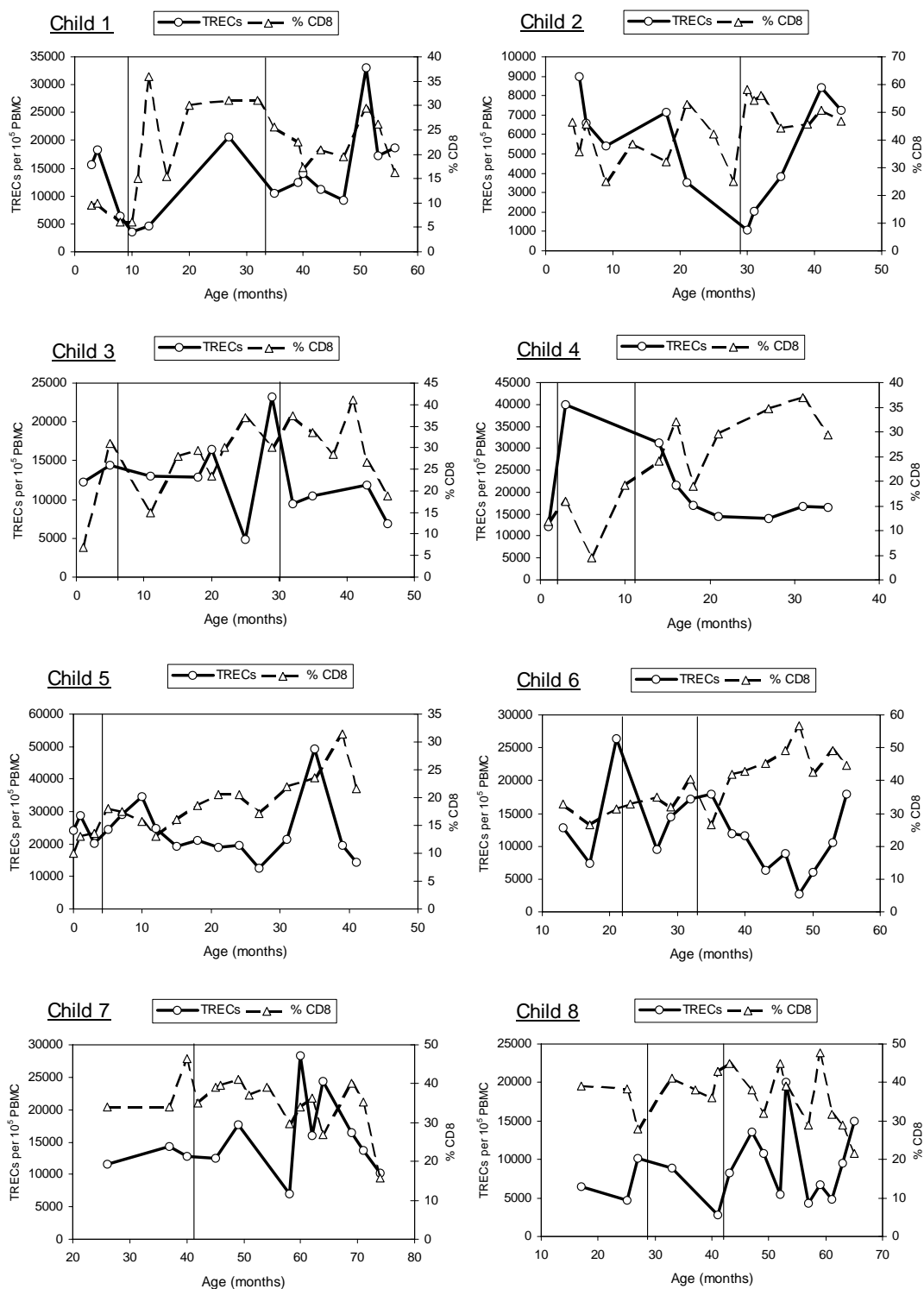


Figura 16. Evolución de los valores de TRECs/ 10^5 PBMCs y porcentaje de linfocitos T CD8+ en los 8 niños incluidos en el estudio. Las líneas verticales punteadas representan el inicio o cambio a un nuevo régimen antirretroviral

Estos resultados indican que las variaciones en los valores de linfocitos T CD4+ dependen en gran medida de la producción tímica de estas células, mientras que los cambios en la población de linfocitos T CD8+ serían debidos a otros factores distintos de la producción tímica, tales como fenómenos de redistribución o expansión periférica.

4.3 Efecto del Fenotipo Viral sobre la Función Tímica.

La aparición de cepas X4 o SI en individuos infectados se ha asociado a una mayor progresión a la enfermedad de sida tanto en adultos como en niños [150, 255]. Además, también se ha descrito que la presencia de virus con fenotipo SI se asocia con una mayor caída de linfocitos T CD4+ [150, 256, 257].

Los resultados previamente mostrados indican por un lado que el VIH ejerce un efecto inhibitorio sobre la producción tímica de nuevos linfocitos T, y por otro lado que los valores de linfocitos T CD4+ en niños VIH+ dependen en gran medida de la producción tímica de estas células. Por tanto, la mayor disminución de linfocitos T CD4+ asociada a la aparición de cepas X4, podría deberse en parte a un mayor efecto inhibitorio de estas cepas sobre la función tímica. Para determinar si distintas cepas virales tienen un efecto diferencial sobre la función tímica, se estudió la correlación existente entre fenotipo viral, cinética de replicación y valores de TRECs en 90 muestras procedentes de niños infectados verticalmente por el VIH (**Artículo 3** (pg 102). Correa *et al.* *AIDS* 15:1959-1963, 2001).

Coincidiendo con los resultados previamente mostrados, se observó que tanto en niños con virus R5 como con virus X4, existía una correlación significativa entre TRECs y porcentaje de linfocitos T CD4+ ($P<0,001$) (**Artículo 3. Figure 1a** (pg 105)). Esto confirma el papel clave del timo en el mantenimiento de la población de linfocitos T CD4+. Los resultados muestran diferencias significativas con respecto al fenotipo viral. En niños con aislados virales con fenotipo X4 o SI, los valores de TRECs y el porcentaje de linfocitos T CD4+ fueron inferiores (menos de la mitad) a los observados en niños con aislados R5 o NSI ($P<0,001$) (**Artículo 3. Table 1** (pg 104)). Estas diferencias se mantuvieron cuando se incluyeron en el análisis el efecto de la edad y el ART como covariables. Los valores de CV no fueron significativamente diferentes entre el grupo con aislados X4 y el grupo con aislados R5. En cuanto a la cinética de replicación, no se observaron diferencias en porcentaje de linfocitos T CD4+, valores de TRECs y CV entre niños con cepas de replicación lenta/baja (S/L) o cepas de replicación rápida/alta (R/H).

Para confirmar que el cambio de fenotipo de R5 a X4 se asociaba con una mayor inhibición tímica, se hizo un estudio longitudinal en 3 niños VIH+ en los que se había observado un cambio de fenotipo durante el seguimiento. En los 3 casos, el cambio de

fenotipo R5 a X4 fue seguido de una marcada disminución en los valores de TRECs (**Artículo 3. *Figure 1b*** (pg 105)), confirmando el mayor efecto inhibitorio de las cepas X4 sobre la función tímica.

4.4 Efecto de la Terapia Antirretroviral en la Recuperación de Linfocitos T CD4+.

Tras comprobar el efecto inhibitorio que ejerce el VIH sobre la función tímica, se estudió si la TAR, al disminuir la CV, conducía a una recuperación en dicha función tímica al disminuir el efecto inhibitorio ejercido por el virus. También se analizó si la recuperación de linfocitos T CD4+ que se da tras el control de la viremia por la terapia, era debida a una repoblación por nuevos linfocitos T CD4+ producidas en el timo, o bien se debía a una redistribución o expansión periférica de los linfocitos T CD4+ preexistentes.

Se llevó a cabo un estudio longitudinal en 3 niños que iniciaron un tratamiento con terapia combinada (2 análogos de nucleósido) y 3 niños que iniciaron TAR de alta eficacia o HAART (2 análogos de nucleósido y 1 inhibidor de proteasa) (**Artículo 4** (pg 107). Correa *et al. AIDS* 16:1181-1187, 2002).

La TAR condujo a un marcado descenso de la CV en los niños tratados con terapia combinada y a una supresión completa hasta valores de CV indetectable en los niños tratados con HAART. La caída de la CV fue acompañada en todos los casos de un marcado incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ (**Artículo 4. Figure 1** (pg 108)) que se correlacionaba negativamente con la CV ($P<0,05$). El incremento de linfocitos T CD4+ tras el inicio de la terapia coincidía en todos los casos con un incremento en los valores de TRECs, existiendo una correlación altamente significativa entre ambas variables ($P<0,001$) (**Artículo 4. Figure 1** (pg 108)), que junto con los resultados obtenidos previamente (**Artículo 1. Figure 3** (pg 92)) indican un origen tímico de la reconstitución de linfocitos T CD4+ en estos niños infectados.

El origen tímico de los linfocitos T CD4+ recuperadas tras la terapia fue confirmado al estudiar niños que a pesar de recibir la TAR durante más de 3 años no habían sido capaces de recuperar los linfocitos T CD4+ (Non-Rec) (**Artículo 5** (pg 110). Resino, Correa *et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18:1395-1406, 2002). En este grupo de niños se observaron valores de TRECs significativamente inferiores ($P<0,01$) a los observados en los niños tratados que sí habían respondido a la terapia con un incremento en linfocitos T CD4+ (Rec) (**Artículo 5. Figure 2c** (pg 118)).

4.5 Papel de la Interleucina-7 en la Homeostasis de Linfocitos T CD4+

El hecho de que tras la caída de CV se produzca un marcado incremento en la producción tímica de nuevos linfocitos T, hace pensar que debe existir un mecanismo de homeostasis que active esta producción de nuevas células cuando los valores de linfocitos T CD4+ son anormalmente bajos, como ocurre en la infección por el VIH. Entre los posibles factores que puedan estar implicados en este mecanismo, el candidato más probable es la IL-7, ya que ha mostrado estar implicada en la diferenciación de timocitos en linfocitos T maduros [258, 259]. Además se han observado valores plasmáticos de IL-7 altos asociados a valores de linfocitos T CD4+ bajos en individuos infectados por el VIH [260-263], por lo que se ha propuesto a IL-7 como el principal candidato responsable de este mecanismo de homeostasis.

En base a esto, se estudió si existía alguna asociación entre los valores plasmáticos de IL-7 y la recuperación tímica de linfocitos T CD4+ que se había observado en los niños infectados por el VIH. Para ello, se realizó un estudio longitudinal a lo largo de 100 meses en 5 niños infectados verticalmente por el VIH (**Artículo 6** (pg 122). Correa *et al.* *J. Clin. Immunol.* 23:401-406, 2003), determinando cada 2-3 meses los valores de CD4, TRECs, CV y valores plasmáticos de IL-7. También se compararon los valores de IL-7 en niños no infectados, niños infectados pero que se mantenían asintomáticos (LTA) y niños infectados con una progresión rápida de la enfermedad (RP) (**Artículo 2** (pg 94). Resino, Correa *et al.* *Clin. Exp. Immunol.* 132:105-112, 2003).

Coincidiendo con trabajos previos, se observó una correlación negativa entre valores plasmáticos de IL-7 y porcentaje de linfocitos T CD4+ ($P < 0,001$). La caída de linfocitos T CD4+ a causa de la infección estaba siempre asociada a valores anormalmente altos de IL-7 (**Artículo 6. Figure 1**(pg 125)). Los niños infectados definidos como progresores rápidos (RP) presentaban valores significativamente inferiores de linfocitos T CD4+ ($P < 0,01$) y valores superiores de IL-7 ($P < 0,01$) en comparación con los niños asintomáticos (LTA) o no infectados. Sin embargo los LTA, con recuentos de linfocitos T CD4+ por encima de 600 cel./mm^3 , presentaban valores plasmáticos de IL-7 similares a niños no infectados (**Artículo 2. Figure 1b** (pg 99)).

Tras la drástica disminución de CV como consecuencia del TAR, se observó un marcado incremento en TRECs y linfocitos T CD4+ que fue seguido por una caída de los valores plasmáticos de IL-7 hasta los valores basales previos a la caída de linfocitos T

CD4+ (**Artículo 6. Figure 1** (pg 125)). Sin embargo, no se encontró ninguna correlación entre el porcentaje de linfocitos T CD8+ y los valores plasmáticos de IL-7 ($P>0,05$), y sólo apareció correlación entre TRECs y porcentaje de linfocitos T CD8+ en el niño 4 ($P=0,01$), mientras que en los demás no existió correlación entre estas variables ($P>0,05$). Estos resultados indican que la IL-7 parece ser la principal responsable de activar la producción tímica con el fin de recuperar la población de linfocitos T CD4+ disminuida a causa de la infección.

4.6 Respuestas Linfoproliferativas y Producción de Citocinas.

Los resultados obtenidos demostraban que los niños infectados por el VIH conservan la capacidad de repoblar y recuperar la población de linfocitos T CD4+, y que en niños, esta recuperación o repoblación tiene principalmente un origen tímico. El origen tímico de estas células puede favorecer la recuperación del repertorio de especificidades de los linfocitos T, pudiendo recuperar por tanto respuestas específicas frente al VIH y otros patógenos. Para estudiar la capacidad funcional del sistema inmune en estos niños, se analizaron la capacidad de proliferación y la producción de citocinas en respuesta a distintos mitógenos y antígenos de recuerdo en PBMCs, que han demostrado ser uno de los primeros parámetros inmunológicos que se ven afectados en el curso de la infección (**Artículo 2** (pg 94). Resino, Correa *et al.* *Clin. Exp. Immunol.* 132:105-112, 2003; **Artículo 5** (pg 110). Resino, Correa *et al.* *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18:1395-1406, 2002). Los resultados muestran que los niños definidos como LTA, que presentaban una adecuada función tímica definida por unos valores de TRECs similares a niños no infectados (**Artículo 2. Figure 1a** (pg 99)), mostraban respuestas proliferativas a mitógenos (PHA, PWM y anti-CD3 + anti-CD28) similares a las observadas en controles no infectados. Estas respuestas proliferativas en LTA y controles fueron superiores a las observadas en niños definidos como progresores rápidos (RP) (**Artículo 2. Table 2** (pg 97)), que presentaban valores de TRECs significativamente inferiores. Las respuestas alogénicas HLA, determinadas mediante cultivo mixto de linfocitos frente a PBMCs de donante no emparentado, también mostraron ser similares entre LTA y controles, y muy inferiores en progresores rápidos. Las respuestas a toxoide tetánico (TT) y *streptokinase* (SK) en LTA fueron inferiores a las observadas en niños no infectados, pero superiores a las obtenidas en RP. En cuanto a la respuesta frente a antígenos del VIH (p24) no se observaron diferencias significativas entre LTA y RP. Por último, la producción de IFN- γ y TNF- α en LTA fue significativamente superior a la observada en RP y similar a la de los niños no infectados (**Artículo 2. Table 2** (pg 97)).

Se realizó otro estudio en el que se comprobó que las respuestas linfoproliferativas a mitógenos eran significativamente superiores en niños infectados que habían respondido a la terapia con una recuperación de linfocitos T (Rec) (**Artículo 5. Figure 1c** (pg 114)), que en niños que no habían respondido a la terapia (Non-Rec) y cuyos valores de TRECs eran

inferiores (**Artículo 5. Figure 2c** (pg 118)). Sin embargo, entre estos dos grupos de niños infectados (Rec y Non-Rec) no se observaron diferencias significativas en cuanto a la respuesta a antígenos y producción de citocinas (**Artículo 5. Figure 1a y 1b** (pg 114)).

4.7 Respuestas VIH-específicas de los Linfocitos T CD4+

Como se ha comentado, el origen tímico del incremento de CD4 podría permitir la repoblación de clones específicos, recuperando las repuestas específicas frente al VIH que estarían especialmente disminuidas. Dada la importancia que han mostrado tener las respuestas de linfocitos T CD4+ colaboradores o “helper” en el control antiviral se decidió estudiar en profundidad las respuestas CD4 VIH-específicas. Para ello, se determinaron en 24 niños infectados verticalmente (edad media: 10,7±0,71 años) los porcentajes de linfocitos T CD4+ VIH-específicos por su capacidad de secretar IFN- γ e IL-2 en respuesta a la estimulación antigénica con la proteína p55 gag del VIH. A diferencia de los estudios de proliferación celular, este método nos permitiría una cuantificación precisa del número de linfocitos CD4 específicos y también nos aportaría información sobre el fenotipo de los linfocitos específicos de memoria.

Coincidiendo con estudios previos [264], tres poblaciones funcionalmente distintas fueron identificadas: a) células secretoras de IFN- γ ; b) células secretoras de ambas citocinas (IL-2⁺/IFN- γ ⁺); y células que secretan únicamente IL-2. Los resultados mostraron que los niños alcanzaban valores de células específicas muy superiores a los observados en adultos [185, 264-267], alcanzando en algunos niños valores de 0,90% de células secretoras de IL-2 o 0,91% de secretoras de IFN- γ (Figura 19).

Respecto a las frecuencias relativas de estas tres poblaciones distintas, se observó que en los 24 niños analizados se daban tres modelos o patrones distintos (Figura 17). En 10 de los 24 niños, más del 70% de los linfocitos T CD4+ VIH-específicos eran células secretoras de IL-2 únicamente, que correspondería con linfocitos de tipo memoria central (T_{MC}). Nueve de los niños presentaban los 3 tipos de células específicas mencionados (IL2⁺, IL-2⁺/IFN- γ ⁺ y IFN- γ ⁺). Los linfocitos T CD4+ VIH-específicos de los restantes 5 niños eran en su mayoría (>60%) células secretoras de IFN- γ , que correspondería con células de tipo memoria efectoras (T_{ME}). El porcentaje medio de células VIH-específicas en el total de linfocitos T CD4+ fue muy alto en los 3 grupos en comparación con los valores observados en adultos [185, 264-267] (Figura 18).

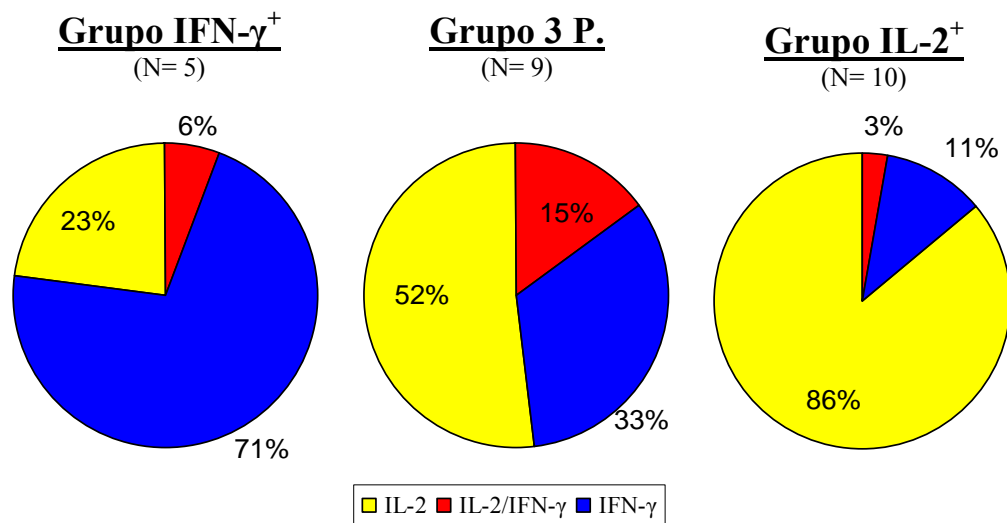


Figura 17. Media de las frecuencias relativas de células IL-2⁺, IL-2⁺/IFN- γ ⁺ e IFN- γ ⁺ en la población de linfocitos T CD4⁺ VIH-específicos en los tres grupos definidos.

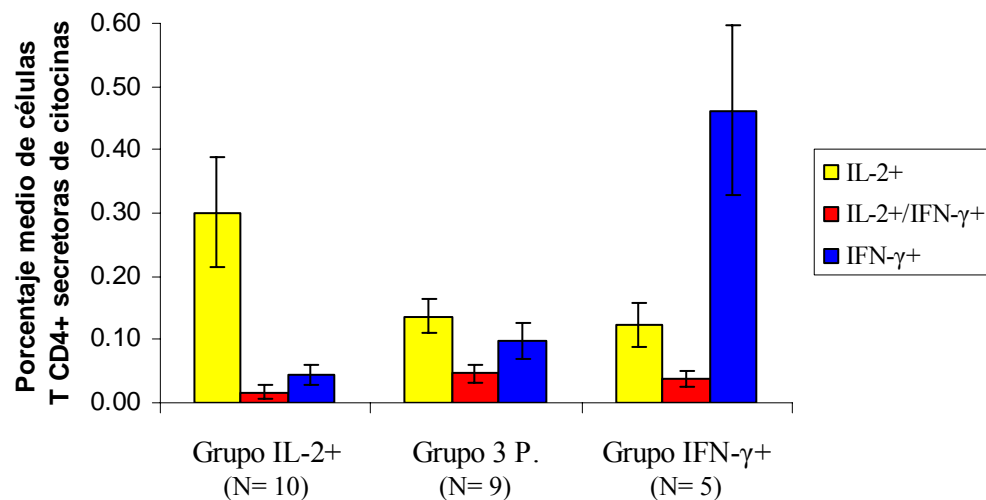


Figura 18. Porcentaje medio \pm E.E.M. de linfocitos T CD4⁺ VIH-específicos secretoras de IL-2, IFN- γ , y ambas citocinas en el total de linfocitos T CD4⁺ en los tres grupos definidos.

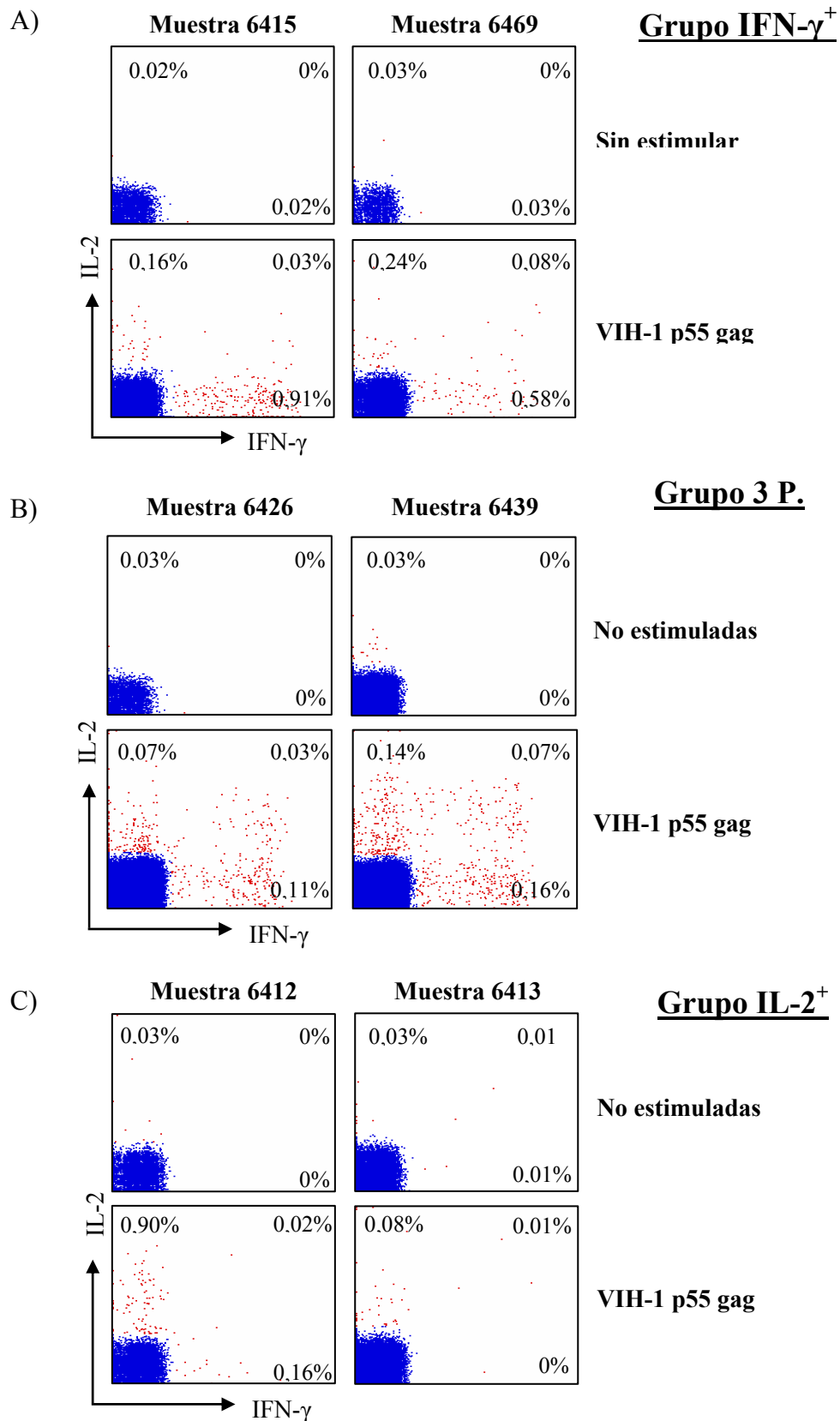


Figura 19. Histogramas de la citometría de muestras representativas del grupo con predominio de IFN- γ ⁺ (A), grupo con las 3 poblaciones representadas (IL-2⁺, IL-2⁺/IFN- γ ⁺, IFN- γ ⁺) (B) y grupo con predominio de IL-2⁺ (C).

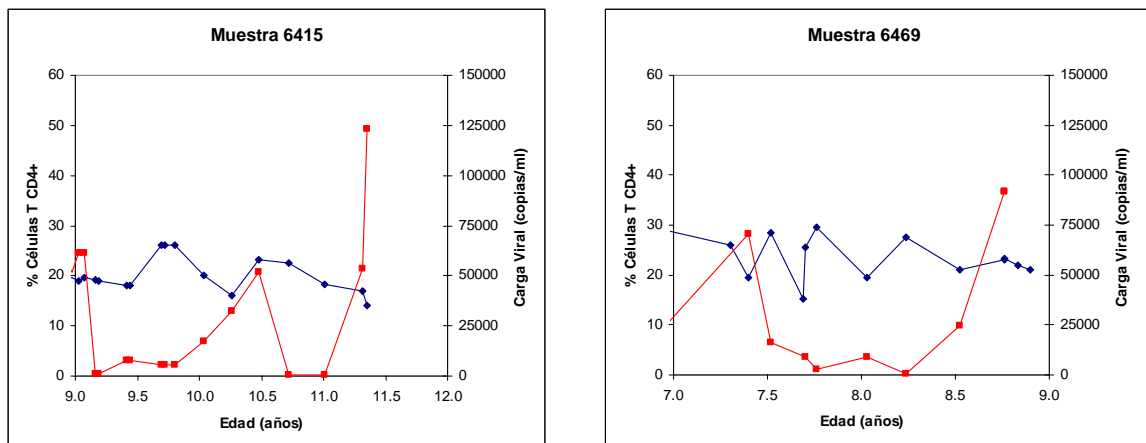
Dado que los TAR fueron similares en todos los niños, se analizaron distintas variables inmunológicas y virológicas con el fin de determinar a qué se debían los 3 distintos modelos observados (Tabla 4). El análisis de la varianza (ANOVA) mostró que la CV era la única variable que difería entre los tres grupos ($P < 0,001$), mientras que la edad ($P = 0,702$), porcentaje de linfocitos T CD4+ ($P = 0,744$), porcentaje de linfocitos T CD8+ ($P = 0,243$) y valores de TRECs ($P = 0,981$) no diferían entre los 3 grupos. Sólo la CV resultó ser significativamente mayor en el grupo con predominio de células IFN- γ^+ (71880 ± 22727 copias/ml) con respecto al grupo con predominio de IL-2 $^+$ (798 ± 296 copias/ml; $P < 0,001$) y el grupo con las 3 poblaciones representadas (923 ± 320 copias/ml; $P < 0,001$).

| | Grupo \uparrowIFN-γ (T _{ME}) | Grupo 3 P. (T _{MC} ~ T _{ME}) | Grupo \uparrowIL-2$^+$ (T _{MC}) |
|-----------------------------------|---|---|---|
| Edad (años) | 10,46 \pm 1,14 | 10,16 \pm 0,92 | 11,51 \pm 1,48 |
| Carga Viral (copias/ml) | 71880 \pm 22727 * | 923 \pm 320 | 798 \pm 296 |
| % CD4 | 26,80 \pm 3,64 | 28,67 \pm 3,22 | 30,39 \pm 2,61 |
| % CD8 | 45,48 \pm 3,89 | 41,92 \pm 4,10 | 36,38 \pm 2,83 |
| TRECs (por 10 ⁶ PBMCs) | 15092 \pm 4054 | 16247 \pm 4411 | 15375 \pm 4183 |
| % IL-2 $^+$ | 0,124 \pm 0,034 | 0,136 \pm 0,027 | 0,301 \pm 0,087 |
| % IL-2 $^+$ /IFN- γ^+ | 0,038 \pm 0,014 | 0,046 \pm 0,013 | 0,016 \pm 0,011 |
| % IFN- γ^+ | 0,462 \pm 0,135 | 0,097 \pm 0,028 | 0,044 \pm 0,016 |
| N | 5 | 9 | 10 |

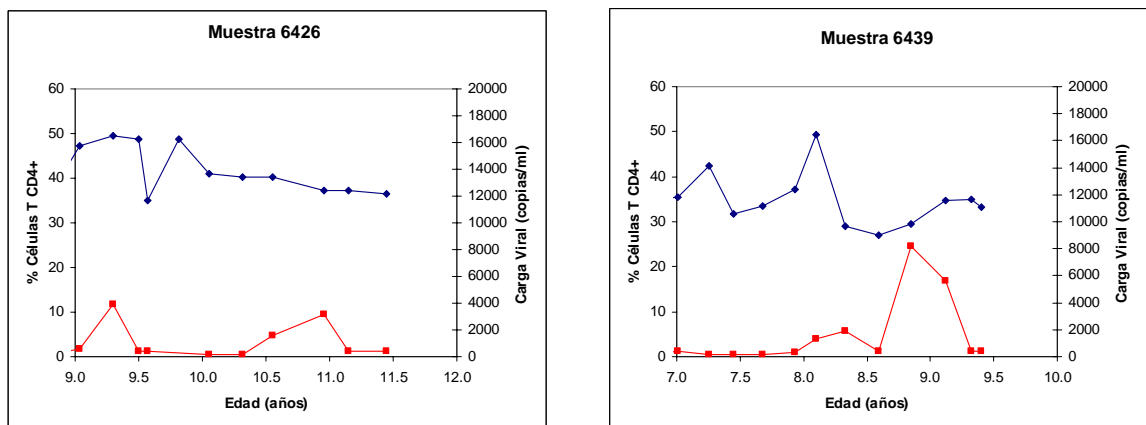
Tabla 4. Media \pm E.E.M. de las distintas variables en los 3 grupos definidos.
*Únicamente la carga viral fue significativamente distinta entre los 3 grupos, siendo significativamente mayor en el grupo con predominio de IFN- γ^+ ($P < 0,001$).

Dado que la presencia de los 3 patrones no se podía explicar por diferencias en las variables analizadas, se revisaron de forma retrospectiva los datos inmunológicos y virológicos de los últimos 5 años. Al tener el seguimiento de los niños se constató que los 5 niños incluidos en el grupo con predominio de IFN- γ^+ , eran niños que en el momento del estudio tenían un pico de viremia, como se refleja en los dos casos representativos mostrados en la Figura 20. El grupo que presentaba los 3 tipos de células específicas correspondía con niños que en el momento del estudio presentaban baja CV pero que habían experimentado algún pico de viremia en los últimos 1-2 años. Por último, se observó que los niños con predominio de IL-2 $^+$ habían mantenido controlada la CV al menos en los últimos 1-2 años (Figura 20).

Grupo IFN- γ^+



Grupo 3 P.



Grupo IL-2⁺

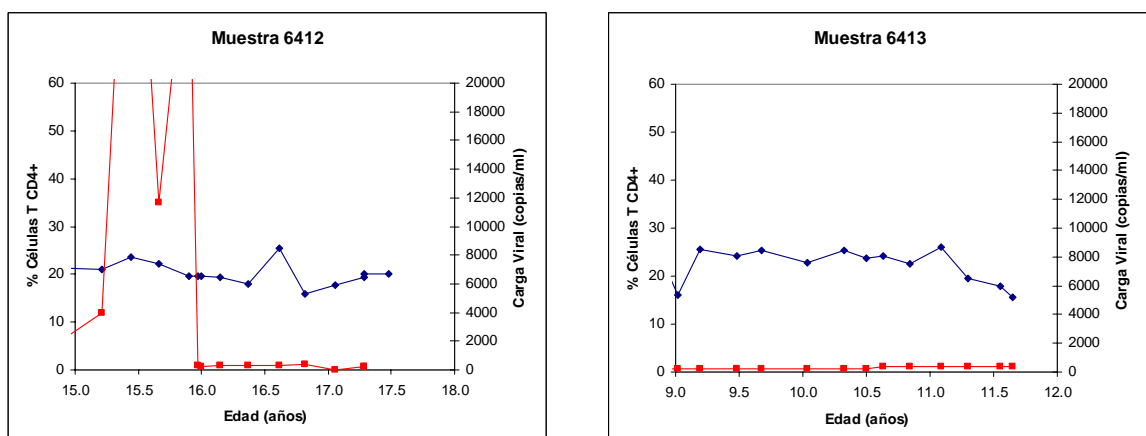


Figura 20. Seguimiento de carga viral y porcentaje de linfocitos T CD4+ en los 3 últimos años de dos niños representativos de cada grupo.

Todo ello apuntaba a que la CV era la variable que podría estar determinando el patrón de células específicas de memoria presentes en los niños. Para confirmarlo se analizó el efecto de las distintas variables sobre la frecuencia de linfocitos T CD4+ VIH-específicos mediante un análisis estadístico de correlación en el total de los 24 niños. Los resultados mostraron una correlación positiva entre el porcentaje de linfocitos T CD4+ y los valores de TRECs ($P=0,036$) coincidiendo con los resultados previos, y sólo la viremia mostró tener efecto sobre la frecuencia de células específicas apareciendo una correlación positiva entre CV y porcentaje de células IFN- γ^+ ($P<0,001$). Cuando el análisis se realizó por separado en los 3 grupos anteriormente descritos, no se observó correlación alguna entre la frecuencia de células específicas y el resto de variables en el grupo con predominio de IL-2+ ($P>0,05$). En el grupo con las 3 poblaciones representadas, se observó una correlación positiva entre los valores de TRECs y la proporción de células secretoras de IL-2 en el total de células específicas ($P=0,050$). Finalmente, en el grupo con predominio de IFN- γ^+ se observó una correlación negativa entre CV y valores de TRECs ($P=0,011$) y entre %CD4 y porcentaje de IFN- γ^+ ($P=0,028$).

Teniendo en cuenta el seguimiento de los niños, el análisis estadístico muestra además que existe una correlación positiva entre la frecuencia de células IFN- γ^+ y la CV media del último año ($P<0,001$), sin embargo si se tiene en cuenta la CV media de los últimos 2 años esta correlación no existe ($P=0,571$). Dentro del grupo de niños con predominio de IL-2+, que como se ha mencionado han tenido controlada la viremia en el último año, se observa que la frecuencia de linfocitos T CD4+ VIH-específicos correlacionaba positivamente con la CV media de los 2 últimos años (% IL-2+: $P=0,033$; % IFN- γ^+ : $P=0,031$) pero lógicamente, no con la CV media del último año, que como se ha mencionado se mantenía en valores muy bajos. Este hecho se puede ver reflejado en los dos casos representativos, donde se observa que el niño 6412 presenta los valores más altos de porcentaje de células IL-2+ y aunque su CV en el último año estuvo controlada, sí tuvo valores altos de CV hace 2 años. Sin embargo el niño 6413, que tuvo controlada la carga viral durante más de 5 años (en la figura solo se reflejan los 3 últimos años) presentó un porcentaje de células VIH-específicas inferior.

5. Publicaciones

Artículo 1. Correa et al. *Pediatric Research* 52:207-212, 2002

Production of New T Cells by Thymus in Children: Effect of HIV Infection and Antiretroviral Therapy

RAFAEL CORREA AND M. ÁNGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ

Department of Immunology, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón," Madrid, Spain

ABSTRACT

The decrease in the number of CD4⁺ T cells during HIV infection is the result of both peripheral destruction of cells by the virus and inadequate replacement of these cells. Aging and HIV infection lead to lower production of new T cells by the thymus, and, therefore, a complete restoration of the immune system is not generally achieved in infected adults after antiretroviral therapy. Because children have a completely functional thymus, we addressed the effects of HIV-1 infection on the production of new T cells in vertically infected children and whether the decrease of viral load after therapy results in a restoration of thymic function. To analyze the thymic function, T-cell receptor rearrangement excision circles were measured by quantitative PCR. Our results indicate that HIV-infected children

have lower T-cell receptor rearrangement excision circle levels than age-matched uninfected children, likely due to an inhibitory effect of HIV on thymic function. Additionally, in some patients, the decrease in viral load after retroviral therapy allows the generation of new T cells by the thymus, thus recovering the normal number of CD4 cells. (*Pediatr Res* 52: 207–212, 2002)

Abbreviations

TCR, T-cell receptor
TREC, TCR rearrangement excision circles
VL, viral load
ART, antiretroviral therapy
PBMC, peripheral blood mononuclear cells

Depletion of CD4⁺ T cells is a hallmark of HIV infection (1). Experiments using human fetal thymus tissue implanted into SCID mice demonstrated that HIV can infect human thymocytes, leading to their death (2, 3). Therefore, the decrease in CD4⁺ T cells in HIV-infected persons would be the result of two factors: peripheral CD4⁺ T-cell depletion by the virus and insufficient replacement of the destroyed T cells (1).

The thymus, the organ responsible for the maturation and selection of T cells, undergoes involution with age. It retains, however, a reduced ability to produce new T cells in adults (4). This thymic involution with age could be responsible for the rapid progression of HIV infection in older adults because of the difficulty of generating new T cells to replace CD4⁺ T cells destroyed by the virus (5). In contrast, children have complete thymic function and, therefore, they have the capacity to regenerate all of the T-cell clones lost due to HIV infection, leading to a complete reconstitution of the immune system.

Because T cells can have a very long life span, it is difficult to discriminate whether the "naive" T cells present in an individual are recently produced by the thymus or whether they arose from the division of cells formed in the first stages of life. Recently, Douek *et al.* (4) developed an assay that allows discrimination of the T cells of recent formation in the thymus from those of periphery expansion. This new assay was based on the mechanism by which the repertoire of the TCR is generated. In the genetic rearrangement of the regions V, D, and J that produce the $\alpha\beta$ TCR (6), the deletion of the TCRD locus forms some circles of DNA-denominated signal joint TREC (7, 8). These circles are episomal and do not replicate during mitosis. Thus, TREC will be present only in recently produced cells by the thymus and not in those derived from the division or differentiation of older T cells. Moreover, the TREC only appears in the cells formed in the thymus and it is quite unlikely that extrathymic T differentiation can contribute to their generation (4). Therefore, the TREC constitute an excellent marker of recently emigrated T cells from the thymus.

Using this marker of thymic function, we have analyzed the effect of HIV infection in the production of new T cells by the thymus in children. Additionally, we have tested whether the decrease in VL after ART induces a recovery in thymic function in HIV-infected children.

Received January 23, 2001; accepted February 4, 2002.

Correspondence: M. Ángeles Muñoz-Fernández, Servicio de Inmunología, HGU Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain; e-mail: Mmunoz@cbm.uam.es

Supported by "Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España" (FIPSE 3008/99), "Programa Nacional de Salud" (SAF 99-0022), "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (FIS 00/0207), Comunidad de Madrid and Bristol-Myers, S.A. (Bristol-Myers Squibb Group). R.C. is supported by a grant from the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (BEFI 99/9176).

PATIENTS AND METHODS

Patients. A longitudinal study in eight HIV-infected children born to HIV-infected mothers was carried out at the Department of Immunopediatrics of the General University Hospital "Gregorio Marañón" in Madrid, Spain, between February 1995 and February 2000. Children were diagnosed as HIV-1 infected on the basis of positive results in both DNA PCR and virus culture assays, as previously described (9), and none were breast-fed. Five out of the eight HIV-infected children were studied from birth and were compared with 15 age-matched uninfected children born to HIV-infected mothers as a control group. The remaining three HIV-infected children were enrolled in the study from their first admission to the hospital (mean age at entry 18.6 ± 8 mo). All infected children were treated with combination therapy consisting of combinations of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors with or without the addition of a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor and/or a protease inhibitor. The treatment was prescribed by the treating physician according to Centers for Disease Control and Prevention guidelines (10) and upon obtaining written informed consent from parents or legal guardians. The antiretroviral regimens were chosen on the basis of prior treatment history and were altered, as necessary, in response to incomplete virus suppression or undesirable side effects. The study was conducted according to the Declaration of Helsinki, and approved by the ethical committee of the hospital.

VL and T-cell subsets. VL was measured in 200 μ L plasma using a quantitative reverse PCR assay (Amplicor Monitor, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), with a sensitivity of 400 RNA copies/mL. T-lymphocyte subsets in peripheral blood were quantified by direct immunofluorescence using MAb of the T series and flow cytometry (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A.), as previously described (9).

The measurements of VL and percentages of CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the HIV-infected children were performed every 2–3 mo from the birth to the end of the study.

Measurement of thymic function. TREC levels were determined in the infected children every 2–3 mo from birth to the end of the study. In the control subjects, TREC were measured every 2–3 mo from birth to the age of 15 mo.

TREC values were determined PBMC obtained from venous blood by density gradient separation using Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). PBMC were then washed twice and resuspended in RPMI 1640 (Seromed, Biochrom, Berlin, Germany) medium supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine (Flow Laboratories, Irving, U.K.), 100 IU/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen, Paisley, Scotland, U.K.). PBMC ($10^6/100 \mu$ L) were lysed by incubation with 100 μ g/mL proteinase K (Roche Molecular Biochemicals, Barcelona, Spain) for 2 h at 56°C and then for 15 min at 95°C. TREC were quantified in 5 μ L of cell lysate (equivalent to 50,000 cells) by real-time quantitative PCR with a Lightcycler system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). We used the hybridization probes assay that consists of one probe labeled at the 5'-end with a red fluoro-

phore and, to avoid extension, modified at the 3'-end by phosphorylation: LC Red 640-TCACGAGTTGCAATGCAAGTTCAGCC-p; and a second probe labeled at the 3'-end with fluorescein: GCCCTGTCTGCTCTTCATTACCGT-FL (TIB Molbiol, Berlin, Germany). The primers were CACATC-CCTTCAACCATGCT and CCCAGGATGGAAAACACAGTG and the PCR reactions contained FastStart DNA Master Hybridization Probes (Roche Diagnostics), 3.5 mM MgCl₂, 0.5 μ M of each primer, and 0.2 μ M of each probe. Conditions were 95°C for 10 min, followed by 95°C, 60°C, and 72°C, each for 20 s, for 45 cycles. A standard curve was made using the pZero Blunt plasmid (Invitrogen, Carlsbad, CA) that includes a fragment of 375 bp of the TREC sequence supplied by D. Douek (4). Serial dilutions of the plasmid were amplified with the samples and a standard curve was plotted to extrapolate the number of TREC. Samples were analyzed in duplicates or triplicates, which never varied by more than 10% from each other, and the result was averaged. A β -globin control PCR was performed to verify that all the samples had the same DNA content. All samples from each child were measured in the same assay to avoid interassay variations.

Statistical analysis. Mean \pm SE was calculated for the seronegative healthy children. The comparison between the TREC levels in HIV-infected and HIV-uninfected groups was made using the Mann-Whitney *U* test, because the number of samples was low in some patients and was not the same for each patient. The correlation between variables was determined using Pearson's correlation coefficient, which describes the linear relationship between two variables.

RESULTS

The effects of HIV infection on the production of new T cells and percentage of CD4 were analyzed during the first 15 mo of life. Five vertically HIV-infected children were studied to determine TREC values and percentage of CD4 in a total of 23 samples at different ages, and the results were compared with the values obtained from 15 age-matched healthy children. The results, shown in Figure 1, indicate that the TREC content ($p < 0.01$) and CD4 percentages ($p < 0.001$) were lower in HIV-infected children than in uninfected controls.

Next, we analyzed the effect of the ART on TREC values in the eight HIV-infected children, and how these values correlated with VL and percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The start of a new treatment is represented in the figures as a vertical line. There was not a statistically significant correlation between TREC values and VL. Thus, despite an almost complete reduction of VL levels (but always remaining >400 copies/mL) in these children after ART, no significant variation in TREC was found. However, in some children (patients 1, 2, and 4), the dramatic decreases in VL after initiation or change of ART were followed by a marked increase in the TREC levels, and, conversely, the increases in VL after therapeutic failure were followed by a decrease in TREC values (Fig. 2).

The correlation between ART, VL, TREC, and CD4 T cells follows two different patterns (Figs. 2 and 3). Some infected children responded adequately to the treatment after the start or

Effect of HIV Infection

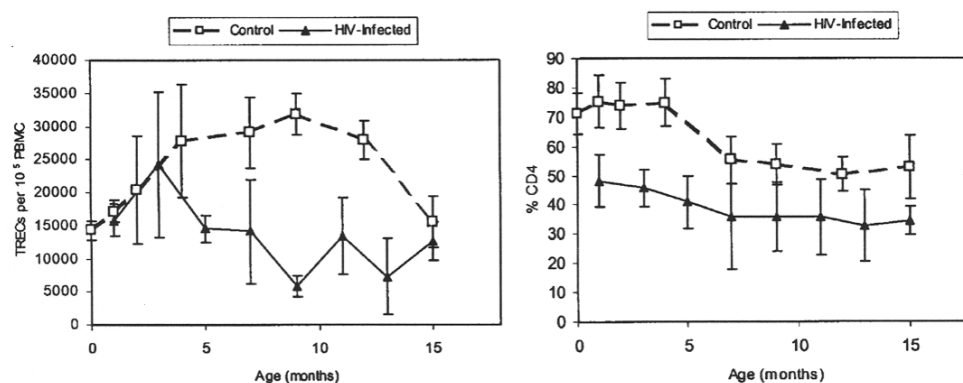


Figure 1. Evolution with age of TREC values and CD4 percentages from HIV-infected children. The control line represents the mean \pm SEM of the 15 HIV-uninfected children. The HIV-infected line represents the data obtained from birth to the age of 15 mo in five HIV-infected children. TREC levels ($p < 0.01$) and percentage of CD4 ($p < 0.001$) in HIV-infected children were significantly lower than in the uninfected controls.

switching of ART, with a decrease in VL and a marked increase in percentage of CD4 (mo 9 in patient 1, mo 29 in patient 2, mo 41 in patient 8). The children whose CD4 levels increased were those who previously showed low CD4 values ($<20\%$), and, interestingly, the increase in CD4 was always accompanied by a concomitant increase in TREC (Fig. 3). The remaining children were those having CD4 values $>25\%$, and, even though ART led to a decrease in VL, no significant changes in TREC and percentage of CD4 were observed. Statistical analysis supports this observation showing a significant correlation between TREC and percentage of CD4 for patients 1 ($p = 0.020$) and 2 ($p = 0.005$), whereas the remaining children did not show any significant correlation ($p > 0.05$). In addition, in some instances, the decreases in percentage of CD4 coincide with a decrease in TREC levels, which in turn were associated with high VL.

Finally, TREC and percentage of CD8 T cells were compared. There was not a significant correlation between these variables ($p > 0.05$) (data not shown).

DISCUSSION

In HIV-infected children, peripheral T cells destroyed by the viral infection may be replaced by naive T cells newly generated from the thymus, which would allow for replacement of lost T cells, or by the peripheral expansion of naive and memory T cells (11). However, HIV can also infect and destroy human thymocytes (2, 3), thus jeopardizing the capacity of regeneration of new T cells. These effects will be more easily detected in HIV-infected children because they maintain complete thymic functionality compared with adults. Our preliminary results support this, showing that TREC levels in HIV-infected children were lower than those found in healthy children during the first 15 mo of life. This fact could contribute, in part, to the lower percentage of CD4 observed from the

birth in the HIV-infected children. Previous results in adults have also found lower TREC values in HIV-infected patients (4, 12). These data suggest a direct effect of HIV on thymic function, which leads to a decrease in the production of new T cells. An alternative explanation of this fact would be an increase in peripheral T-cell expansion (*i.e.* CD8⁺ T cells) (13, 14) that would dilute the number of TREC in PBMC. However, in children with functional thymus, a high production of new T cells exists, and an inhibition of thymic function by HIV will likely have a stronger effect on the TREC levels than changes in peripheral T-cell division rates.

A recent study has also found that, in HIV-infected children, the TREC levels measured in both CD4⁺ and CD8⁺ subsets were lower than those found in control children (14). In that study, changes in the expansion of peripheral CD8⁺ T cells did not affect the TREC levels in CD4⁺ subset, confirming a lower production of new T cells in HIV-infected children.

Despite of the inhibitory effect of HIV on thymic function, we found no correlation between TREC and VL. However, in children with percentage of CD4 $<20\%$, usually associated with higher VL, the decrease in VL effected by ART led to a marked increase in both CD4 and TREC. This may reflect a homeostatic mechanism that increases the production of new T cells only when the CD4 values are very low, and not when the CD4 values are adequate. This increase in the thymic production will be possible only with very low VL that avoids the inhibitory effect of HIV on thymus. The new highly active antiretroviral therapies may allow the decrease of VL to undetectable levels, leading to a more pronounced effect. New studies will be necessary to elucidate this fact.

We think that what determines a significant increase in TREC is not VL *per se*, but rather the existence of a low percentage of CD4⁺ T cells, which requires a recovery of the cell population. A marked decrease in VL, even without a

TRECs –Viral Load

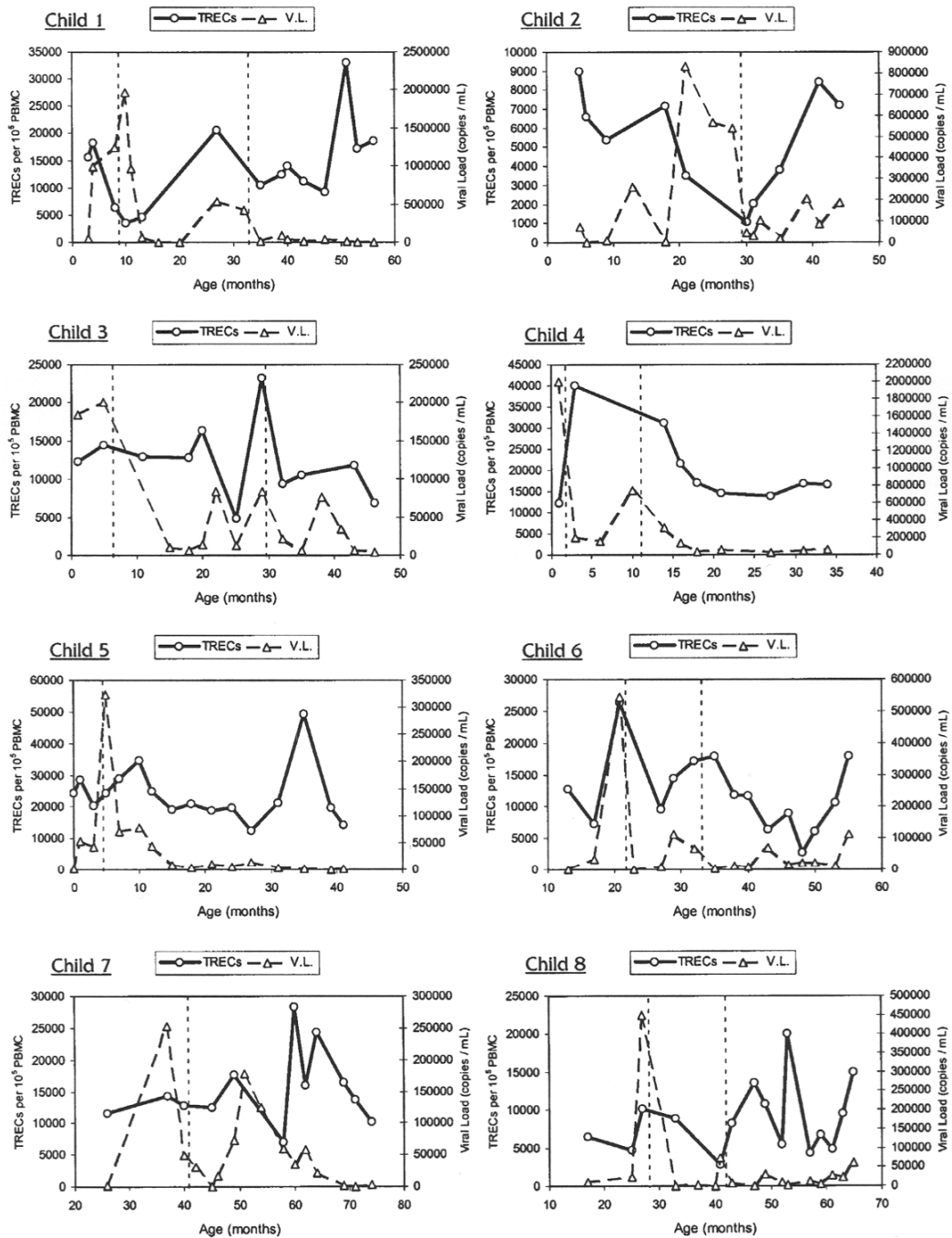


Figure 2. Evolution of TREC values and VL. TREC per 10^5 PBMC and VL from the eight children included in the follow-up study are represented. The vertical lines inside the graph represent the initiation of or change to a new antiretroviral treatment.

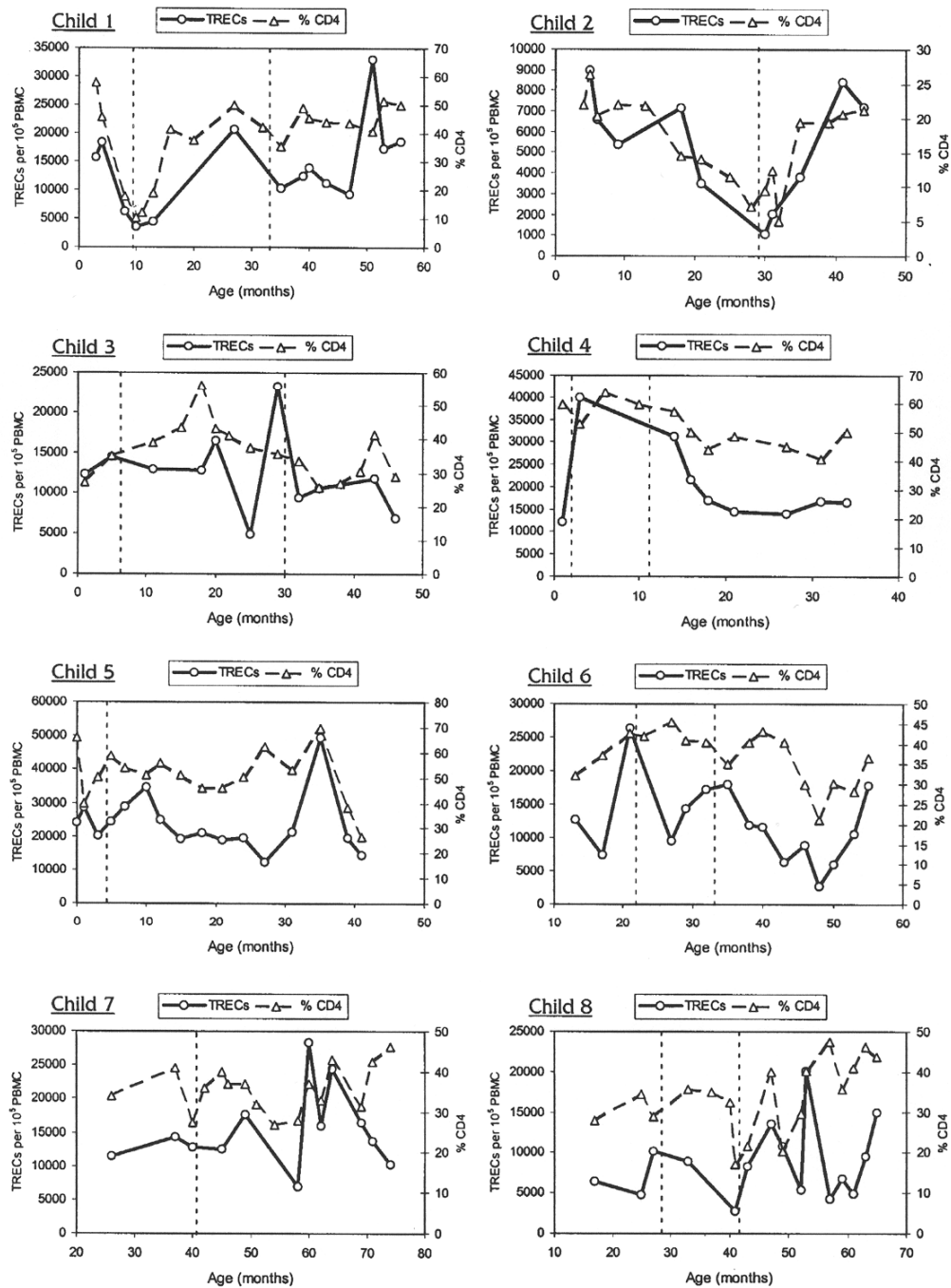
TRECs – % CD4

Figure 3. Evolution of the TREC values and percentage of CD4⁺ T cells. TREC per 10⁵ PBMC and percentage of CD4 in the eight children included in the follow-up study are represented. The vertical lines represent initiation or change to a new antiretroviral treatment. There was a significant correlation ($p < 0.05$) between TREC and percentage of CD4 T cells in child 1 and child 2.

complete suppression, would have an effect on thymus and would restore the lost T cells.

This hypothesis fits well with the fact that a significant TREC recovery was only achieved in the three children with lower TREC and percentage of CD4 at the initiation or changes of ART. Moreover, the results in uninfected children, although preliminary, show a decrease in TREC from the second year of life. Taking this into consideration, the steady production of TREC in some HIV-infected children probably reflects a truly higher production than in uninfected children of the same age. To really confirm this, it will be necessary to carry out larger studies in uninfected children at different ages.

The increase in CD4⁺ T cells in HIV-infected antiretroviral treated adults seems to be due to a redistribution of the T cells from the lymphoid organs or to a periphery expansion of T cells (15, 16). However, in our group of HIV-infected children, we observed a significant correlation between this increase in CD4⁺ T cells and higher TREC levels. This indicates that the increases in CD4⁺ T cells in those children are due mainly to the production of new T cells by the thymus (*i.e.* naive T cells). If a redistribution or increase in the division rates of peripheral T cells was occurring, it would produce a dilution of the new T cells produced by the thymus, and therefore a dilution of TREC levels.

The highest correlation with TREC levels was observed with percentage of CD4 and not with CD8⁺ T cells, probably reflecting a selective production by the thymus of the subset depleted by the infection. Moreover, previous studies have indicated that the increase in CD8⁺ T cells seems to be the consequence of an HIV-induced expansion and not new thymic production (17).

In conclusion, our results, although somewhat preliminary, suggest that HIV infection produces an inhibition of the thymus function in children. Studies in larger cohorts will be necessary to confirm this effect at different ages. The decrease in VL as an effect of ART preventing the inhibitory effect of HIV on thymic function makes possible the recovery the CD4 population by a homeostatic mechanism. This indicates that the immune reconstitution in HIV-infected children could be possible and broadens the hope of new therapeutic strategies for adults.

Acknowledgments. The authors thank Daniel Douek for supplying the plasmid used for the standard curve and the method of quantification of TREC. We also thank María Chorro for her excellent technical assistance.

REFERENCES

- Rowland-Jones S 1999 HIV infection: where have all the T cells gone? *Lancet* 354:5-7
- Burke A, Anderson D, Benson W, Turnicky R, Mannan P, Liang YH, Smialek J, Virmani R 1995 Localization of human immunodeficiency virus 1 RNA in thymic tissues from asymptomatic drug addicts. *Arch Pathol Lab Med* 119:36-41
- McCune JM 1997 Thymic function in HIV-1 disease. *Semin Immunol* 9:397-404
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA 1998 Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396:690-695
- Rosenberg PS, Goedert JJ, Biggar RJ 1994 Effect of age at seroconversion on the natural AIDS incubation distribution. Multicenter Hemophilia Cohort Study and the International Registry of Seroconverters. *AIDS* 8:803-810
- Bogue M, Roth DB 1996 Mechanism of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 8:3261-3270
- Fujimoto S, Yamagishi H 1987 Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature* 327:242-243
- Okazaki K, Davis DD, Sakano H 1987 T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 49:477-485
- Munoz-Fernandez MA, Obregon E, Navarro J, Borner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH, Fernandez-Cruz E 1996 Relationship of virologic, immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 40:597-602
- Centers for Disease Control and Prevention 1998 Guidelines for use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 47:RR-4
- Mackall CL, Hakim FT, Gress RE 1997 T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 18:245-251
- Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanicolos R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanan M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink HJ, Wolinsky S, Borkowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD 1999 Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med* 190:725-732
- Hazenberg MD, Otto SA, Stuart JW, Verschuren MC, Borleffs JC, Boucher CA, Coutinho RA, Lange JM, de Wit TF, Tsegaye A, van Dongen JJ, Hamann D, de Boer RJ, Miedema F 2000 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. *Nat Med* 6:1036-1042
- Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K 2000 Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 181:1479-1482
- Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J 1997 Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *J Med Chem* 40:2164-2176
- Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A, Leonard JM, Danner SA, Miedema F, Schellekens PT 1998 Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 4:208-14
- Burgisser P, Hammann C, Kaufmann D, Battegay M, Rutschmann OT 1999 Expression of CD28 and CD38 by CD8+ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. The Swiss HIV Cohort Study. *Clin Exp Immunol* 115:458-463

Artículo 2. Resino, Correa et al. Clin. Exp. Immunol. 132:105-112, 2003

Clin Exp Immunol 2003; 132:105-112

Preserved immune system in long-term asymptomatic vertically HIV-1 infected children

S. RESINO*, R. CORREA*, J. M. BELLÓN* & M. Á. MUÑOZ-FERNÁNDEZ* *Laboratory of Immuno-Molecular Biology, General University Hospital 'Gregorio Marañón', Madrid, Spain

(Accepted for publication 21 December 2002)

SUMMARY

The objective of this study was to study immune system status in long-term asymptomatic (LTA) HIV-1-infected children. A cross-sectional study was used, involving HIV-1-infected children over 7 years of age who were rated into two groups according to their clinical and immunological classification: (a) LTA: 7 asymptomatic HIV-1-infected children in A1; (b) Rapid progressor (RP): 14 age-matched C3 HIV-1-infected children. The control group consisted of 17 age-matched uninfected children. The characterization of CD4+ T-cell subsets was determined by three-colour flow cytometry. The proliferative response and cytokine production by activated peripheral blood T-cells were also measured. IL-7 levels were measured in serum. Thymic production of T-cells was quantified by TCR rearrangement excision circles (TRECs). The LTA children showed similar proliferative responses to PHA, PWM and anti-CD3+ anti-CD28, but lower responses to tetanus toxoid and streptokinase, in comparison with the controls but always higher responses in comparison with the RP group. The production of TNF- α and IFN- γ was similar in the LTA and control groups, and both were higher than the levels in the RP group. The LTA group showed a lower percentage of memory CD4+ T-cells (CD4+ CD45RO+, CD4+ CD45RA-CD62L+) than the control and RP groups. The LTA group also showed lower percentages of CD4+ CD7- cells than the controls. As for naïve CD4+ T-cells (CD4+ CD45RA+ CD62L+), CD4+ CD45RA+ and CD4+ CD62L+ cells, the LTA group showed higher values than the control and RP groups. The LTA group showed higher percentages of CD4+ HLA-DR+ CD38+ than the controls, but lower values than the RP group. In contrast, the LTA group had percentages of CD4+ HLA-DR-CD38+ T-cells higher than both the control and RP groups, whereas CD4+ CD38+ levels were only higher in the LTA group in comparison with the controls. CD4+ HLA-DR+ CD38- and CD4+ HLA-DR+ cell numbers were lower in the LTA group in comparison with the RP group. We found almost normal values of TRECs and IL-7 in the LTA group, but lower values in the RP group. Moreover, we found an inverse relation between TREC levels and IL-7 in plasma from HIV-infected children. Asymptomatic HIV-1 infected children have a well preserved immune system similar to that of control uninfected children in spite of HIV-infection for more than 7 years. Moreover, our results identified new markers of HIV disease, such as TRECs and IL-7, that could be used to monitor disease.

Keywords HIV-1 children subsets CD4+ proliferation cytokine TRECs IL-7**INTRODUCTION**

Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection causes a progressive and severe immunodeficiency [1]. In infected children, this disease has distinct patterns of disease progression and is known for its heterogeneous manifestations [2,3]. Impairment

of T-cell function occurs early in HIV infection, when CD4 T-cells are still within normal ranges, and further decreases as disease progresses [4,5]. Early immunological signs of HIV immunodeficiency include decreased T-cell proliferation to recall antigens and allogeneic HLA responses (mixed lymphocyte reaction (MLR)), as well as impaired antigen specific IL-2 and IFN- γ production by memory CD4+ T-cells (CD45RO+) [4,6,7]. Also, decreased lymphocyte proliferation and production of cytokines in response to mitogens such as phytohemagglutinin (PHA), pokeweed (PWM) and anti-CD3 plus anti-CD28 [4,8,9], all of them more pronounced in advanced disease, have been described. Although

Correspondence: M^a Ángeles Muñoz-Fernández, Laboratory of Immuno-Molecular Biology, Hospital General Universitario 'Gregorio Marañón' C/Doctor Esquerdo, 46 28007 - Madrid, Spain.
E-mail: Mmunoz@cbm.uam.es

initial T-cell defects may be accounted for by the selective loss of memory cells, the function of both naïve CD45RA+ and memory CD45RO+ cells is affected in later stages of HIV infection [7]. The CD4+ CD45RO+ memory T-cell subset derives from a post-thymic maturation process from CD4+ CD45RA+ naïve T-cells [10,11]. T-cells also recycle between blood and lymphoid tissues and then back to blood [12,13] in a process thought to be dependent on L-selectin (CD62L) expression [12,13]. During HIV infection, a subset of CD4+ T-cells, characterized by a lack of CD7 cell surface expression, expand in numbers. This CD4+ CD7- T-cell expansion correlates with disease progression and is associated with *in vivo* activation of these cells and an impaired profile of cytokine production [14]. CD4+ CD7- T-cells reflect a separate and stable differentiation state within CD45RO+ CD45RA- memory cells occurring late in the immune response [15].

Moreover, HIV disease is characterized by state of chronic activation, driven by HIV antigen as well as by cytokines released in antigen independent ways [16]. This activation is associated with CD4+ T-cell depletion and disease progression [17]. In adults, immune activation correlates with an increase in T-cells coexpressing the activation markers CD38 and HLA-DR [18,19]. However, in children, the CD38+ marker is a maturation rather than an activation marker [20] and its expression on T-cells decreases over the years. This fact may lead to a misinterpretation of the meaning of this marker in children, since these cells can be either immature and/or activated [21–23]. Increased expression of HLA-DR on T-cells has also been proposed as a progression marker of HIV infection both in adults [24] and children [25].

The decrease in CD4+ T-cells during HIV infection is thought to be the result of both peripheral destruction caused by the virus and inadequate replacement of destroyed T cells [26]. The thymus, the organ responsible for the production of new T cells, would allow for replacement of lost cells. It may play a more prominent role in T cell homeostasis in paediatric than in adult HIV infection, since children have not yet suffered the natural thymic involution associated with age. However, several studies have shown that HIV can infect and destroy thymocytes thus affecting the thymic function [27] and the production of new T-cells [28]. During T cell receptor rearrangement in newly developed T cells, the excised DNA persists episomally as T cell receptor (TCR) excision circles (TRECs), and TREC+ T-cells are recent thymic emigrants. Thus, the level of TRECs in peripheral blood T-cells is an excellent measure of thymic function in general [28]. TRECs predominate in CD45RA+ T-cells, confirming the recent emigration or lack of extensive post-thymic division of the CD45RA+ T-cell subset [28]. It has also been demonstrated, in HIV-infected patients that high levels of IL-7 in plasma are associated with low CD4+ T-cells counts, high viraemia and disease progression [29]. IL-7 is known to be involved in T-cell development, regeneration and function [30].

Long-term asymptomatic (LTA) adult HIV-infected patients, remain healthy and they are characterized by a relatively stable HIV-specific effector repertoire, undetectable viral load (VL), normal CD4+ T-cell counts, a strong neutralizing antibody response, and by vigorous inhibitory CD8+ T-cells [31–33]. However, similar studies have not been performed in children. Thus, the aim of this study was to analyse the immune status, determining the number and functional activity of T-cells, CD4+ subsets, proliferation in response to antigens and mitogens, and levels of cytokine production in a group of vertically LTA HIV-1-infected children characterized by 7 or more years of documented HIV

infection. The children were not suffering any HIV-related disease, were not under antiretroviral therapy with protease inhibitor and most importantly had T-cell CD4+ counts ≥ 600 cell/mm³.

PATIENTS AND METHODS

Study population

Twenty-one infants born to HIV-1-infected mothers were studied at the Unidad de Inmuno-Paediatria del Hospital General Universitario 'Gregorio Marañón' in Madrid, Spain. All infants were diagnosed as HIV-1-infected on the basis of positive results in both DNA-PCR and virus culture assays, as previously described [34]. A cross-sectional study was performed, consisting of the characterization of CD8+ T-cell subsets in HIV-infected children over 7 years of age. Children were separated into two groups according to their clinical and immunological classification: (a) LTA; Asymptomatic HIV-1-infected children with seven or more years of documented HIV infection, no HIV-related disease, stable CD4+ T-cell counts of ≥ 600 cell/mm³; none were receiving antiretroviral therapy with protease inhibitor. (b) RP: Age-matched symptomatic HIV-1-infected children with CD4+ T-cell counts < 250 cell/mm³, CDC Class 3C disease, and treatment failures. We also studied 17 age-matched uninfected children as controls.

Drugs were prescribed by the attending paediatrician according to CDCP guidelines [35] upon obtaining written informed consent from legal guardians. Clinical and immunological classification was based on the 1994 revised guidelines of the Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) [36] and were measured after obtaining written informed consent from parents or legal guardians. The study was conducted according to the declaration of Helsinki and approved by the Ethical Committee of our hospital.

Quantitative HIV-1 RNA assay

Blood samples were collected in EDTA tubes, separated within 4 h and the plasma stored at -70°C . VL was measured in 200 μl plasma using a quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assay (Amplicor monitor, Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ, USA).

Proliferative assays and cytokine production

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were seeded in 96-well flat-bottom microtiter plates ($2 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ per well) in RPMI-1640 medium supplemented with 10% of fetal calf serum. PBMC were stimulated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PHA (Murex Biotech Limited, Dartford, UK), or 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of monoclonal anti-CD3 antibody (SPV3Tb) plus 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of monoclonal anti-CD28 antibody (L-293, Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA), or 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of PWM (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA). In addition, we studied proliferation in response to the following antigens: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of recombinant p24 HIV-1 (Protein Science Corporation, Meriden, CT, USA), 100 IU/ml of streptokinase (SK) (Kabikinase[®] Pharmacia & Upjohn, S.A., Sant Cugat del Valles, Barcelona, Spain), and 0.5 LI/ml of tetanus toxoid (TT) (NIBSC, Mill Hill, UK). We also studied the proliferative responses of PBMC to a mixture of mitomycin-treated PBMCs from 6 unrelated donors (MLR, ratio responder: target 1:1).

The cultures were incubated at 37°C and maintained in an humidified atmosphere containing 5% CO_2 . After 3 days of

culture with a mitogenic stimulus, and 6 days of culture with an antigenic stimulus, 50% of the culture supernatants were harvested and stored at -70°C and the wells were replenished with an equivalent volume of fresh medium with $1\ \mu\text{Ci}[^3\text{H}]\text{-Thymidine}$ (Amersham, Buckinghamshire, UK). Cell proliferation was estimated by incorporation of $[^3\text{H}]\text{-Thymidine}$ into DNA during the last 6 h of culture. The cells were harvested in glass fibre filters in an automatic cell harvester (Titertek Cell Harvester, Skatron, A.S., Flow Laboratories, Lier, Norway) and radioactive incorporation was measured in a liquid scintillation spectrometer (1450 Microbeta Trilux, Wallac, Turku, Finland). The assay was carried out in quadruplicate. The results were expressed as 'lymphocyte stimulation index' (see statistical analysis).

Cytokine production was quantified in the supernatants of the cultures of PBMC stimulated with PHA. We have used commercially available ELISA assays, according to the manufacturer's instructions: IL-5 (Bio Source International, Camarillo, CA, USA), TNF- α , and IFN- γ (Bender Medical Systems Diagnostics, Vienna, Austria). Concentrations were assayed in triplicate.

Quantification in plasma samples of IL-7 levels was done using commercially available ELISA assays and according to the manufacturer's instructions (Quantikine HS human IL-7 kit; R & D Systems, Abingdon, UK). Samples were assayed in triplicate. All values were inside the range of the standard curve (0–16 pg/ml).

Quantification of CD4+ T lymphocyte subsets

Total counts and percentage of CD4+ and CD8+ T-cells were analysed by TRUCOUNT™ (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems) in whole blood, whereby cells were selected by means of an SSC gate against anti-CD45 [37], following the manufacturer's instructions. The acquisition was carried out in a FACSCalibur cytometer (Becton-Dickinson) using the CELLQuest (Becton-Dickinson) acquisition program immediately after cell staining. TRUCOUNT™ Control Beads were routinely used as a quality control.

The monoclonal antibodies used for the analysis of CD4+ T-cell subsets were conjugated with Fluorescein-isothiocyanate (FITC) (anti-IgG1, anti-HLA-DR, anti-CD45RA, anti-CD38, anti-CD7), Phycoerythrin (PE) (anti-IgG1, anti-CD45RO, anti-CD62L, anti-HLA-DR, anti-CD28), and Peridinin Chlorophyll protein (PerCP) (anti-CD4). The monoclonal antibodies were obtained from Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, except anti-CD38 (Immunotech, Marseille, France). Three-colour phenotypic characterizations of lymphocytes were performed by flow cytometry, using whole, lysed and washed blood [38]. Naïve CD4+ T-cells were defined as CD62L+ and CD45RA bright T cells (CD4+ CD45RAhi/CD62L+). Memory cells were defined as CD4+ CD45RO+, CD4+ CD7-, or CD4+ CD45RA-CD62L+ T-cells. Activated T-cells were defined as CD4+ HLA-DR+ and CD4+ HLA-DR+ CD38+0. Memory-activated CD4+ were defined as CD4+ CD45RO+ HLA-DR+0. CD4+ CD38+ are mostly naïve CD4+ T-cells [20]. Acquisition was performed in a FACScan (Becton-Dickinson) cytometer using the Lysis II software (Becton-Dickinson) within 2 h of cell staining. The optimal parameters for acquisition (detector sensitivity, detector amplification and compensation) were determined periodically using Calibrate (Becton-Dickinson) and the AutoComp (Becton-Dickinson) programs. Five thousand (5000) events were compiled using a collection gate for CD4+ T lymphocytes. The gate was defined using the low SSC and high expression of CD4 [21,37].

Data was analysed using the Lysis II analysis program (Becton-Dickinson). Appropriate isotypic controls (IgG1-FITC; IgG1-PE) were used to evaluate nonspecific staining, which was deducted from the obtained results.

Quantification of TCR rearrangement excision circles

Thymic function was studied by quantifying a highly specific marker for T cells recently produced by the thymus, named TCR rearrangement excision circles (TREC). The TREC values were determined in PBMC by real-time quantitative PCR in a Light-Cycler system (Roche Molecular Biochemicals) as previously described [39]. Samples were analysed in duplicate or triplicate, never varied by more than 10% from each other, and the result were averaged. A β -globin control PCR was performed to verify that all the samples had the same DNA content. All samples from each child were measured in the same assay to avoid interassay variations.

Statistical analysis

In all analyses, VL was transformed to \log_{10} -scale in order to normalize their distribution. Cytokine production of PBMC stimulated by PHA were corrected subtracting the values of cytokines of unstimulated PBMC. Proliferation of PBMC is expressed as adjusted stimulation indexes (SI)

$$\text{SI} = \frac{\text{proliferation of PBMC with mitogen or antigen}}{\text{Spontaneous proliferation of PBMC}}$$

Differences in characteristics between infants were analysed using non-parametric tests because of the small sample size or the free distribution of data (the data did not come from normalized populations and with the same variances). The Mann-Whitney 'U' test was used to compare differences between groups studied.

RESULTS

Characteristics of the HIV-infected children

Twenty-one HIV-infected children were studied in a cross-sectional study. Children were rated into two groups (see study population). The immunological, virological and clinical characteristics of the different groups at entry to the study are described in Table 1. The HIV-children of LTA group had higher values of CD4+ T-cell percentages and counts, and lower CD8+ T-cell levels than those in the RP group. Only the CD4+ T-cell count in the LTA group was similar to that of the control group. Most (85.7%) of the HIV-children in the LTA group had undetectable VL, in contrast to 28.6% with undetectable levels in the RP group. All the HIV-children of the RP group were on HAART.

Functional activity of T-cells

To analyse the functional status of T-cells, we tested proliferation and cytokine production of PBMC in response to mitogens and antigens. PBMC from LTA children showed similar proliferative responses to mitogenic stimuli as compared with those from the controls, as measured by stimulation indexes to PHA, PWM and anti-CD3+ anti-CD28. However, the LTA proliferative responses were higher than those of the RP group (Table 2). In the same way, LTA children showed similar MLR to the controls, but higher responses than the RP group. In contrast, PBMC from LTA children showed lower proliferative responses to specific

Table 1. Immunological and virological characteristics of the HIV-1-infected infants

| | Control | | LTA | | RP | |
|---|------------------|--------------|------------------|----------------|------------------|-----------------|
| No. HIV-1 children | 17 | | 7 | | 14 | |
| Age (years), (mean \pm s.e.m. (range)) | 12.5 \pm 0.6 | (7.2; 16.0) | 10.9 \pm 1.4 | (7.5; 16.9) | 11.6 \pm 0.8 | (7.7; 17.4) |
| Immunological characteristics, (mean \pm s.e.m. (range)) | | | | | | |
| % CD4+ | 44.0 \pm 1.5 | (32.4; 51.1) | 34.5 \pm 1.7 | (26.7; 38.6)** | 9.1 \pm 1.8 | (1.2; 21.7)**‡ |
| CD4+ T/mm ³ | 1072.0 \pm 138 | (557; 2097) | 935.0 \pm 80.6 | (657; 1298) | 133.0 \pm 17.8 | (9; 225)**‡ |
| % CD8+ | 24.1 \pm 1.3 | (19.5; 34.7) | 36.9 \pm 2.5 | (28.7; 45.4)** | 61.2 \pm 4.2 | (37.6; 86.5)**‡ |
| CD8+ T/mm ³ | 582.0 \pm 86 | (262; 1198) | 991.0 \pm 102 | (760; 1370)* | 1129.0 \pm 215 | (356; 2791)** |
| Virological characteristics | | | | | | |
| Log ₁₀ VL (copies/ml), (mean \pm s.e.m. (range)) | - | | 2.48 \pm 0.08 | (2.30; 2.88) | 3.83 \pm 0.35 | (2.30; 5.40) |
| Undetectable VL (<400 copies/ml) | - | | 6 (85.7%) | | 4 (28.6%)† | |
| Anti-retroviral therapies | | | | | | |
| NT | - | | 2 | | - | |
| MT | - | | - | | - | |
| CT | - | | 5 | | - | |
| HAART | - | | - | | 14 | |

VL: viral load. HIV-1: Human Immunodeficiency virus type-1. NT: Not treated; MT: Monotherapy; CT: Combination therapy; HAART: highly active antiretroviral therapy. Differences with control group (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Differences significant with LTA group († $P < 0.05$; ‡ $P < 0.01$).

Table 2. Summary of proliferation and cytokine production by PBMC of HIV-1-infected children

| | Control | LTA | RP | * P -value for difference between | | |
|----------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------------------------|----------------|------------|
| | | | | LTA and control | RP and control | LTA and RP |
| s.i. of mitogenic stimulus | | | | | | |
| PHA | 130.6 \pm 20.3 | 103.6 \pm 25.9 | 52.3 \pm 17.2 | 0.299 | 0.003 | 0.030 |
| PWM | 27.9 \pm 6.2 | 26.5 \pm 8.5 | 12.3 \pm 3.1 | 0.681 | 0.007 | 0.115 |
| aCD3+ aCD28 | 111.4 \pm 13.8 | 114.0 \pm 28.7 | 67.6 \pm 19.8 | 0.758 | 0.014 | 0.067 |
| s.i. of antigenic stimulus | | | | | | |
| TT | 46.5 \pm 14.7 | 11.8 \pm 4.4 | 0.82 \pm 0.15 | 0.051 | 0.000 | 0.005 |
| SK | 12.7 \pm 1.9 | 3.4 \pm 1.9 | 0.89 \pm 0.17 | 0.026 | 0.001 | 0.366 |
| p24 Ag | - | 2.0 \pm 0.87 | 0.85 \pm 0.19 | - | - | 0.299 |
| MLR | 51.4 \pm 9.9 | 42.0 \pm 10.4 | 13.9 \pm 2.82 | 0.699 | 0.009 | 0.041 |
| Cytokine production† | | | | | | |
| IL-5 | 113.0 \pm 48 | 123.0 \pm 113 | 52.0 \pm 31 | 0.456 | 0.489 | 0.689 |
| TNF- α | 1590.0 \pm 371 | 1310.0 \pm 267 | 335.0 \pm 130 | 0.864 | 0.003 | 0.008 |
| IFN- γ | 4018.0 \pm 992 | 3379.0 \pm 1076 | 1057.0 \pm 670 | 0.864 | 0.006 | 0.012 |

PHA, Phytohemagglutinin; PWM, Pokeweed; aCD3, anti-CD3; aCD28, anti-CD28. TT, tetanus toxin; SK, streptokinase; p24 Ag, p24 antigen, MLR, mixed lymphocyte response.

†After PHA stimulation. LTA, long-term asymptomatic HIV-infected children. RP, rapid progressors HIV-infected children. Control, age-matched HIV-negative healthy children. Values are expressed as mean \pm s.e.m. *Difference between LTA, RP, and Control (level of significance).

antigenic challenge (SK and TT) than the controls, although those responses were still higher than those of the RP group.

Cytokine production in the LTA and RP groups, in the same cultures, was differentially affected. Thus, the production of TNF- α and IFN- γ in LTA samples was higher than RP, but similar to that of the controls (Table 2. Summary of proliferation and cytokine production by PBMC of HIV-1-infected children.).

CD4+ T-cell subsets

Next, we evaluated naïve, memory and activated T-cells. The LTA group showed lower values of memory CD4+ T-cells (CD4+ CD45RO+, CD4+ CD45RA-CD62L+) than the controls, except for the CD4+ CD45RO+ HLA-DR+ subset whose levels

were similar between the two groups. On the other hand, the RP group had a higher percentage of all 3 subsets, CD4+ CD45RO+, CD4+ CD45RO+ HLA-DR+ and CD4+ CD45RA-CD62L+ T-cells than both the LTA children and the controls. The LTA group showed lower percentages of CD4+ CD7- than both the control and RP groups but the LTA group had similar values of CD4+ CD28-CD7- T-cells in comparison with the controls. Regarding naïve CD4+ T-cells (CD4+ CD45RA+ CD62L+), CD4+ CD45RA+, and CD4+ CD62L+ the LTA group showed higher values than both the control and RP groups (Table 3).

The LTA group showed higher percentages of circulating activated CD4+ HLA-DR+ CD38+ cells than the controls, and lower values than the RP group. In contrast, the LTA group had values

Preserved immune system in Lta children

109

Table 3. Percentages of CD4+ T-cell subsets in HIV-infected children

| Phenotype | Control | LTA | RP | *P-value for difference between | | |
|----------------------|------------|------------|------------|---------------------------------|----------------|------------|
| | | | | LTA and control | RP and control | LTA and RP |
| Memory/naive | | | | | | |
| CD4+ CD45RO+ HLA-DR+ | 3.4 ± 0.4 | 3.2 ± 0.4 | 32.2 ± 5.9 | 0.962 | 0.000 | 0.000 |
| CD4+ CD45RO+ | 50.9 ± 3.9 | 33.7 ± 3.3 | 71.9 ± 6.4 | 0.005 | 0.042 | 0.001 |
| CD4+ CD45RA-CD62L+ | 35.4 ± 1.3 | 28.9 ± 2.2 | 47.8 ± 3.2 | 0.019 | 0.005 | 0.000 |
| CD4+ CD7- | 11.2 ± 1.3 | 6.1 ± 1.0 | 24.3 ± 7.0 | 0.018 | 0.371 | 0.005 |
| CD4+ CD28- | 1.8 ± 0.9 | 0.8 ± 0.3 | 11.9 ± 6.5 | 0.432 | 0.371 | 0.070 |
| CD4+ CD28-CD7- | 1.0 ± 0.6 | 0.6 ± 0.3 | 11.3 ± 6.4 | 0.530 | 0.310 | 0.109 |
| CD4+ CD45RA+ CD62L+ | 46.3 ± 2.9 | 65.1 ± 2.9 | 28.3 ± 6.5 | 0.001 | 0.212 | 0.000 |
| CD4+ CD28+ | 98.3 ± 0.9 | 99.2 ± 0.3 | 88.1 ± 6.5 | 0.432 | 0.371 | 0.070 |
| CD4+ CD45RA+ | 47.0 ± 2.9 | 65.4 ± 2.9 | 29.3 ± 6.5 | 0.001 | 0.192 | 0.000 |
| CD4+ CD62L+ | 81.7 ± 2.1 | 94.0 ± 0.9 | 76.2 ± 4.6 | 0.000 | 0.752 | 0.000 |
| Activated | | | | | | |
| CD4+ HLA-DR+ CD38+ | 1.5 ± 0.2 | 3.5 ± 1.0 | 28.1 ± 5.4 | 0.005 | 0.000 | 0.000 |
| CD4+ HLA-DR-CD38+ | 60.8 ± 2.6 | 75.7 ± 1.7 | 42.6 ± 5.8 | 0.001 | 0.074 | 0.000 |
| CD4+ HLA-DR+ CD38- | 2.5 ± 0.3 | 1.9 ± 0.2 | 12.1 ± 2.4 | 0.230 | 0.000 | 0.000 |
| CD4+ HLA-DR+ | 3.9 ± 0.4 | 5.4 ± 1.2 | 40.2 ± 6.0 | 0.230 | 0.000 | 0.000 |
| CD4+ CD38+ | 62.3 ± 2.7 | 79.1 ± 1.8 | 70.6 ± 4.9 | 0.001 | 0.084 | 0.585 |

LTA, long-term asymptomatic HIV-infected children. RP, rapid progressors HIV-infected children. Control, age-matched HIV-negative healthy children. RFI, relative fluorescence intensities. Values are expressed as mean ± s.e.m. *Difference between LTA, RP and Control (level of significance).

of CD4+ HLA-DR-CD38+ T-cells higher than both the control and RP groups, whereas the percentages of CD4+ CD38+ cells were higher in LTA children than the controls. Both subpopulations of activated cells (CD4+ HLA-DR+ CD38- and CD4+ HLA-DR+) were lower in LTA than RP children (Table 3).

Thymic function and regulation of lymphopoiesis

To assess the effect of HIV-1 infection on the thymus, it is important to compare thymic function in early and late stages of HIV-1 infection with age-matched controls. In such analysis, the LTA group showed values of TRECs (median: 10804) not significantly different from the controls (median: 13720) but much higher than the RP group (median: 783) (Fig. 1). On the other hand, plasma levels of the haematopoietic cytokine IL-7, were much higher in the RP group than in uninfected controls. Interestingly, LTA had low values similar to those of the controls (Fig. 1).

DISCUSSION

Disease non-progression has been observed in a small percentage of children with vertically transmitted HIV-infection [2,3]. Here, we have analysed the immune status of a group of vertically HIV-infected children with 7 or more years of documented HIV-infection, stable CD4+ T-cells, no HIV-related disease, and none under antiretroviral therapy with protease inhibitor. This type of study is necessary because it may help to define the pathogenesis and evolution of the HIV infection in children, essential since HIV-1 infection in children shows several characteristics distinct from those in adults [2,3].

Among the first abnormalities noted in HIV-infection transition is a loss of proliferative CD4+ T-cell responses to common recall antigens such as TT, associated with decreased IL-2 production. This is followed by defects in T-cell proliferative responses to

alloantigens. Subsequently, with the continued decline in CD4+ T cells, defects in response to mitogenic stimulation as PHA, or PWM occur [4]. The LTA children conserved T-cell proliferative responses to alloantigens, but not to common recall antigens. Thus, these results can be interpreted as indicating that LTA children remain stabilized in the early stages of HIV-1 disease. On the other hand, the RP group had high values of memory and activated CD4+ T-cell subsets that are highly differentiated and show low proliferative capacity [40]. However, the LTA and RP groups did not display significant differences in the specific response to HIV-antigen. The almost normal proliferative response pattern to mitogenic and antigenic stimulation by the LTA group may be due to the almost normal numbers of naive, memory, and activated CD4+ T-cell subsets in these children.

The dramatic decrease of CD4+ T cell numbers during HIV infection may be ascribed not only to the peripheral CD4+ T cell depletion caused by the virus, but also to an inadequate replacement of the destroyed T cells [26]. T cells may be replaced by newly produced naive T cells from the thymus or by the peripheral expansion of naive and memory T cells [41]. HIV can infect and destroy human thymocytes [42,43], and HIV infected individuals have a number of thymic abnormalities including atrophy, reduced mass [44] and severe depletion of thymocytes [4], thus jeopardising the capacity for regeneration of new T cells. Such effects will be more easily detected in HIV-infected children, because due to their age they maintain a complete thymic functionality as compared to adults, and therefore, the differences between infected and uninfected children are expected to be greater. The dramatic difference between the RP and the control groups with respect to TREC levels further supports this. Interestingly, LTA children had TREC values very close to those of the controls indicating a normal thymic function. This may explain why all other immunological parameters are well preserved. In

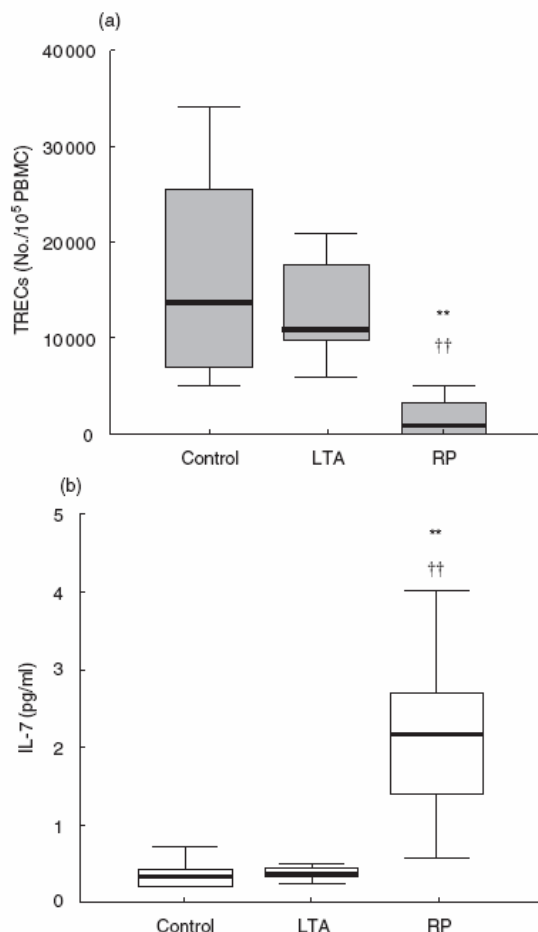


Fig. 1 (a) TREC values and (b) IL-7 concentrations in the HIV-infected children. LTA: long-term asymptomatic HIV-infected children. RP: rapid progressor HIV-infected children. Control: age-matched HIV-negative healthy children. Differences with Control group (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$) by *U*-test of Mann-Whitney. Differences with RP († $P < 0.05$; †† $P < 0.01$).

addition, we have found similar low levels of IL-7 in the plasma of both the LTA and control groups. In contrast, the RP group had much higher circulating IL-7 levels. Similar high levels have been previously described in HIV-1 infected symptomatic children and adults [29,45,46]. Such elevated levels in HIV-1-infected patients have been interpreted as being part of a homeostatic mechanism in response to T-cell depletion [29], since IL-7 is required for T-cell differentiation in the thymus. Our results are in agreement with this idea since in LTA children there was no CD4+ depletion and IL-7 levels were normal. More interestingly, our data show for the first time an inverse relation between TREC levels and IL-7 plasma levels in HIV-infected children. Thus, despite HIV-1 infection, the presence of normal thymic function is associated with a lack of IL-7 elevation.

Although it is clear that the Type 1 limb of cellular immune responses is impaired during the course of HIV infection [47,48],

controversy surrounds the proposed dominance of Type 2-like responses during progression of HIV disease [48]. We have found similar values of IL-5 (a type 2 cytokine), TNF- α , and IFN- γ (type 1 cytokines) production by PBMC from LTA and control PBMC. Thus, the LTA group had conserved both Type 1 and Type 2-responses. In contrast, PBMC from the RP group showed a diminished production of TNF- α and IFN- γ . Although, this can be explained by the lower proliferative ability of PBMC from the RP group, the production of IL-5 was not depressed to the same extent as proliferation. This somewhat supports the skewed type 2 response in HIV-1 infection [49].

In addition to functional alterations, T-cells from HIV-infected individuals manifest a variety of phenotypic abnormalities. Among those, the percentage of activated CD4+ CD28+ T-cells is reduced compared with uninfected individuals [50]. CD28- T-cells do not proliferate to activation signals, including anti-CD3 monoclonal antibodies or mitogens, and express markers of terminal activation (HLA-DR, CD38, and CD45RO) [51]. Children of the RP group had higher numbers of activated and memory CD4+ T-cells which correlates with the lower proliferative responses observed in those children. During chronic HIV-infection, an increase in CD45RO expressing memory T-cells and a loss of naïve, CD45RA-expressing cells has been observed [52]. Children of the LTA group had similar naïve CD4+ T-cell subset levels as those seen in the controls. This may indicate a control of viral replication that means naïve T-cells can avoid becoming activated and/or memory CD4+ T-cells [53]. By contrast, the lower naïve CD4+ T-cell percentages observed in the RP group could either be ascribed to the preferential destruction of naïve T-lymphocytes infected by HIV-1 as thymic precursors [27,54], or to the lack of generation of new cells as a consequence of thymic atrophy secondary to HIV-1 infection [43]. However, the fact that the RP group had a greatly reduced TREC numbers indicates that T-cell generation in the thymus is severely impaired in those children.

HIV-infected patients have a high proportion of T-cells that express CD38 and HLA-DR [22,25] which is associated with worse prognosis, decreased CD4+ T-cell numbers and increased VL [22]. The LTA group had almost similar values of activated CD4+ T-cells (HLA-DR+ CD38+ and HLA-DR+) to those of the controls, possibly due to a low level of viral replication. However, in children, high CD38 expression on CD4+ T-cells is not a good prognostic marker [25,55] being a marker of immaturity expressed on cells with a naïve phenotype instead [56]. It could be used as a marker of preserved immune status rather than activation, since its decrease is associated with immunodeficiency [21,25]. In this regard, the LTA group had percentages of CD4+ CD38+ and CD4+ HLA-DR-CD38+ T-cells higher than those of the controls, although the absolute counts of these T-cells subsets remained similar to those of the controls (data not shown). In contrast, the persistence of high percentages of activated CD4+ T-cells is a marker of viral replication and activation of the immune system in HIV-infected children of the RP type [21].

In summary, long-term asymptomatic, HIV-infected children, who have stable CD4+ T-cell counts and no HIV disease progression despite several years of HIV infection, have low VL that ensures the thymic production of naïve CD4+ T-cells is preserved. Furthermore, T cell function is very close to normal, with low levels of activation, and plasma IL-7 levels in the normal range. Moreover, besides the classic markers of

HIV-disease (CD4, VL, CD45RO, CD45RA, HLA-DR, cytokines, etc.), other markers such as TRECs and IL-7 could be used as indicators of disease progression according to our results.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Dolores Gurbindo (Sección de Inmunopaediatria, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain) for her participation in the selection and control of patients. We also want to thank Dolores García Alonso and Consuelo Muñoz for their excellent technical assistance. This work was supported by grants of the Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE 3008/99), Fondo de Investigación Sanitaria (00/0207) Programa Nacional de Salud (SAF 99-0022), Comunidad de Madrid (08-5/0034/2001), and Bristol-Myers, S.A. (Grupo Bristol-Myers Squibb). S. Resino is supported by a grant from Comunidad de Madrid.

REFERENCES

- Fauci AS. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* 1993; **262**:1011-18.
- Italian Register. HIVc Features of children perinatally infected with HIV-1 surviving longer than 5 years. *Lancet* 1994; **343**:191-5.
- Nielsen K, McSherry G, Petru A *et al*. A descriptive survey of pediatric human immunodeficiency virus-infected long-term survivors. *Pediatrics* 1997; **99**:E4.
- Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, Shearer GM. Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest* 1989; **84**:1892-9.
- Bass HZ, Fahey JL, Nishanian P, Detels R, Cumberland W, Kemeny M, Plaeger S. Relation of impaired lymphocyte proliferative function to other major human immunodeficiency virus type 1-induced immunological changes. *Clin Diagn Laboratory Immunol* 1997; **4**:64-9.
- Roilides E, Clerici M, DePalma L, Rubin M, Pizzo PA, Shearer GM. Helper T-cell responses in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* 1991; **118**:724-30.
- Meyaard L, Otto SA, Hooibrink B, Miedema F. Quantitative analysis of CD4+ T cell function in the course of human immunodeficiency virus infection. Gradual decline of both naive and memory alloreactive T cells. *J Clin Invest* 1994; **94**:1947-52.
- Roos MT, Prins M, Koot M, de Wolf F, Bakker M, Coutinho RA, Miedema F, Schellekens PT. Low T-cell responses to CD3 plus CD28 monoclonal antibodies are predictive of development of AIDS. *AIDS* 1998; **12**:1745-51.
- Mosmann TR. Cytokine patterns during the progression to AIDS. *Science* 1994; **265**:193-4.
- Clement LT, Yamashita N, Martin AM. The functionally distinct subpopulations of human CD4+ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. *J Immunol* 1988; **141**:1464-70.
- Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, Janosy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988; **140**:2171-8.
- Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selection on T cells during the virgin to memory cell transition. *J Immunol* 1993; **150**:1105-21.
- Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; **272**:60-6.
- Autran B, Legac E, Blanc C, Debre P. A Th0/Th2-like function of CD4+CD7- T helper cells from normal donors and HIV-infected patients. *J Immunol* 1995; **154**:1408-17.
- Reinhold U, Abken H. CD4+ CD7- T cells, a separate subpopulation of memory T cells? *J Clin Immunol* 1997; **17**:265-71.
- McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001; **410**:974-9.
- Cohen OJ, Kinter A, Fauci AS. Host factors in the pathogenesis of HIV disease. *Immunol Rev* 1997; **159**:31-48.
- Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocardal JJ, Bach BA. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin Exp Immunol* 1992; **90**:376-82.
- Phillips AN, Sabin CA, Eford J, Boffill M, Lee CA, Janosy G. CD8 lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years of follow-up. *AIDS* 1993; **7**:975-80.
- Jackson DG, Bell JI. Isolation of a cDNA encoding the human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocyte differentiation. *J Immunol* 1990; **144**:2811-15.
- Resino S, Navarro J, Bellón JM, Gurbindo D, León JA, Muñoz-Fernández MA. Naïve and memory CD4+ T-cells and T-cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 2001; **125**:266-73.
- Mocroft A, Boffill M, Lipman M *et al*. CD8+, CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; **14**:158-62.
- Plaeger-Marshall S, Isacescu V, O'Rourke S, Bertolli J, Bryson YJ, Stiehm ER. T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: three-color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; **71**:27-32.
- Kestens L, Vanham G, Vereecken C, Vandenbruaene M, Vercauteren G, Colebunders RL, Gigase PL. Selective increase of activation antigens HLA-DR and CD38 on CD4+ CD45RO+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol* 1994; **95**:436-41.
- de Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, Vierucci A. Different meaning of CD38 molecule expression on CD4+ and CD8+ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res* 1998; **43**:752-8.
- Rowland-Jones S. HIV infection: where have all the T cells gone? *Lancet* 1999; **354**:5-7.
- Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, Brown DA, Kosek J, McCune JM, Kaneshima H. HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* 1993; **363**:728-32.
- Douek DC, McFarland RD, Keiser PH *et al*. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998; **396**:690-5.
- Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG *et al*. Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 2001; **7**:73-9.
- Hofmeister R, Khaled AR, Benbernou N, Rajnavolgyi E, Muegge K, Durum SK. Interleukin-7: physiological roles and mechanisms of action. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999; **10**:41-60.
- Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M *et al*. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995; **332**:209-16.
- Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; **332**:201-8.
- Propato A, Schiaffella E, Vicenzi E *et al*. Spreading of HIV-specific CD8(+) T-cell repertoire in long-term nonprogressors and its role in the control of viral load and disease activity. *Hum Immunol* 2001; **62**:561-76.
- Munoz-Fernandez MA, Obregon E, Navarro J, Borner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH, Fernandez-Cruz E. Relationship of virologic,

- immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 1996; **40**:597-602.
- 35 Center for Diseases Control Prevention. Guidelines for use of antiretroviral agents in pediatric HIV, infection. *MMWR* 1998; **47**: RR-4.
- 36 Center for Diseases Control Prevention. Revised classification system for HIV-1 infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994; **43**:1-13.
- 37 Nicholson JK, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996; **26**:16-21.
- 38 Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* 1996; **26**:227-30.
- 39 Correa R, Muñoz-Fernández MA. Viral phenotype affects the thymic production of new T-cells in HIV-1 infected children. *AIDS* 2001; **15**:1959-63.
- 40 Brinchmann JE, Dobloug JH, Heger BH, Haaheim LL, Sannes M, Egeland T. Expression of costimulatory molecule CD28 on T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: functional and clinical correlations. *J Infect Dis* 1994; **169**:730-8.
- 41 Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 1997; **18**:245-51.
- 42 Burke A, Anderson D, Benson W *et al.* Localization of human immunodeficiency virus 1 RNA in thymic tissues from asymptomatic drug addicts. *Arch Pathol Laboratory Med* 1995; **119**:36-41.
- 43 Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**:529-60.
- 44 Wolthers KC, Schuitemaker H, FM. Rapid CD4+ T-cell turnover in HIV-1 infection: a paradigm revisited. *Immunol Today* 1998; **19**:44-8.
- 45 Clerici M, Saresella M, Colombo F *et al.* T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* 2000; **96**:3866-71.
- 46 Darcissac EC, Vidal V, De La Tribonniere X, Mouton Y, Bahr GM. Variations in serum IL-7 and 90K/Mac-2 binding protein (Mac-2 BP) levels analysed in cohorts of HIV-1 patients and correlated with clinical changes following antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2001; **126**:287-94.
- 47 Resino S, Bellon JM, Gurbindo D, Munoz-Fernandez MA. Dysruption in cytokine and chemokine production by T cells in vertically HIV-1 infected children. *Acta Paediatrica* 2001; **90**:989-97.
- 48 Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, Wynn TA, Shearer GM. Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* 1993; **91**:759-65.
- 49 Clerici M, Shearer GM. A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993; **14**:107-11.
- 50 Choremi-Papadopoulou H, Viglis V, Gargalianos P, Kordossis T, Iniotaki-Theodoraki A, Kosmidis J. Down-regulation of CD28 surface antigen on CD4+ and CD8+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *J AIDS* 1994; **7**:245-53.
- 51 Borthwick NJ, Bofill M, Gombert WM *et al.* Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28- T cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; **71**:2-7.
- 52 Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, Fernandez-Cruz E. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; **14**:128-35.
- 53 Brinchmann JE. Differential responses of T cell subsets: possible role in the immunopathogenesis of AIDS. *AIDS* 2000; **14**:1689-700.
- 54 Stanley SK, McCune JM, Kaneshima H *et al.* Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J Infect Dis* 1993; **168**:810-7.
- 55 Schlesinger M, Peters V, Jiang JD, Roboz JP, Bekesi JG. Increased expression of activation markers on CD8 lymphocytes in children with human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatr Res* 1995; **38**:390-6.
- 56 Dianzani U, Funaro A, DiFranco D *et al.* Interaction between endotelium and CD4+, 1994; **CD45RA+** lymphocytes. Role of the human CD38 molecule. *J Immunol*; **153**:952-9.

Artículo 3. Correa *et al.* AIDS 15:1959-1963, 2001

CONCISE COMMUNICATION

Viral phenotype affects the thymic production of new T cells in HIV-1-infected children**Rafael Correa and M^a Angeles Muñoz-Fernández****Objective:** To determine whether viral phenotype has any effect on thymic production of new T cells in HIV-1-infected children.**Design:** Differences in CD4+ T-cell counts and a marker of thymic output [T-cell antigen receptor (TCR) rearrangement excision circles (TRECs)], between HIV-1-infected children with non-syncytium-inducing (NSI) and syncytium-inducing (SI) viral strains were determined.**Patients and methods:** A cross-sectional study in 90 samples from vertically HIV-1-infected-children (median age 4.9 years) treated with combination therapy, and a longitudinal study in three children that underwent a change from NSI to SI phenotype were carried out. Viral load, viral phenotype, CD4+ T-cell counts, and quantification of TRECs values were determined.**Results:** Children with SI virus showed significant lower levels of CD4+ T cells and a lower thymic production of new T cells than children with NSI. These reductions were independent of the treatment and the age of the children. However, there were no differences in viral load with the phenotype between those groups. In children with both NSI and SI viral phenotype, there was a significant correlation between CD4+ T-cell counts and TRECs values.**Conclusion:** The decrease of CD4+ T cells in presence of T-tropic viruses would be mainly due to a lower production of new CD4+ T cells as consequence of the inhibitory effect of these T-tropic strains on thymic function. This effect is not due either to the amount of circulating virus or to the replication kinetics of those strains, but rather depends on the ability of T-tropic viruses to infect T-cell precursors using CXCR4 receptors, which are highly expressed in immature thymocytes.

© 2001 Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2001, 15:1959–1963**Keywords:** HIV-1, phenotype, thymic function, children, immune reconstitution**Introduction**

The decrease in CD4+ T cells during HIV infection is thought to be the result of both peripheral destruction caused by the virus and an inadequate replacement of

destroyed T cells [1]. The thymus is the organ responsible of the production of new T cells, which would allow for replacement of lost clone. It may play a more prominent role in T-cell homeostasis in paediatric than in adult HIV infection, as it has not yet

From the Laboratory of Immuno-Molecular Biology, Hospital General Universitario 'Gregorio Marañón', Madrid, Spain.

Correspondence to M^a Ángeles Muñoz-Fernández, Departamento de Immunología. HGU Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo, 46.28007 Madrid, Spain.

Tel: +34 91 5868565; fax: +34 91 5868018; e-mail: Mmunoz@cbm.uam.es

Received: 26 February 2001; revised: 31 May 2001; accepted: 20 June 2001.

suffered the natural involution associated with age. However, several studies have shown that HIV can infect and destroy thymocytes affecting the thymic function [2] and the production of new T cells [3].

HIV-1 variants exhibit distinct biological properties, such as cellular tropism, ability to induce syncytia, and the rate/extent of replication, and these have been shown to play an important role in the pathogenesis of AIDS. In the asymptomatic phase of infection, macrophage tropic (M-tropic) non-syncytium-inducing (NSI) strains are predominantly isolated [4], whereas progression to AIDS in children, as in adults, is often associated with the appearance of fast replicating, T-cell line-tropic (T-tropic), syncytium-inducing (SI) strains [4,5]. However, there are no data about the influence of viral phenotype in the effect of HIV on thymic function. Thus, it is tempting to speculate that the rapid CD4⁺ T-cell depletion associated to the presence of SI variants, could be due to a greater inhibitory effect of this SI variant on the thymic function and so, a lower capacity for restoring the lost T cells. To test this hypothesis, we studied the correlation of viral phenotype and replication kinetic with the production of new T cells.

Methods

Patients

A cross-sectional study was carried out at the Laboratory of Immuno-Molecular Biology of the General University Hospital 'Gregorio Marañón' in Madrid, Spain, on 90 samples from HIV-infected children born to HIV-infected mothers. Median age was 4.9 years (range 0.3–10.8 years). Four NSI and two SI samples came from children receiving highly active antiretroviral therapy and all other samples were obtained from children who were treated with combination therapy consisting of combinations of two nucleoside reverse-transcriptase inhibitors. The clinical status by CDC classification of the children was: NSI samples: 35% A, 35% B and 30% C; SI samples: 3% A, 52% B, 45% C.

In addition, a longitudinal study was carried out on three different vertically HIV-infected children treated with combination therapy (5 months old, 9 months old and 10 years old, respectively) at the time of switch from NSI to SI phenotype.

Quantitative HIV-1 RNA assay

Viral load was measured in plasma using a quantitative reverse polymerase chain reaction (PCR) assay (Amplicor Monitor; Roche Diagnostics Systems, Indianapolis, Indiana, USA), with a sensitivity of 400 RNA copies/ml.

Quantification of T-cell subsets in peripheral blood

T-lymphocyte subsets in peripheral blood were quantified by direct immunofluorescence using monoclonal antibodies of the T series and flow cytometry (FACScan; Becton-Dickinson, San Jose, California, USA).

Determination of the viral phenotype

The kinetics of replication of HIV isolates were determined by co-culturing peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with HIV and an equal number of PBMC from healthy donors as previously described [5]. Briefly, donor PBMCs were pre-treated with phytohaemagglutinin (PHA) (Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan, USA). Fresh PBMC and interleukin (IL)-2 were added to the culture once a week and supernatants were collected and tested for the presence of p24 HIV-1 antigen with the use of a commercially available kit (Innotest HIV; Innogenetics N.V., haven, Zwijnaarde, Belgium). The HIV isolates were operatively defined as rapid replication output rapid/high (R/H) when p24 antigen was detected in PBMC supernatants as soon as 3 days after beginning of culture, and if they persistently produced p24 levels higher than 200 pg/ml in culture. By contrast, HIV-1 slow/low (S/L) isolates had a lag phase of more than 7 days and thereafter produced consistently low p24 levels (< 200 pg/ml).

To determine the SI phenotype, supernatant from infected PBMC cultures were co-cultured with the MT-2 cell line. Twice a week, the MT-2 cells were observed for syncytium formation under light microscopy and the culture supernatants were tested for HIV-1 p24 antigen production [5]. We considered an isolate as SI when both formations of syncytia under light microscopy was observed and p24 antigen production in the culture supernatants was detected. Moreover, as the MT-2 cell line expresses CD4 and the CXCR4 coreceptor, but no CCR5, the X4 but not R5 strains infect the MT-2 cells. Thus, this cell line can be useful for differentiating the CXCR4-using or SI from CCR5-using or NSI strains. VIH_{BALIII} (R5 or NSI) and VIH_{NL3} (X4 or SI) were used as controls

Quantification of T-cell antigen receptor rearrangement excision circles

The values of T-cell antigen receptor (TCR) rearrangement excision circles (TRECs) were determined in PBMC by real-time quantitative PCR in a LightCycler system (Roche Molecular Biochemicals). A standard curve was made using a plasmid that includes a fragment of 375 base pairs of the TREC's sequence supplied by D. Douek [3]. Samples were analysed in duplicates or triplicates, which never varied by more than 10% from each other, and the result was averaged. A β -globin control PCR was performed to verify that all the samples had the same DNA content. All samples

from each child were measured in the same assay to avoid inter-assay variations.

Statistics

The statistical correlation of phenotype with the different variables [CD4 percentage, viral load and TRECs] was determined using the Student's *t*-test for equality of means, and Pearson's correlation coefficient was used for correlation between variables. Moreover, the correlation of phenotype with the variables was also analysed using multiple linear regression analysis including the effects of treatment and age as covariates.

Results and discussion

We assessed the relationship between viral phenotype and CD4 percentage, viral load and TRECs levels (Table 1). In children with SI viral phenotype, the CD4 percentage and TRECs values were significantly lower (about one-half) than the values for children with NSI viral phenotype ($P < 0.001$). This result did not change when the effect of antiretroviral treatment was included in the analysis. When age was used as covariant, TRECs continued to be significantly lower in children with SI phenotype ($P < 0.05$) and CD4 percentage was scarcely affected by the age ($P < 0.005$). Thus, even age has some effect, mainly in TRECs values. The statistical analysis continued to show that SI phenotype is associated with a lower production of T cells and lower levels of CD4 cells.

However, viral load was not significantly different between NSI and SI groups in according with other studies in patients treated with reverse transcriptase inhibitors [6]. No significant differences existed in CD4 percentage, viral load and TRECs between children with viral isolates with S/L and R/H replication kinetics (Table 1). These results suggest an inhibitory effect of SI viral phenotype on the production of new T cells, which is independent of viral load and viral replication kinetics.

When individual TRECs values were plotted against CD4 percentage as a function of the viral isolates SI or NSI, a highly significant correlation ($P < 0.001$) was found between CD4 percentage and TRECs in children with both NSI and SI viral phenotype (Fig. 1a). These data indicate that in children whose thymus is completely functional, CD4 changes throughout HIV infection would be mainly due to differences in the production of these cells by the thymus and not to a redistribution or peripheral expansion of T cells as occurs in adults [7].

To confirm whether the occurrence of SI virus strains influences thymic function, we performed a follow-up

Table 1. Relationship between viral phenotype and CD4 percentage (%CD4), viral load (VL) and T-cell antigen receptor (TCR) rearrangement excision circles (TRECs) levels.

| | | Viral features | | n | Mean |
|--------|-----|----------------|----|---------------------------|------|
| % CD4 | NSI | Total | 57 | 33.54 ± 15.63 | |
| | | S/L | 29 | 30.57 ± 14.87 | |
| | | R/H | 27 | 34.63 ± 18.15 | |
| | SI | Total | 33 | 14.05 ± 15.99*** | |
| | | S/L | 5 | 14.79 ± 13.21 | |
| | | R/H | 25 | 15.52 ± 16.93 | |
| Log VL | NSI | Total | 57 | 4.29 ± 0.97 | |
| | | S/L | 29 | 4.37 ± 1.08 | |
| | | R/H | 27 | 4.27 ± 0.83 | |
| | SI | Total | 33 | 4.44 ± 0.89 ^{NS} | |
| | | S/L | 5 | 4.74 ± 0.58 | |
| | | R/H | 25 | 4.47 ± 0.89 | |
| TRECs | NSI | Total | 55 | 12769 ± 8348 | |
| | | S/L | 27 | 11413 ± 7987 | |
| | | R/H | 27 | 13158 ± 9182 | |
| | SI | Total | 33 | 5759 ± 5739*** | |
| | | S/L | 5 | 4225 ± 3526 | |
| | | R/H | 25 | 6606 ± 6157 | |

NSI, nonsyncytium-inducing; SI, syncytium-inducing; S/L, slow/low; R/H, rapid/high. ***values in NSI and SI groups are significantly different ($P < 0.001$). ^{NS}, values in NSI and SI groups are not significantly different. There were not significant differences between S/L and R/H groups.

study in three HIV-infected children with different CD4+ T-cell counts. Interestingly, in the three children, the switch from NSI to SI viral phenotype was followed by a marked decline of TRECs, and in children 1 and 2 was also followed by a decrease in CD4+ T cells (Fig. 1b). Child 3 did not show a decrease in CD4 percentage, probably due to the very low CD4 levels (< 10% CD4) prior to the switch of phenotype.

Previous studies have demonstrated that M-tropic (NSI) viruses use CCR5 as coreceptor and may reach the thymus through infected dendritic cells and/or mature CD4+ T cells without affecting thymopoiesis. However, T-tropic viruses (SI) use CXCR4 as a coreceptor and may infect immature thymocytes (including CD34+ CD4^{low} thymocyte progenitors), which express high levels of CXCR4, leading to a rapid depletion of thymic cellularity [8]. This fact would explain the lower values of TRECs that were observed in children with SI viral phenotype, as these viruses would be infecting T-cell progenitors in the thymus leading to a lower production of new T cells.

In agreement with previous studies [5,6,9] we have found that SI phenotype is associated with greater depletion of CD4+ T cells and faster clinical evolution (97% of SI samples came from children in B or C clinical category). As there is a good association between lower TRECs values and SI viral phenotype but not with viral load or kinetics of replication, we can conclude that the decrease of CD4 in presence of T-tropic viruses is mainly due to a lower production of

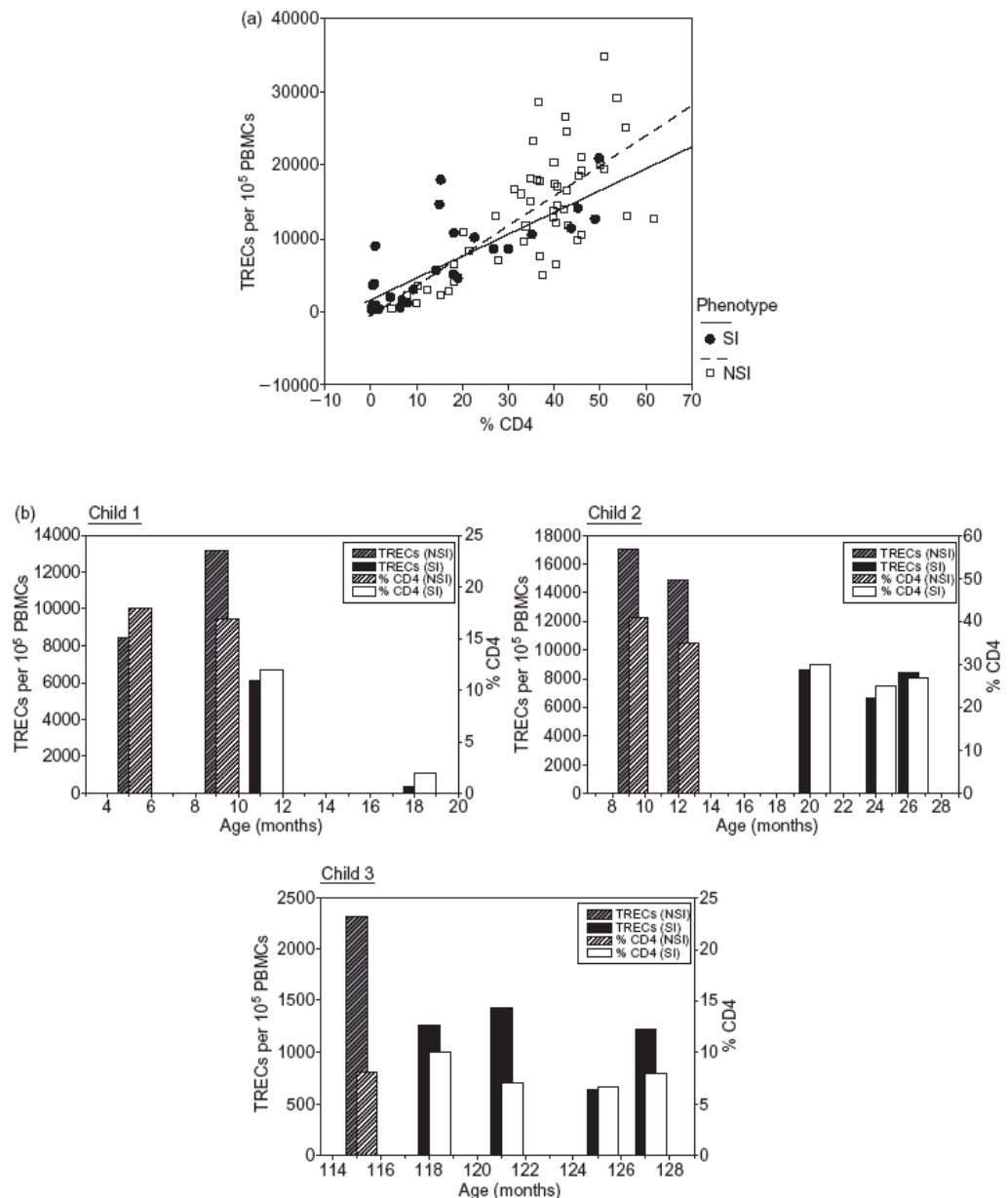


Fig. 1. CD4+ T-cell percentages and T-cell antigen receptor (TCR) rearrangement excision circles (TRECs) levels in HIV-infected children with different viral phenotype of HIV-isolates. (a) Correlation between CD4+ T-cell percentages and TRECs per 10⁵ peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were highly significant ($P < 0.001$) in children both with non-syncytium-inducing (NSI) and syncytium-inducing (SI) phenotype. (b) Switch from NSI to SI phenotype in three infected children (5, 9 months and 10 years old, respectively) leads to a marked decrease of TRECs per 10⁵ PBMC, and in two out of the three children to a decline in CD4+ T-cell percentages.

new CD4+ T cells, probably as a consequence of the inhibitory effect of these T-tropic strains on thymic function and not to peripheral CD4+ T-cell depletion induced by higher viral replication. Thus, the effect of SI strains on thymic output would not be due to a greater amount of circulating virus in these samples or to a more rapid/higher replication kinetics, but rather depends on the ability of T-tropic viruses to infect T-cell precursors using CXCR4 receptors.

Therefore, it is likely that disease progression in children, which is associated with the appearance of T-tropic viruses, could be due to the inhibition of thymic function produced by these viral strains, which would impede the recovery of lost CD4+ T cells. This fact provides an additional rationale to implement antiretroviral therapies that lead to undetectable viral load levels, even in children with severe CD4+ T-cell depletion with the goal of allowing an adequate thymic function to recover lost T cells.

Acknowledgements

We are grateful to Dolores García Alonso and María Chorro for their excellent technical assistance. Daniel Douek gently supplied the plasmid for TRECs quantification.

Sponsorship: This work was supported by 'Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en

España' (FIPSE 3008/99), 'Programa Nacional de Salud' (SAF 99-0022) and 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (FIS 00/0207). R.C. is supported by a grant from 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (BEFI 99/9176).

References

1. Rowland-Jones S. HIV infection: where have all the T cells gone? *Lancet* 1999, 354:5–7.
2. Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, *et al.* HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* 1993, 363:728–732.
3. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998, 396:690–695.
4. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Derksen MW, de Goede RE, Van Steenwijk RP. Biological phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clones at different stages of infection: progression of the disease is associated with a shift from monocytopathic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992, 66:1354–1360.
5. Munoz-Fernandez MA, Obregon E, Navarro J, *et al.* Relationship of virologic, immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 1996, 40:597–602.
6. Katzenstein TL, Nielsen C, Bruun L, Mathiesen LR, Pedersen C, Gerstoft J. Quantification of HIV-1 RNA during antiretroviral therapy: association with viral phenotype and development of resistance. *Antivir Ther* 1996, 1:246–254.
7. Pakker NG, Notemans DW, de Boer RJ, *et al.* Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998, 4:208–214.
8. Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, *et al.* CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 1998, 161:3103–3113.
9. Koot M, Keet IP, Vos AH, De G, Roos MT, Coutinho RA. Prognostic value of HIV-1 biological phenotype for rate of CD4+ count cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993 118:681–688.

Artículo 4. Correa et al. AIDS 16:1181-1187, 2002**Research Letters**

AIDS 2002, 16:1181-1187

Effects of highly active antiretroviral therapy on thymical reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected children

Rafael Correa and Angeles Muñoz-Fernández

CD4 T-cell percentages, viral load and thymic function measured as T-cell receptor rearrangement excision circle (TREC) levels were determined every 2-3 months in six treated HIV-infected children for 4 years. All children experienced a marked increase in CD4 cell count after therapy, accompanied by a concomitantly marked increase in TREC levels. In children, the decrease in viral load caused by antiviral therapy leads to an increase in CD4 T cells, mainly because of a recovery in the thymic production of new T cells.

HIV infection leads to a marked decrease in CD4 T cells, both as a result of peripheral CD4 T-cell depletion caused by the virus and inadequate replacement of the destroyed T cells. The natural thymic involution with ageing results in a limited capacity to produce naive T cells in adults. By contrast, children maintain thymic function and thus the capacity for the renewal of T cells that enables the replacement of lost clones, making immune reconstitution possible. However, HIV can infect human thymocytes and lead to their destruction [1]. An earlier study by our group [2] showed that the decrease in CD4 T cells observed in infected children is mainly caused by the inhibitory effect of T-tropic viruses on thymic function. A suppression of viral replication that diminishes the inhibition of the thymus would thus be advisable for recovering thymic function.

A widely reported fact is that highly active antiretroviral therapy (HAART) leads to a substantial increase in CD4 T cells, and within them in naive CD4 T cells [3-5], postulating a putative immune reconstitution. However, this fact could be explained by the recovery of thymic function, but also by the redistribution or peripheral expansion of pre-existent naive cells [4], or by reversion from memory to naive phenotype in peripheral T cells [6]. We have studied the effect of antiviral therapy on the production of naive T cells by the thymus, to assess the source of the increased CD4 T cells in infected children. Thymic function was determined by quantifying T-cell receptor rearrangement excision circles (TREC), a highly specific

marker of recently produced T cells by the thymus [7].

We performed a longitudinal study in six vertically HIV-infected children treated with combination antiretroviral therapy (children 1, 2 and 3) consisting of two nucleoside analogues, or with HAART consisting of two nucleoside analogues plus a protease inhibitor (children 4, 5 and 6). Informed consent was obtained from all parents or legal guardians, and the Local Ethics Committee of the hospital also gave consent. Every 2-3 months, CD4 T-cell percentages, plasma viral loads and TREC were measured in all children. TREC values were determined in peripheral blood mononuclear cells by real-time quantitative polymerase chain reaction in a fluorometric thermocycler (LightCycler; Roche Molecular Biochemicals, Idaho Falls, USA) using hybridization probes specific to the TREC sequence. All samples from each child were measured in the same assay to avoid inter-assay variations, and always included a β -globin control polymerase chain reaction to verify that all samples had the same DNA content. Correlation among variables was analysed by using Pearson's correlation coefficient.

Our results showed that antiretroviral therapy induced a decrease in viral load in the three children on combination therapy, and a complete suppression to undetectable levels in the three children on HAART (Fig. 1), which may decrease the inhibitory effect of HIV in thymic function. A marked increase in CD4 T-cell percentages was observed in the six children, showing a significant inverse correlation with viral load ($P < 0.05$). Most interestingly, the increase in CD4 T cells after antiretroviral therapy was accompanied in all six children by a concomitantly marked increase in TREC levels, as early as 2 months in children 2, 4 and 5, disclosing a highly significant correlation between both variables ($P < 0.001$ in children 1, 2, 4, 5, and 6, and $P < 0.05$ in child 3). The other two pathways for CD4 T-cell recovery, i.e. a redistribution or increase in the division rates of peripheral T cells more prevalent in adults [4], seem to be much less important in children because they would have produced a dilution of naive T cells from the thymus, and therefore a decrease in TREC levels.

The results thus show that in all children included in the study, the source of the majority of restored CD4 T cells is the thymic production of new naive T cells. This is an important fact, because not only is a

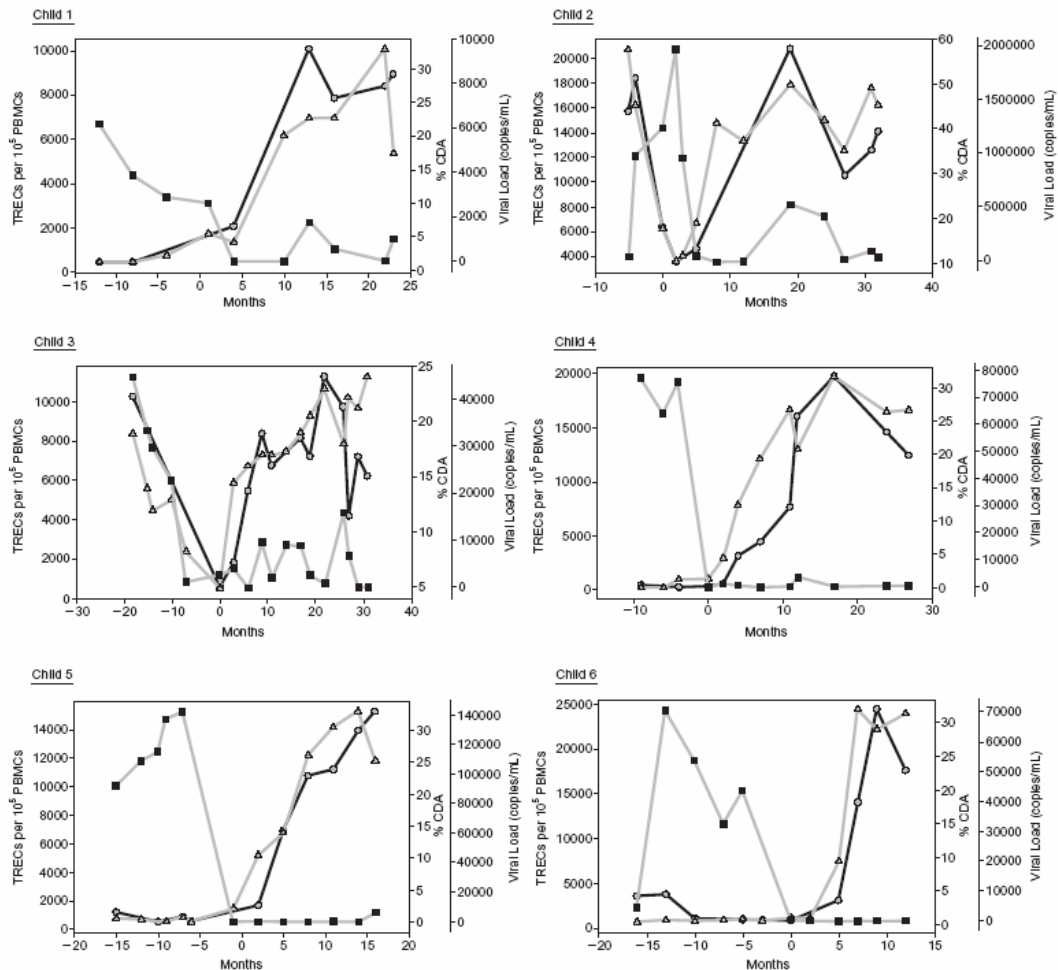


Fig. 1. Evolution of viral load, CD4 T-cell percentages and T-cell receptor rearrangement excision circles per 10^5 peripheral blood mononuclear cells in six HIV-1-infected children on antiretroviral therapy. Children 1, 2 and 3 were treated with combination antiretroviral therapy; and children 4, 5 and 6 were treated with highly active antiretroviral therapy. The 0 months value represents the beginning of the treatment. Antiretroviral therapy led to a marked increase in CD4 T cells, which correlated inversely with viral load, and was accompanied in all cases by a concomitantly marked increase in T-cell receptor rearrangement excision circle (TREC) levels. —○— T-cell receptor rearrangement excision circle levels; —▲— % CD4 cells; —■— viral load.

quantitative recovery of CD4 cells occurring, but also the generation of new T-cell clones, which could recover the repertoire of specificities capable of responding to different pathogenic agents.

Acknowledgements

The authors are grateful to Daniel C. Douek for supplying the plasmid for the standard curve and the

method of quantification of TREC, and M.D. Dolores Gurbindo for the clinical follow-up of the children.

Sponsorship: This work was supported by the *Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE 3008/99)*, the *Programa Nacional de Salud (SAF 99-0022)* and the *Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 00/0207)*. R. Correa was supported by a grant from the *Fondo de Investigaciones Sanitarias (BEFI 99/9176)*.

Department of Immunology, Hospital General Universitario 'Gregorio Marañón', Dr. Esquerado, 46, 28007 Madrid, Spain.

Received: 16 November 2001; accepted: 13 December 2001.

References

1. Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, *et al.* HIV induces thymus depletion *in vivo*. *Nature* 1993, 363:728–732.
2. Correa R, Munoz-Fernandez MA. Viral phenotype affects the thymic production of new T cells in HIV-1-infected children. *AIDS* 2001, 15:1959–1963.
3. Autran B, Carcelain G, Li TS, *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease [see Comments]. *Science* 1997, 277:112–116.
4. Pakker NG, Notemans DW, de Boer RJ, *et al.* Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998, 4:208–214.
5. Gibb DM, Newberry A, Klein N, de Rossi A, Grosch-Woerner I, Babiker A. Immune repopulation after HAART in previously untreated HIV-1-infected children. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) Steering Committee. *Lancet* 2000, 355:1331–1332.
6. McLean AR, Michie CA. *In vivo* estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:3707–3711.
7. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998, 396:690–695.

No increase in HIV incidence observed in a cohort of men who have sex with other men in Montreal

Robert S. Remis^{a,b}, Michel Alary^{c,d}, Joanne Otis^e, Benoit Mâsse^c, Eric Demers^c, Jean Vincelet^f, Bruno Tummel^b, Roger LeClerc^g, René Lavoie^h, Raymond Parent^d, Clemon George^c, and the Omega Study Group

To monitor HIV incidence we tested a cohort of men who have sex with men in Montreal for HIV every 6 months. Between 1996 and 2001, 17 out of 1244 participants seroconverted, for an HIV incidence of 0.56 per 100 person-years (py) (95% CL 0.29, 0.83). The incidence decreased over the study period, from 0.75 to 0.34 per 100 py; which was not statistically significant. An in-depth evaluation of the situation in Montreal could identify useful lessons for prevention efforts elsewhere.

Men who have sex with men (MSM) have been severely affected by the HIV epidemic and, in industrialized countries, make up the majority of HIV-infected individuals. The incidence of HIV among MSM was generally highest early in the epidemic and, as a result of marked reductions in risky sexual behaviours, has decreased since then. HIV prevalence in this group is generally 10–20% [1,2]. Beginning in 1996, new combination highly active antiretroviral therapy (HAART) regimens markedly improved the prognosis of HIV infection, resulting in plummeting rates of AIDS and death. Subsequently, however, studies in north America, Europe and Australia have observed a recrudescence in the incidence of bacterial sexually transmitted diseases (STD) [3,4], high risk sexual behaviours [5,6] and in some jurisdictions the incidence of HIV [7,8]. One US study [9] reported that high-risk behaviours were associated with a reduced concern about becoming infected as a result of HAART.

In October 1996, we began recruiting HIV-seronegative MSM in Montreal to measure the incidence of HIV and its behavioural determinants. We obtained

informed consent and, at baseline and 6 month follow-up visits, tested participants for HIV and collected data on sexual behaviours. Up to February 2001, 1588 MSM enrolled in the study. The drop-out rate was 14% at the second visit, decreasing to 8% for subsequent visits. A total of 1244 participants attended for one to eight follow-up visits, contributing 3027 person-years (py) of observation.

We observed 17 seroconversions for an HIV incidence of 0.56 per 100 py (95% confidence limits 0.29, 0.83). Incidence decreased over the study period, from 0.75 per 100 py in 1996–1997 to 0.34 per 100 py in 2000–2001. This decreasing trend was not, however, statistically significant. The incidence of HIV overall was 0.96 per 100 py in MSM less than 30 years old compared with 0.38 per 100 py in those aged 30 years or older. However, the incidence of HIV was actually greater in older MSM in the first 15 months of the study but has been lower since then (see Fig. 1).

We examined the incidence of HIV as a function of calendar time and the number of visits in the study to determine whether the decreasing trend in HIV incidence may be the result of a 'cohort effect'. Incidence among those in the study for longer may be lower because of such factors as repeated counselling and a selective drop-out of higher-risk MSM. This analysis indicated no obvious cohort effect.

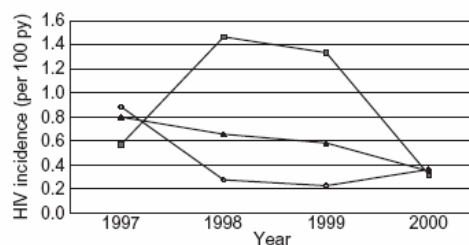


Fig. 1. HIV incidence by calendar year and age (Omega Cohort Study, Montreal, 1997–2000). —■— Less than 30 years; —◇— 30 years or older; —▲— all ages.

Artículo 5. Resino, Correa et al. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* 18:1395-1406, 2002

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES
Volume 18, Number 18, 2002, pp. 1395-1406
© Mary Ann Liebert, Inc.

Characterizing Immune Reconstitution after Long-Term Highly Active Antiretroviral Therapy in Pediatric AIDS

SALVADOR RESINO, RAFAEL CORREA, JOSÉ M. BELLÓN, SILVIA SÁNCHEZ-RAMÓN,
and M. ÁNGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ

ABSTRACT

In this study, we sought to characterize the T lymphocyte recovery in vertically HIV-1-infected children who respond to long-term highly active antiretroviral therapy (HAART). A 3-year longitudinal retrospective study was used to perform a cross-sectional study of 32 children rated according to the time course of CD4⁺ T cell percentages in response to antiretroviral therapy and CDC clinical classification: (1) long-term asymptomatic (LTA group): 8 children in A1 during the whole follow-up period; (2) responsive to HAART (Rec group): 13 children in C3 before HAART who achieved CD4⁺ T cell counts of >500 cells/mm³ after 3 years of HAART; and (3) nonresponsive to HAART (Non-Rec group): 11 children in C3 during the whole follow-up period despite 3 years of HAART. We also studied 17 healthy age-matched uninfected children as controls. Lymphoproliferative responses (LPRs) were evaluated by incorporation of [³H]thymidine, identification of T cell subsets by three-color flow cytometry, and determination of thymic production of T cells by quantification of T cell receptor rearrangement excision circles (TRECs). Interestingly, the Rec group showed an increase in percentage of CD4⁺ T cells and a decrease in viral load, and recovered LPRs to mitogens and recall antigens, with values similar to those of the LTA group. Moreover, the Rec group produced similar percentages and absolute counts of naive (CD45RA⁺CD62L⁺) CD4⁺ and CD8⁺ T cells, and TRECs similar to those of the LTA group. In particular, the Rec group produced similar percentages of CD8⁺CD28⁻CD57⁺ and CD8⁺CD28⁻CD57⁻ T cell subsets compared with controls. Our data indicate that among children who have already progressed to AIDS and severe immunodeficiency but who respond to HAART, the immune system can recover and resemble those of nonprogressors or even uninfected children, in quantitative as well as in functional terms.

INTRODUCTION

HIV-1 CAUSES A PROGRESSIVE and severe immunodeficiency¹ beginning in the early phase of infection, and before overt CD4⁺ T lymphocyte depletion develops.² A number of T cell abnormalities are common, including decreased lymphocyte proliferation in response to recall antigens and mitogens,²⁻⁴ as well as reduced production and/or expression of cytokines,⁵ all of them more pronounced in advanced disease.

Antiretroviral therapy (ART), and more specifically highly active ART (HAART), by means of suppression of viral replication, has dramatically altered the course of HIV infection.⁶ Whereas ART usually induces a significant reduction of plasma viral load (VL) in adults, in children it is not common to achieve

a sustained descent of VL below detection limits of the ultrasensitive assay.^{7,8} A concomitant decrease in CD4⁺ T cell counts and clinical improvement takes place,^{9,10} even in children with virologic failure. A full recovery of the immune system in adults undergoing HAART has not yet been described, possibly because of the profound deterioration of the immune system or lower immune plasticity than in children. A slow, sustained increase in naive T lymphocytes,^{11,12} resulting from either redistribution of circulating naive lymphocytes or newly generated lymphocytes of thymic origin, has been described in adults after HAART. Thymic emigrants express T cell receptor (TCR) excision circles (TRECs) derived during T cell receptor rearrangement in newly developed T cells. Thus, the level of TRECs in peripheral blood T cells is an excellent mea-

Department of Immunology, General University Hospital Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain.

sure of thymic function in general.¹³ HAART has been reported to induce a rise in peripheral CD4⁺ T cell counts and TRECs levels in younger HIV-1-infected patients.^{13,14} The CD4⁺ CD45RO⁺ memory T cell subset is derived by a postthymic maturation process from CD4⁺CD45RA⁺ naive T cells.^{15,16} Besides, T cells are constantly recycling between blood and lymphoid tissues^{17,18} in a process thought to be dependent on L-selectin (CD62L) expression.^{17,18} Although full immune reconstitution does not take place in all HIV⁺ patients,¹⁹ HAART invariably induces a transient improvement in CD4⁺ T cell function even in patients with advanced disease.²⁰

HIV-1-infected patients have a large proportion of T cells that express CD38 and HLA-DR,^{21,22} suggesting continuous antigenic challenge. In adults, these subsets are indicative of disease progression, correlating with a decline in CD4⁺ T cells and increased VL.^{23,24} By contrast, high CD38 expression on CD4⁺ T cells in children is a good prognostic marker^{21,22} because, contrary to the situation in adults, CD38 in children is also a marker of immaturity, being expressed on cells with naive phenotype.²⁵ These cells are mostly long-lived recent thymic emigrants with high mitotic potential and therefore more susceptible to virus-mediated CD4⁺ T cell destruction than short-lived effector T cells generated by peripheral expansion in adults.²¹ On the other hand, CD8⁺CD38⁺ T cells have been proposed as a useful tool for ART monitoring in adults, because HIV-1-infected subjects displaying high proportions of CD8⁺CD38⁺ T cells will respond more rapidly to ART than those with low proportions,²⁶ and inversely correlate with the decrease in VL induced by therapy.^{27,28}

During the course of HIV-1 infection, there is a substantial expansion of cells expressing activation and memory surface markers,^{29,30} thus increasing memory CD8⁺ T cells.³¹ A progressive increase in CD8⁺CD28⁻ T cells, particularly cells that coexpress CD57, a marker of effector cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in adults, has been described.³² Moreover, CD11b is enhanced in effector CD8⁺ T cells, and the cytolytic function of CD8⁺ T cells has been linked to cells with the CD11b⁺ phenotype,³³ which is associated with progression of HIV-1 infection.³⁴

The aim of this study was to determine the immunologic features (T cell subset distribution, thymic function, lymphocyte proliferation, and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells [PBMCs] stimulated with phytohemagglutinin [PHA], pokeweed mitogen [PWM], and anti-CD3 plus anti-CD28) of a group of vertically HIV-1-infected children in clinical category C (AIDS) and immunologic category 3, who recovered CD4⁺ T cells (>25% or >500 T CD4⁺ cells/ml) after 3 years of stable HAART.

PATIENTS AND METHODS

Study population

Thirty-two infants born to HIV-1-infected mothers were studied at the immunopediatric unit of the General University Hospital Gregorio Marañón and 12 de Octubre Hospital in Madrid, Spain. All infants were diagnosed as HIV-1 infected on the basis of positive results both in DNA polymerase chain reaction (PCR) and virus culture assays, as previously described.³⁵ Children were monitored every 6 months for CD4⁺ and CD8⁺ T cell percentages and VL. This follow-up was used to perform a cross-sectional study of the 32 children, who were placed in one of three groups according to the time course of CD4⁺ T cell percentages: (1) long-term asymptomatic (LTA group): 8 children with CD4⁺ T cells above 25%, asymptomatic during the whole follow-up period, and who did not receive HAART; (2) responsive to HAART (Rec group): 11 children in clinical category C3 who responded by achieving CD4⁺ T cell counts of >500 cells/mm³ after 3 years of HAART; (3) nonresponsive to ART (Non-Rec group): 13 children in clinical category C3 during the whole follow-up despite 3 years of HAART. We also studied 17 healthy age-matched uninfected children as controls.

Drugs were prescribed by the attending pediatrician according to Centers for Disease Control and Prevention (CDCP, Atlanta, GA) guidelines³⁶ on obtaining written informed consent from parents or legal guardians. HAART was defined as at least

TABLE 1. MONOCLONAL ANTIBODIES USED FOR PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF CD4⁺ AND CD8⁺ T CELL SUBSETS^a

| Tube | FITC | PE | PerCP | Analyzed subset |
|------|------------------------|-------------|----------|--|
| 1 | IgG1 | IgG1 | Anti-CD4 | CD4 ⁺ T cell gate |
| 2 | Anti-HLA-DR | Anti-CD45RO | Anti-CD4 | Memory/activated CD4 ⁺ |
| 3 | Anti-CD45RA | Anti-CD62L | Anti-CD4 | Naive CD4 ⁺ |
| 4 | Anti-CD38 | Anti-HLA-DR | Anti-CD4 | Activated CD4 ⁺ |
| 5 | IgG1 | IgG1 | Anti-CD8 | CD8 ⁺ T cell gate |
| 6 | Anti-CD38 ^b | Anti-CD45RO | Anti-CD8 | Memory/activated CD8 ⁺ |
| 7 | Anti-CD45RA | Anti-CD62L | Anti-CD8 | Memory/naive/effector CD8 ⁺ |
| 8 | Anti-CD57 | Anti-CD28 | Anti-CD8 | Effector CD8 ⁺ |
| 9 | Anti-CD38 ^b | Anti-HLA-DR | Anti-CD8 | Activated CD8 ⁺ |

Abbreviations: FITC, Fluorescein isothiocyanate; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein.

^aNaive T cells were defined as CD62L⁺ and CD45RA^{bright} T cells (CD4⁺CD45RA^{hi}CD62L⁺, CD8⁺CD45RA^{hi}CD62L⁺); memory T cells were defined as CD45RO⁺; activated T cells were defined as HLA-DR⁺ and HLA-DR⁺CD38⁺; memory-activated T cells were defined as CD8⁺CD45RO⁺CD38⁺ and CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺; preeffector CD8⁺ T cells were defined as CD8⁺CD57⁻CD28⁻ and CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻; effector CD8⁺ T cells were defined as CD8⁺CD57⁺, CD8⁺CD57⁺CD28⁻, and CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻.

^bImmunotech (Marseille, France).

IMMUNE RECOVERY AFTER HAART

1397

TABLE 2. CHARACTERISTICS OF HIV-1-INFECTED CHILDREN OF Rec GROUP AT ENTRY INTO FOLLOW-UP STUDY

| LTA | | | Non-Rec | | | | | Rec | | | | | | |
|-------------|--------|----------------------------|----------------------|---------------------|-------------|--------|----------------------------|----------------------|---------------------|-------------|--------|----------------------------|----------------------|---------------------|
| Age (years) | Sex | % CD4 ⁺ T cells | Log ₁₀ VL | Treatment pre-HAART | Age (years) | Sex | % CD4 ⁺ T cells | Log ₁₀ VL | Treatment pre-HAART | Age (years) | Sex | % CD4 ⁺ T cells | Log ₁₀ VL | Treatment pre-HAART |
| 4.37 | Female | 41.0 | 2.77 | 3TC + ddi | 12.15 | Male | 5.00 | 4.80 | ddl | 11.91 | Female | 3 | 4.16 | AZ + ddi |
| 4.52 | Female | 55.0 | 3.33 | 3TC + ddi | 8.37 | Female | 12.00 | 3.38 | ddl | 6.02 | Male | 7 | 4.94 | 3TC + ddi |
| 9.89 | Female | 33.0 | 4.84 | Naive | 14.81 | Female | 7.00 | 4.75 | Naive | 9.10 | Male | 3 | 4.64 | 3TC + ddi |
| 12.40 | Female | 36.4 | 3.96 | Naive | 10.04 | Male | 4.00 | 4.93 | AZT | 7.21 | Male | 1 | 4.89 | 3TC + ddi |
| 10.42 | Male | 38.0 | 3.56 | AZT + 3TC | 14.99 | Male | 1.59 | 4.43 | d4T + ddi | 9.24 | Female | 1.5 | 2.30 | d4T + ddi |
| 5.94 | Female | 49.0 | 2.30 | ddl | 10.42 | Male | 3.00 | 6.37 | Naive | 6.55 | Female | 10 | 4.27 | ddl |
| 14.94 | Male | 42.8 | 3.45 | Naive | 7.59 | Male | 10.28 | 5.39 | Naive | 2.94 | Female | 2 | 5.31 | 3TC + d4T |
| 6.14 | Female | 43.0 | 2.30 | ddl | 5.30 | Female | 2.20 | 4.68 | AZT + ddi | 6.24 | Male | 4 | 5.66 | 3TC + d4T + ddi |
| | | | | | 7.87 | Female | 3.20 | 4.23 | AZT + ddi | 4.05 | Female | 11 | 5.22 | Naive |
| | | | | | 10.05 | Female | 16.00 | 5.24 | AZT | 5.47 | Male | 1 | 5.22 | ddl |
| | | | | | 4.60 | Male | 7.60 | 6.07 | AZT + ddi | 5.35 | Female | 4 | 5.22 | d4T + SQV |
| | | | | | 7.40 | Female | | 5.09 | 3TC + d4T | | | | | |
| | | | | | 4.75 | Male | 4.00 | 4.74 | AZT + ddi | | | | | |

Abbreviations: HAART, Highly active antiretroviral therapy; VL, viral load.

two nucleoside analog HIV-1 reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) plus one or more HIV protease inhibitors (PIs). Clinical classification was based on the 1994 revised guidelines of the CDC.³⁷

Quantitative HIV-1 RNA assay

Blood samples were collected in EDTA tubes and separated within 4 hr, and plasma was stored at -70°C . Viral load was measured in 200 μl of plasma, using an ultrasensitive quantitative reverse transcriptase PCR (RT-PCR) assay (Amplicor Monitor; Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ).

Proliferative assays and cytokine production

Total PBMCs cultured were seeded in 96-well flat-bottom microtiter plates ($2 \times 10^5/200 \mu\text{l}$ per well) and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum. PBMCs were stimulated mitogenically: PHA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Murex Biotech, Dartford, UK), monoclonal anti-CD3 antibody (SPV3Tb, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; kindly provided by J.E. de Vries, DNAX, Palo Alto, CA) plus monoclonal anti-CD28 antibody (L-293, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), or PWM (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma, St. Louis, MO). In addition, we studied proliferation in response to the following antigens: streptokinase (SK, 100 IU/ml), and tetanus toxoid (TT, 0.5 Lf/ml). The assay was carried out in quadruplicate cultures. The cultures were incubated at 37°C and maintained in a hu-

modified atmosphere containing 5% CO_2 . On day 3 of culture with mitogenic stimulus, and on day 6 of culture with antigenic stimulus, 50% of the culture supernatants were harvested and stored at -70°C and the wells were replenished with an equivalent volume of fresh medium with 1 μCi of [^3H]thymidine (Amersham, Buckinghamshire, UK). Cell proliferation was estimated by incorporation of [^3H]thymidine into DNA during the last 6 hr of culture. The cells were harvested in glass fiber filters in an automatic cell harvester (Skatron, Norway) and radioactive incorporation was measured in a liquid scintillation spectrometer (1450 Microbeta Trilux; Wallac, Turku, Finland). The results were expressed as lymphocyte stimulation index (see Statistical Analysis, below).

Cytokine production was quantified in supernatants of PBMCs stimulated with PHA. We have used commercially available enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), according to the manufacturer instructions: tumor necrosis factor α (TNF- α), and interferon γ (IFN- γ) (Bender Medical System Diagnostics, Vienna, Austria). Concentrations were assayed in duplicate.

Quantification of CD4^+ and CD8^+ T lymphocyte subsets

T lymphocyte subsets in peripheral blood were quantified by direct immunofluorescence. For the analysis of CD4^+ T and CD8^+ T subsets, we used the monoclonal antibody combinations

TABLE 3. CHARACTERISTICS OF HIV-1-INFECTED CHILDREN AND HEALTHY UNINFECTED CONTROL GROUP IN CROSS-SECTIONAL STUDY AT END OF FOLLOW-UP PERIOD

| Characteristic | Control | LTA | Non-Rec | Rec |
|--|--------------------------------|---|---|---|
| No. of children | 17 | 8 | 13 | 11 |
| Age (years) ^a | 12.5 \pm 0.6 (7.2; 16.0) | 11.0 \pm 1.3 (6.6; 16.9) | 11.9 \pm 0.9 (7.7; 18) | 10.7 \pm 0.8 (7.1; 16.8) |
| Lymphocyte subsets ^a | | | | |
| % CD4^+ | 44.2 \pm 1.5 (32.4; 51.1) | 35.5 \pm 1.8 ^b (26.7; 43.3) | 9.6 \pm 1.9 ^{b,c} (1.2; 21.7) | 29.4 \pm 2.3 ^{b,d} (18.1; 40.0) |
| % CD8^+ | 24.1 \pm 1.3 (19.5; 34.7) | 36.2 \pm 2.3 ^b (28.7; 45.4) | 62.5 \pm 4.3 ^{b,c} (37.6; 86.5) | 40.2 \pm 4.3 ^{b,d} (24.2; 63.9) |
| $\text{CD4}^+/\text{mm}^3$ | 1072 \pm 138 (557; 2097) | 908 \pm 74 (657; 1298) | 140 \pm 17 ^{b,c} (9; 225) | 831 \pm 45 ^d (582; 1111) |
| $\text{CD8}^+/\text{mm}^3$ | 582 \pm 86 (262; 1198) | 937 \pm 104 ^b (553; 1370) | 1163 \pm 229 ^b (356; 2791) | 1311 \pm 260 ^b (444; 2726) |
| Virologic characteristics ^a | | | | |
| \log_{10} VL (copies/ml) | — | 2.55 \pm 0.06 (2.48; 2.88) | 3.93 \pm 0.36 (2.48; 5.40) | 2.95 \pm 0.24 (2.48; 4.40) |
| VL < 400 copies/ml | — | 6 (75%) | 3 (23%) | 7 (63.6%) |
| Treatment | | | | |
| NT | — | 2 | — | — |
| MT | — | 2 | — | — |
| CT | — | 4 | — | — |
| HAART | — | — | 13 | 11 |

Abbreviations: VL, Viral load; NT, not treated; MT, monotherapy; CT, combination therapy; HAART, highly active anti-retroviral therapy.

^aValues expressed as means \pm SEM (min; max). Mann-Whitney *U* test was used to compare between groups.

^b $p < 0.01$, compared with control group.

^c $p < 0.01$, compared with LTA group.

^d $p < 0.01$, compared with Non-Rec group.

IMMUNE RECOVERY AFTER HAART

1399

shown in Table 1. T cell subsets were analyzed by three-color flow cytometry in whole, lysed, and washed blood.³⁸ Acquisition was performed in a FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) cytometer using Lysis II software (Becton Dickinson) within 2 hr of cell staining. The optimal parameters for acquisition (detector sensitivity, detector amplification, and compensation) were determined periodically with Calibrite (Becton Dickinson) and the AutoComp (Becton Dickinson) program. Five thousand events were compiled, using a collection gate for CD4⁺ T cells or CD8⁺ T cells. The gate was defined by low side scatter (SSC) and high expression of CD4 or CD8.^{39,40} Data were analyzed with the Lysis II analysis program (Becton Dickinson). Appropriate isotypic controls (IgG1 conjugated to fluorescein isothiocyanate or phycoerythrin; IgG1-FITC and IgG1-PE, respectively) were used to evaluate nonspecific staining, which was deducted from the remaining results.

Quantification of TCR rearrangement excision circles

Thymic function was studied by quantifying a highly specific marker of T cells recently produced by the thymus, namely, TCR rearrangement excision circles (TRECs). TREC values were determined in PBMCs by real-time quantitative PCR in a LightCycler system (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). A standard curve was made by using a plasmid that includes a fragment consisting of 375 base pairs of the TREC sequence, kindly supplied by D. Douek.⁴¹ Samples, analyzed in duplicate or triplicate, never varied by more than 10% from each other, and the results were averaged. A β -globin control PCR was performed to verify that all samples had the same DNA content. All samples from each child were measured in the same assay to avoid interassay variations.

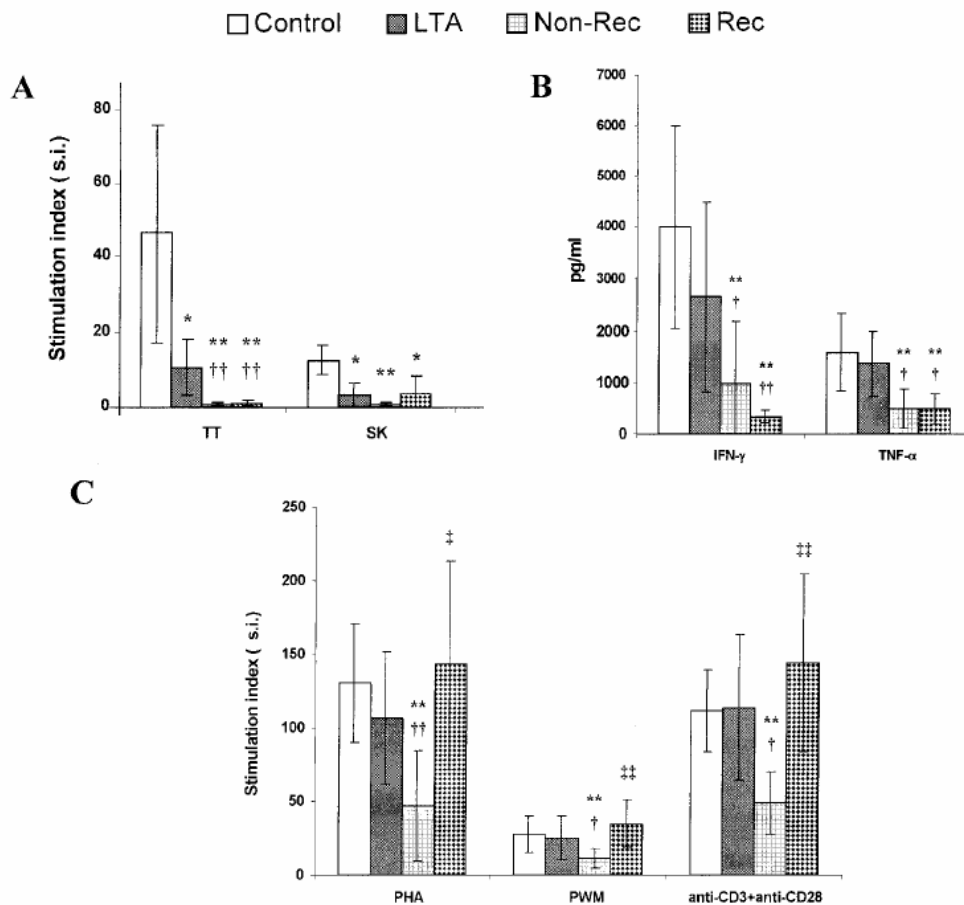


FIG. 1. Summary of stimulation indexes of proliferation and cytokine production by PBMCs of HIV-1-infected children. In proliferation studies, PBMCs were stimulated mitogenically (PHA, PWM, and anti-CD3 plus anti-CD28) or antigenically (TT and SK). Differences from control group (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) by Mann-Whitney U test; differences from LTA group († $p < 0.05$; †† $p < 0.01$); differences from Non-Rec group (‡ $p < 0.05$; ††† $p < 0.01$).

Statistical analysis

In all analyses, VL was transformed to a log₁₀ scale in order to normalize distribution. Cytokine production by PBMCs stimulated with PHA was corrected by subtracting the values for cytokines produced by unstimulated PBMCs. Proliferation of PBMCs is expressed as an adjusted stimulation index:

$$SI = \frac{\text{proliferation of PBMCs with mitogen or antigen}}{\text{spontaneous proliferation of PBMCs}}$$

Differences in characteristics among infants were analyzed by nonparametric tests because of the small sample size or the free distribution of data (the data did not come from normalised populations with the same variances). The Mann-Whitney *U* test, a nonparametric analog of one-factor analysis of variance, was used for between-group comparisons.

RESULTS*Characteristics of the HIV-infected children*

The immunologic, virologic, and clinical characteristics of HIV-1-infected children from the Rec group at baseline are described in Table 2. The Rec group was studied during a follow-up period of 47.9 ± 2.6 (36; 61.8) months. After this period of follow-up, the Rec group, the remaining HIV-infected children, and the control group (*see* Patients and Methods) were compared in a cross-sectional study. The immunologic, virologic, and clinical characteristics of the different groups in the cross-sectional study are described in Table 3.

Lymphoproliferative responses and cytokine production by PBMCs

The PBMCs from HIV-1-infected children showed lower proliferative responses (LPRs) to antigenic stimulus with

tetanus toxoid (TT) than the control and LTA groups, but similar responses to streptokinase (SK) compared with the LTA group (Fig. 1A). In addition, the LPRs of PBMCs from the Rec group, as measured by stimulation indexes to PHA, PWM, and anti-CD3 plus anti-CD28 stimulation, were similar to those of the control and LTA groups (Fig. 1B). All three groups had higher LPRs than those of the Non-Rec group (*p* < 0.05) (Fig. 1C). Cytokine production in HIV-infected children was differentially affected. The production of TNF-α and IFN-γ was lower in the Rec and Non-Rec groups than in the LTA and control groups (Fig. 1B).

T cell subsets

Table 4 illustrates the values for naive and memory CD4⁺ and CD8⁺ circulating T cells. The Rec group showed a higher percentage of memory (CD4⁺CD45RO⁺) CD4⁺ T cells than the LTA group, and a higher percentage of memory-activated CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺ cells than the control group. The CD4⁺CD45RA^{hi}CD62L⁺ subset was of similar size in the Rec group, control group, and LTA group. CD8⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺CD38⁺ cell percentages in the Rec group were higher than in the control group, but similar to those of the LTA group. These two subsets were most represented in the Non-Rec group. With respect to naive CD8⁺ T cells (CD8⁺CD45RA^{hi}CD62L⁺), the Rec group showed higher values compared with the Non-Rec group, similar values compared with the LTA group, and lower values compared with the control group. However, in absolute counts of CD4⁺ T cells, CD4⁺CD45RO⁺ and CD4⁺CD45RA^{hi}CD62L⁺ cell counts in the Rec group were comparable to those of the LTA and control groups, and higher than those of the Non-Rec group. In absolute counts of CD8⁺ T cells, CD8⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺CD38⁺ cell counts in the Rec group were similar to those of the LTA group, and higher than those of the control group. CD8⁺CD45RA^{hi}CD62L⁺ cell counts were similar in the Rec group, control group, and LTA group.

TABLE 4. DIFFERENCES IN MEMORY/NAIVE CD4⁺ AND CD8⁺ T CELL SUBSETS AMONG GROUPS OF CHILDREN STUDIED^a

| | Control | LTA | Non-Rec | Rec |
|--|------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T cells (%) | | | | |
| CD4 ⁺ CD45RA ^{hi} CD62L ⁺ | 46.3 ± 2.9 | 64.7 ± 2.6 ^b | 30.1 ± 6.7 ^c | 52.1 ± 3.7 |
| CD4 ⁺ CD45RO ⁺ | 50.9 ± 3.9 | 33.9 ± 2.9 ^b | 70.3 ± 6.7 ^c | 48.4 ± 6.1 ^c |
| CD4 ⁺ CD45RO ⁺ HLA-DR ⁺ | 3.4 ± 0.4 | 3.6 ± 0.5 | 31.6 ± 6.4 ^{b,c} | 7.2 ± 1.2 ^{b,c} |
| CD8 ⁺ CD45RA ^{hi} CD62L ⁺ | 54.3 ± 3.1 | 46 ± 5.4 | 12 ± 2.1 ^{b,c} | 38.1 ± 2.1 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ CD45RO ⁺ | 37.7 ± 3.4 | 42.9 ± 5.3 | 73.8 ± 3.7 ^{b,c} | 52.7 ± 5.1 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD38 ⁺ | 10.5 ± 1.3 | 21.6 ± 4.6 | 55.2 ± 5.4 ^{b,c} | 21 ± 2.9 ^{b,d} |
| T cells (cells/mm ³) | | | | |
| CD4 ⁺ CD45RA ^{hi} CD62L ⁺ | 464 ± 75 | 598 ± 71 | 51 ± 13 ^{b,c} | 432 ± 40 ^d |
| CD4 ⁺ CD45RO ⁺ | 498 ± 80 | 298 ± 20 ^b | 89 ± 10 ^{b,c} | 400 ± 57 ^d |
| CD4 ⁺ CD45RO ⁺ HLA-DR ⁺ | 32 ± 5 | 31 ± 3 | 37 ± 8 | 57 ± 7 ^b |
| CD8 ⁺ CD45RA ^{hi} CD62L ⁺ | 273 ± 43 | 432 ± 77 | 89 ± 12 ^{b,c} | 421 ± 58 ^d |
| CD8 ⁺ CD45RO ⁺ | 191 ± 43 | 409 ± 77 ^b | 944 ± 227 ^b | 770 ± 206 ^b |
| CD8 ⁺ CD45RO ⁺ CD38 ⁺ | 59 ± 17 | 215 ± 61 ^b | 682 ± 176 ^{b,c} | 307 ± 94 ^b |

^aValues represent means ± SEM. Mann-Whitney *U* test was used to compare between groups.

^b*p* < 0.05, compared with control group by Mann-Whitney *U* test.

^c*p* < 0.05, compared with LTA group.

^d*p* < 0.01, compared with Non-Rec group.

IMMUNE RECOVERY AFTER HAART

1401

Table 5 shows the values of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The Rec group showed percentages of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells similar to those of the LTA group. Globally, HIV-1-infected children showed higher percentages of activated CD4⁺ T cells than the control group. The Rec group showed higher percentages of circulating CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁺ cells than the LTA group. Moreover, the Rec group showed lower percentage values for CD4⁺HLA-DR⁺ and CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁻ cells than the Non-Rec group, but the CD4⁺HLA-DR⁻CD38⁺ T cell percentage value was higher than for the Non-Rec group. Concerning percentages of activated CD8⁺ T cells, the Rec group had higher values for CD8⁺HLA-DR⁺ and CD8⁺HLA-DR⁺CD38⁺ cells than in the control group, but lower values than in the Non-Rec group. Also, the Rec group had lower CD8⁺CD38⁺ values than did the Non-Rec group. In absolute counts of activated CD4⁺ T cells, the Rec group showed higher values than the Non-Rec group. Moreover, the Rec group had CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁺, CD4⁺HLA-DR⁺CD38⁻, and CD4⁺HLA-DR⁺ cell counts higher than in the LTA group. On the other hand, absolute counts of activated CD8⁺ T cells in the Rec group were higher than in the control group, and similar to those of the LTA group. Alone, CD8⁺HLA-DR⁺CD38⁺ and CD8⁺HLA-DR⁻CD38⁺ cell counts in the Rec group were higher than in the Non-Rec group.

Table 6 shows the values of effector CD8⁺ T cells. In terms of percentages of preeffector and effector CD8⁺ T cells, the Rec group showed values similar to those of the LTA group. Moreover, the Rec group had higher values for activated CD4⁺ T cells relative to the control group. The Rec group showed

values for CD8⁺CD28⁻CD57⁺, CD8⁺CD28⁻CD57⁻, CD8⁺CD57⁺, CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻, and CD8⁺CD28⁻ cells lower than in the Non-Rec group. In absolute counts of preeffector and effector CD8⁺ T cells, HIV-1-infected children had higher values than did the control group.

Thymic function

In addition, TRECs and percentages of CD4⁺ T cells were longitudinally compared in two children of the Rec group. The initiation of ART in child 1 (Fig. 2A), or the switch to HAART in child 2 (Fig. 2B), led to a dramatic increase in CD4⁺ T cells, which was accompanied by a concomitant increase in TREC levels. On the other hand, the Rec group showed similar TREC values when compared with the control and LTA groups. All three groups had higher TREC values than those of the Non-Rec group (Fig. 2C).

DISCUSSION

HAART has dramatically modified the course of HIV infection,^{6,19,42} causing a drastic fall in the VL of HIV-1-infected patients, enabling recovery of the immune system and leading to a reduction of opportunistic infections and better clinical outcome.^{42,43} Nevertheless, a complete recovery in the number, and particularly in the function, of CD4⁺ T cells is not usually achieved.^{12,44} Here, we have found that those children who responded to long-term HAART by increasing the percentage of

TABLE 5. DIFFERENCES IN ACTIVATED CD4⁺ AND CD8⁺ T CELL SUBSETS AMONG GROUPS OF CHILDREN STUDIED^a

| | Control | LTA | Non-Rec | Rec |
|--|------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T cells (%) | | | | |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ | 1.5 ± 0.2 | 4.6 ± 1.4 ^b | 28.2 ± 5.8 ^{b,c} | 11.7 ± 1.8 ^{b-d} |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻ | 2.5 ± 0.3 | 2.6 ± 0.7 | 11.9 ± 2.5 ^{b,c} | 5.7 ± 0.8 ^b |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁻ CD38 ⁺ | 60.8 ± 2.6 | 73.4 ± 2.7 ^b | 43.1 ± 6.2 ^c | 65.3 ± 3.4 ^d |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ | 3.9 ± 0.4 | 7.1 ± 2 | 40.1 ± 6.5 ^{b,c} | 17.4 ± 2.4 ^{b,d} |
| CD4 ⁺ CD38 ⁺ | 62.3 ± 2.7 | 77.9 ± 2 ^b | 71.3 ± 5.3 ^b | 77 ± 2.8 ^b |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ | 6.1 ± 1 | 20.3 ± 4.6 ^b | 46.7 ± 4.8 ^{b,c} | 15.3 ± 2 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻ | 6.9 ± 1.1 | 10.1 ± 2 | 10.4 ± 2.9 | 11.2 ± 1.2 ^b |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁻ CD38 ⁺ | 46.2 ± 3.1 | 39.2 ± 4.5 | 28.3 ± 3 ^b | 38.4 ± 3.5 |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ | 12.9 ± 1.9 | 30.4 ± 6 ^b | 57.1 ± 4.3 ^{b,c} | 26.5 ± 2.2 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ CD38 ⁺ | 52.3 ± 3.3 | 59.4 ± 3.9 | 75 ± 5.4 ^{b,c} | 53.7 ± 4.1 ^d |
| T cells (cells/mm ³) | | | | |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ | 15 ± 3 | 39 ± 11 ^b | 36 ± 8 | 97 ± 17 ^{b-d} |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻ | 23 ± 3 | 22 ± 5 | 14 ± 3 ^b | 48 ± 7 ^{b-d} |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁻ CD38 ⁺ | 598 ± 86 | 677 ± 77 | 67 ± 15 ^{b,c} | 541 ± 39 ^d |
| CD4 ⁺ HLA-DR ⁺ | 38 ± 6 | 61 ± 15 | 50 ± 9 | 145 ± 22 ^{b-d} |
| CD4 ⁺ CD38 ⁺ | 613 ± 89 | 716 ± 75 | 103 ± 16 ^{b,c} | 638 ± 41 ^d |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁺ | 34 ± 9 | 200 ± 60 ^b | 546 ± 127 ^{b,c} | 207 ± 53 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ CD38 ⁻ | 37 ± 8 | 96 ± 24 ^b | 156 ± 73 | 145 ± 34 ^b |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁻ CD38 ⁺ | 226 ± 33 | 369 ± 68 | 293 ± 61 | 464 ± 84 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ HLA-DR ⁺ | 71 ± 16 | 297 ± 81 ^b | 703 ± 167 ^b | 352 ± 79 ^b |
| CD8 ⁺ CD38 ⁺ | 260 ± 40 | 569 ± 88 ^b | 839 ± 177 ^b | 671 ± 134 ^b |

^aValues represent means ± SEM (min; max). Mann-Whitney *U* test was used to compare between groups.

^b*p* < 0.05, compared with control group by Mann-Whitney *U* test.

^c*p* < 0.05, compared with LTA group.

^d*p* < 0.05, compared with Non-Rec group.

TABLE 6. DIFFERENCES IN EFFECTOR CD8⁺ T CELL SUBSETS AMONG GROUPS OF CHILDREN STUDIED^a

| | Control | LTA | Non-Rec | Rec |
|---|------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T cells (%) | | | | |
| CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺ | 2.6 ± 0.3 | 4.8 ± 1.5 | 5.3 ± 1.0 ^b | 4.5 ± 0.8 |
| CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺ | 13.3 ± 2.1 | 17 ± 3.2 | 36.4 ± 4.1 ^{b,c} | 20.6 ± 5.0 ^d |
| CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁻ | 9.3 ± 1.4 | 15.1 ± 2.2 ^b | 27.4 ± 1.9 ^{b,c} | 18.5 ± 2.1 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ CD57 ⁺ | 15.9 ± 2.3 | 21.8 ± 4.1 | 41.7 ± 3.7 ^{b,c} | 25.1 ± 5.2 ^d |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁻ | 17.4 ± 2.1 | 17.3 ± 2.3 | 25 ± 3.2 | 24.7 ± 3.7 |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ | 12.8 ± 1.5 | 18.1 ± 2.0 | 40.1 ± 4.4 ^{b,c} | 20 ± 2.1 ^{b,d} |
| CD8 ⁺ CD28 ⁻ | 22.6 ± 2.4 | 32.1 ± 4.3 | 63.8 ± 3.5 ^{b,c} | 39.1 ± 5.8 ^d |
| T cells (cells/mm ³) | | | | |
| CD8 ⁺ CD28 ⁺ CD57 ⁺ | 14 ± 3 | 45 ± 15 | 59 ± 17 ^b | 53 ± 11 ^b |
| CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁺ | 72 ± 18 | 152 ± 31 ^b | 500 ± 134 ^b | 372 ± 138 |
| CD8 ⁺ CD28 ⁻ CD57 ⁻ | 49 ± 11 | 142 ± 23 ^b | 298 ± 56 ^b | 271 ± 73 ^b |
| CD8 ⁺ CD57 ⁺ | 85 ± 20 | 196 ± 42 ^b | 559 ± 144 ^b | 425 ± 147 |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁻ | 87 ± 17 | 156 ± 22 ^b | 251 ± 44 ^b | 388 ± 108 ^b |
| CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ | 58 ± 8 | 175 ± 30 ^b | 566 ± 169 ^b | 283 ± 73 ^b |
| CD8 ⁺ CD28 ⁻ | 120 ± 27 | 294 ± 44 ^b | 798 ± 181 ^b | 643 ± 207 ^b |

^aValues represent means ± SEM (min; max). Mann-Whitney *U* test was used to compare between groups studied.

^b*p* < 0.05, compared with control group by Mann-Whitney *U* test.

^c*p* < 0.05, compared with LTA group.

^d*p* < 0.05, compared with Non-Rec group.

CD4⁺ T cells were those with higher LPRs to mitogens, higher naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells, but lower memory and activated CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets. However, it was not possible to fully recover the LPR to TT, and IFN- γ and TNF- α production in response to PHA, further supporting an incomplete functional reconstitution of the immune system. From 24 children with a severe clinical and immunologic condition at HAART initiation, 11 (11 of 24) responded to 3 years of HAART by achieving almost complete immune recovery, practically resembling that of the LTA children by the end of the study period in quantitative as well as qualitative terms. Our data are compatible with the key role played by thymic output in immune reconstitution in children.¹⁴ The remaining 13 children did not respond to long-term HAART, which may be explained at least in part by suboptimal therapy, drug resistance, or other immunologic factors involved in the immune response against HIV-1.

LPR impairment in the context of HIV-1 infection is particularly interesting, because it is usually evident before overt CD4⁺ T lymphocyte depletion takes place and because these changes have been related to disease progression.^{2,45} Inversely, when ART is effective, LPR to mitogens return to normal values both in adults^{44,46} and in children (this article), further supporting that HIV replication itself is the leading cause. Therefore, response to HAART eliminates the differences observed between children who recovered and those who remained long-term asymptomatic in response to mitogens (PHA and PWM) and after physiological stimulation (anti-CD3 plus anti-CD28). Thus, the low LPR of the nonresponders may be ascribed to the higher numbers of memory, activated, and effector T cell subsets, subsets that are highly differentiated and with low LPR capacity.³² Interestingly, the Rec group did not recover T cell LPR to common recall antigens, which is probably the consequence of severe prior immune damage and therefore not reversible.

Th1 lymphocytes produce high levels of IFN- γ , interleukin

2 (IL-2), and TNF- α .⁴⁷ It is evident that the helper T cell type 1 (Th1) arm of the cellular immune response is impaired during the course of HIV infection.^{48,49} Indeed, we have found a decreased production of IFN- γ and TNF- α in the Rec group. They have lost effectiveness in the Th1-response to PHA when compared with HIV-infected asymptomatic children, reflecting an altered functionality of CD4⁺ T cells.⁴⁸

Interestingly, children of the Rec group, after 3 years of HAART, had similar naive CD4⁺ T cell subsets compared with the LTA and control groups, although slightly higher memory CD4⁺ T cells than in the LTA group. This may indicate that a better control of viral replication prevents naive T cells to become activated, memory and/or effector CD4⁺ T cells.⁵⁰ Moreover, activated, memory and effector CD8⁺ T cells in the Rec group remained higher than in the control group, indicating a continuous antigenic stimulus despite HAART. Inversely, lower naive CD4⁺ and CD8⁺ T cell percentages observed in the Non-Rec group could be ascribed either to preferential destruction of naive T lymphocytes infected by HIV as thymic precursors^{51,52} or to lack of generation of new cells as a consequence of thymic atrophy secondary to HIV infection.⁵³ The HIV-induced decrease in naive T lymphocytes correlated with a fall in CD4⁺ T lymphocytes,⁵⁴ whereas recovery of CD4⁺ T lymphocytes after HAART correlated with an increase in naive T cells.¹⁰ Moreover, in the two children who were studied longitudinally, the recovery of CD4⁺ T cells was clearly correlated with TREC levels, indicating that the CD4⁺ cell increase was probably due to the thymic production of new CD4⁺ T cells, in agreement with previous reports.^{55,56}

During HIV infection, the switch of naive CD4⁺CD45RO⁻ to memory CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes is probably favored by (1) the chronic stimulation of T lymphocytes by HIV antigens or by other agents, and (2) antigen-independent peripheral expansion of CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes enabled as a consequence of the HIV-1-induced thymic dysfunction.⁵³

IMMUNE RECOVERY AFTER HAART

1403

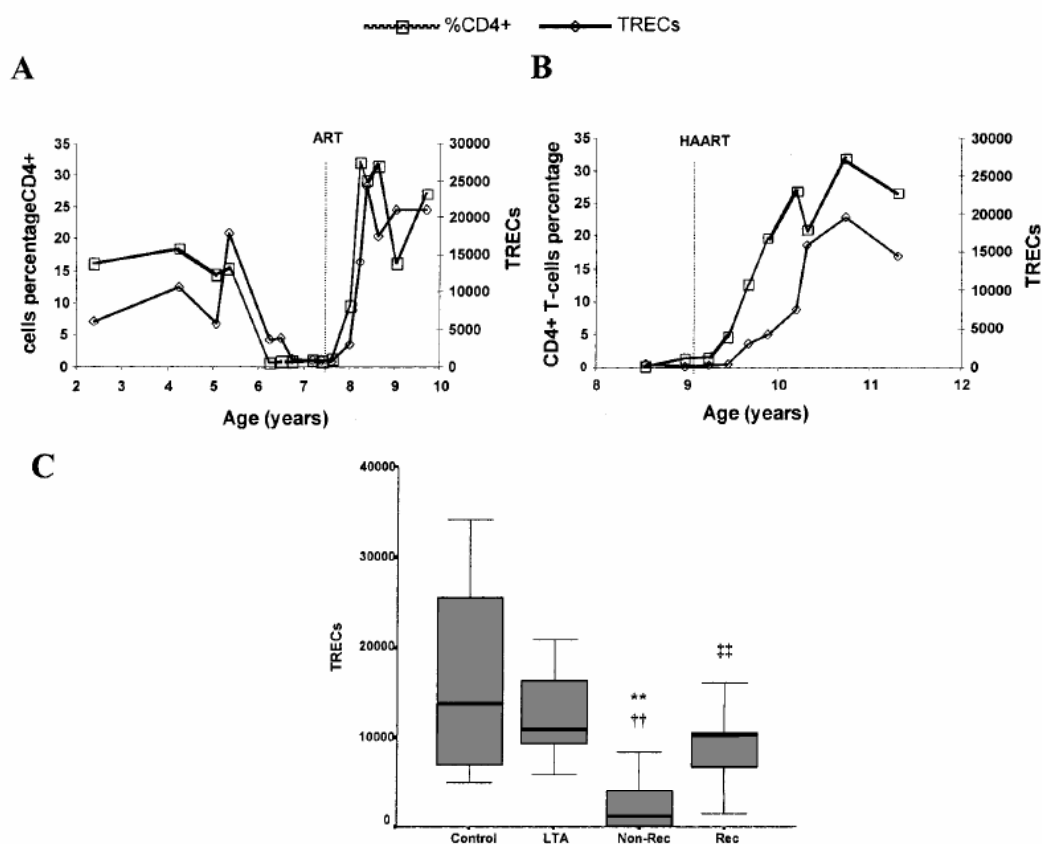


FIG. 2. Time course of values for TRECs per 10^5 PBMCs and percentages of $CD4^+$ T cells in the two children from the Rec group included in the follow-up study. The vertical lines represent initiation or change to a new antiretroviral treatment. There is a significant correlation ($p < 0.01$) between TRECs and $CD4^+$ cell percentages in children 1 and 2. Differences from control group ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$) by Mann-Whitney U test; differences from LTA group ($\dagger p < 0.05$; $\dagger\dagger p < 0.01$); differences from Non-Rec group ($\ddagger p < 0.05$; $\ddagger\ddagger p < 0.01$).

Memory $CD4^+$ T lymphocytes are productively infected by HIV⁵⁷ and undergo apoptosis induced by abnormal cellular activation,⁵⁸ leading to the fall-off of $CD4^+$ T lymphocytes. Data presented here indicate that in children in the Rec group, with a good virologic response to HAART, the absolute counts of memory $CD4^+$ T cells increased up to the values of the control and LTA groups, enabling reconstitution of the normal pool of $CD4^+$ T cells.^{9,10}

Activation of the immune system is a hallmark of HIV infection, demonstrated by the increased expression of activation markers, such as $CD38^+$ and $HLA-DR^+$ cells^{21,23} in parallel with progression of the infection. The Rec and LTA groups had higher numbers of activated $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells than did the control group, possibly because of a low level of viral replication, but significantly lower values than in the Non-Rec group. Thus, the expression of activation markers in T cells may be a useful tool for monitoring ART in children. The decrease in activated T cells is a marker of effective response to HAART, because their disappearance follows the decrease in VL induced by therapy.^{27,28} Inversely, the persistence of high numbers of

activated T cells is a marker of therapeutic failure in HIV-infected children, as reflected by the higher values for activated T cells in the Non-Rec group.⁵⁹

Given that the $CD4^+CD38^+$ T cell subset is a marker of immaturity in children,⁶⁰ this subset could be used as a marker of preserved immune status rather than activation, because its decrease is associated with immunosuppression.^{21,54} The Rec group had higher $CD4^+CD38^+$ T cell percentages than the control group, although $CD4^+CD38^+$ T cell counts remained similar to those of the control group. $CD4^+CD38^+$ T cells were lowest in the Non-Rec group, indicating altogether a recovery of the immune system in the Rec group.

Although all children were not treated for the same follow-up period, the most striking observation is that significant immune reconstitution may take place after long-standing HAART when achieving undetectable VL levels. Therefore, the different follow-up periods among our cohort of children did not alter the results presented here. However, it is well known that in children it is difficult to accomplish this goal.⁶¹

The main limitation of our study is that we do not have baseline levels for all the T lymphocyte subsets studied. Therefore, we assumed that the different values for the T lymphocyte subsets, as well as for the lymphoproliferative studies and cytokine analyses of the Rec group pre-HAART, were comparable to those of the Non-Rec group. Thus, when children of the Rec group had <15% T cell CD4⁺ or 200 CD4⁺ cells/mm³, the values of memory, naive, and activated subsets were closer to those of the Non-Rec group.

CD8⁺ T lymphocytes coexpressing CD57 are implicated in suppression of the LPR and activation of CD4⁺ T cells, being capable of indirectly suppressing HIV replication.^{62,63} HAART implemented during the chronic phase of infection has been associated with a decline in HIV-specific immunity in some cases.^{64,65} This is presumably due to the lack of ongoing antigenic stimulation needed to maintain these responses. We have observed lower preeffector (CD8⁺ CD28⁻CD57⁻, CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻) and effector (CD8⁺CD57⁺, CD8⁺CD28⁺CD57⁻) T cells in the LTA and Rec groups than in the Non-Rec group. The three groups of HIV-1-infected children showed higher values for preeffector cells (CD8⁺CD28⁻CD57⁻) than did the control group. Moreover, they were much higher in the Non-Rec group than in the LTA and Rec groups. Because in children a full and continuous suppression of viral replication is difficult to achieve, the antigenic stimulation of CD8⁺ T cells may be constant and many naive CD8⁺ T cells may continuously differentiate into memory T cells. These data may explain the lack of differences between HIV-infected groups in terms of cells that are switching to effector CD8⁺ T cells (CD8⁺CD57⁺ and CD28⁻CD57⁺).

In summary, the restoration of CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by HAART in HIV-infected children seems to be the consequence of naive cell reconstitution largely from thymic origin and decreased chronic activation of the immune system. More interestingly, we also observed in those children a recovered LPR to mitogens and recall antigens. Our data indicate that in children who have already progressed to AIDS and severe immunodeficiency but who respond to HAART, the immune system recovers up to the level of nonprogressors or even uninfected children, not only in quantitative but also in functional terms.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dolores García Alonso and Consuelo Muñoz for excellent technical assistance.

This work was supported by grants from the Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE 3008/99), Fondo de Investigación Sanitaria (00/0207), Programa Nacional de Salud (SAF 99-0022), Comunidad de Madrid, and Bristol-Myers (Grupo Bristol-Myers Squibb). Rafael Correa is supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (BEFI 99/9176).

REFERENCES

1. Fauci AS: Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: Implications for therapy. *Science* 1993;262:1011-1018.
2. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, Boswell RN, Lucey DR, Via CS, *et al.*: Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients: Independence of CD4⁺ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest* 1989;84:1892-1899.
3. Roilides E, Clerici M, DePalma L, Rubin M, Pizzo PA, and Shearer GM: Helper T-cell responses in children infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* 1991;118:724-730.
4. Roos MT, Prins M, Koot M, de Wolf F, Bakker M, Coutinho RA, *et al.*: Low T-cell responses to CD3 plus CD28 monoclonal antibodies are predictive of development of AIDS. *AIDS* 1998;12:1745-1751.
5. Mosmann TR: Cytokine patterns during the progression to AIDS. *Science* 1994;265:193-194.
6. Paella FJ Jr, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.*: Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998;338:853-860.
7. Purswani M, Johann-Liang R, Cervia J, and Noel GJ: Effect of changing antiretroviral therapy on human immunodeficiency virus viral load: Experience with fifty-four perinatally infected children. *Lancet* 1999;353:2240.
8. Rutstein RM, Feingold A, Meislich D, Word B, and Rudy B: Protease inhibitor therapy in children with perinatally acquired HIV infection. *AIDS* 1997;11:1487-1494.
9. Sleasman JW, Nelson RP, Goodenow MM, Wilfret D, Hutson A, Baseler M, *et al.*: Immunoreconstitution after ritonavir therapy in children with human immunodeficiency virus infection involves multiple lymphocyte lineages. *J Pediatr* 1999;134:597-606.
10. van Rossum AM, Niesters HG, Geelen SP, Scherpbiel HJ, Hartwig NG, Weemaes CM, *et al.*, on behalf of the Dutch Study Group for Children with HIV-1 Infections: Clinical and virologic response to combination treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in children with human immunodeficiency virus-1 infection: A multicenter study in the Netherlands. *J Pediatr* 2000;136:780-788.
11. Evans TG, Bonnez W, Soucier HR, Fitzgerald T, Gibbons DC, and Reichman RC: Highly active antiretroviral therapy results in a decrease in CD8⁺ T cell activation and preferential reconstitution of the peripheral CD4⁺ T cell population with memory rather than naive cells. *Antiviral Res* 1998;39:163-173.
12. Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A, *et al.*: Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: A composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998;4:208-214.
13. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, *et al.*: Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998;396:690-695.
14. Correa R and Muñoz-Fernández MA: Effect of HAART on thymic reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected children. *AIDS* 2002;16:1181-1183.
15. Clement LT, Yamashita N, and Martin AM: The functionally distinct subpopulations of human CD4⁺ helper/inducer T lymphocytes defined by anti-CD45R antibodies derive sequentially from a differentiation pathway that is regulated by activation-dependent post-thymic differentiation. *J Immunol* 1988;141:1464-1470.
16. Akbar AN, Terry L, Timms A, Beverley PC, and Janosy G: Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J Immunol* 1988;140:2171-2178.
17. Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Buck D, and Terstappen LW: 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;150:1105-1121.
18. Butcher EC and Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-66.
19. Resino S, Sánchez-Ramón S, Bellón JM, Correa R, Abad ML, and

IMMUNE RECOVERY AFTER HAART

1405

- Muñoz-Fernández MA: Immunological recovery after 3 years' antiretroviral therapy in HIV-1-infected children. *AIDS* 2002;16:483-486.
20. Viganò A, Vella S, Saresella M, Vanzulli A, Bricalli D, Di Fabio S, *et al.*: Early immune reconstitution after potent antiretroviral therapy in HIV-infected children correlates with the increase in thymus volume. *AIDS* 2000;14:251-261.
 21. de Martino M, Rossi ME, Azzari C, Gelli MG, Galli L, and Vierucci A: Different meaning of CD38 molecule expression on CD4⁺ and CD8⁺ cells of children perinatally infected with human immunodeficiency virus type 1 infection surviving longer than five years. *Pediatr Res* 1998;43:752-758.
 22. Schlesinger M, Peters V, Jiang JD, Roboz JP, and Bekesi JG: Increased expression of activation markers on CD8 lymphocytes in children with human immunodeficiency virus-1 infection. *Pediatr Res* 1995;38:390-396.
 23. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A, *et al.*: CD8⁺, CD38⁺ lymphocyte percent: A useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology* 1997;14:158-162.
 24. Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, and Giorgi JV: Elevated CD38 antigen expression on CD8⁺ T cells is a stronger marker for the risk of chronic HIV disease progression to AIDS and death in the Multicenter AIDS Cohort Study than CD4⁺ cell count, soluble immune activation markers, or combinations of HLA-DR and CD38 expression. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology* 1997;16:83-92.
 25. Dianzani U, Funaro A, DiFranco D, Garbarino G, Bragardo M, Redoglia V, *et al.*: Interaction between endothelium and CD4⁺ CD45RA⁺ lymphocytes: Role of the human CD38 molecule. *J Immunol* 1994;153:952-959.
 26. Wu H, Kuritzkes DR, McClernon DR, Kessler H, Connick E, Landay A, *et al.*: Characterization of viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1-infected patients treated with combination antiretroviral therapy: Relationships to host factors, cellular restoration, and virologic end points. *J Infect Dis* 1999;179:799-807.
 27. Burgisser P, Hammann C, Kaufmann D, Bättegay M, and Rutschmann OT: Expression of CD28 and CD38 by CD8⁺ T lymphocytes in HIV-1 infection correlates with markers of disease severity and changes towards normalization under treatment. The Swiss HIV Cohort Study. *Clin Exp Immunol* 1999;115:458-463.
 28. Giorgi JV, Majchrowicz MA, Johnson TD, Hultin P, Matud J, and Detels R: Immunologic effects of combined protease inhibitor and reverse transcriptase inhibitor therapy in previously treated chronic HIV-1 infection. *AIDS* 1998;12:1833-1844.
 29. Bouscarat F, Levacher-Clergeot M, Dazza MC, Strauss KW, Girard PM, Ruggeri C, *et al.*: Correlation of CD8 lymphocyte activation with cellular viremia and plasma HIV RNA levels in asymptomatic patients infected by human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996;12:17-24.
 30. Roederer M, Dubs JG, Anderson MT, Raju PA, and Herzenberg LA: CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J Clin Invest* 1995;95:2061-2066.
 31. Rabin RL, Roederer M, Maldonado Y, Petru A, and Herzenberg LA: Altered representation of naive and memory CD8 T cell subsets in HIV-infected children. *J Clin Invest* 1995;95:2054-2060.
 32. Brinckmann JE, Dobloug JH, Heger BH, Haaheim LL, Sannes M, and Egeland T: Expression of costimulatory molecule CD28 on T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: Functional and clinical correlations. *J Infect Dis* 1994;169:730-738.
 33. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, *et al.*: Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 1997;186:1407-1418.
 34. Benito JM, Zabay JM, Gil J, Bermejo M, Escudero A, Sanchez E, *et al.*: Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 T lymphocytes in asymptomatic HIV infection: changes in the expression of CD45RO, CD45RA, CD11b, CD38, HLA-DR, and CD25 antigens. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirology* 1997;14:128-135.
 35. Muñoz-Fernández MA, Obregon E, Navarro J, Borner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH, *et al.*: Relationship of virologic, immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 1996;40:597-602.
 36. Centers for Disease Control and Prevention: Guidelines for use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. *MMWR* 1998;47:RR-4.
 37. Centers for Disease Control and Prevention: Revised classification system for HIV-1 infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994;43:1-13.
 38. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, and Kagan J: Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* 1996;26:227-230.
 39. Navarro J, Resino S, Bellón JM, Abad M, Gurbindo MD, Fernandez-Cruz E, *et al.*: Association of CD8⁺ T lymphocyte subsets with the most commonly used markers to monitor HIV-1 infection in children treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:525-532.
 40. Nicholson JK, Hubbard M, and Jones BM: Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996;26:16-21.
 41. Correa R and Muñoz-Fernández MA: Viral phenotype affects the thymical production of new T-cells in HIV-1 infected children. *AIDS* 2001;15:1959-1963.
 42. Bohler T, Walcher J, Holzl-Wenig G, Geiss M, Buchholz B, Linde R, *et al.*: Early effects of antiretroviral combination therapy on activation, apoptosis and regeneration of T cells in HIV-1-infected children and adolescents. *AIDS* 1999;13:779-789.
 43. Powderly WG, Landay A, and Lederman MM: Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: The end of opportunism? *JAMA* 1998;280:72-77.
 44. Kelleher AD, Sewell WA, and Cooper DA: Effect of protease therapy on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1999;115:147-152.
 45. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, Schattenkerk JK, de Wolf F, Al BJ, *et al.*: Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4⁺ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988;82:1908-1914.
 46. Sondergaard SR, Aladdin H, Ullum H, Gerstoft J, Skinhoj P, and Pedersen BK: Immune function and phenotype before and after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;21:376-383.
 47. Clerici M and Shearer GM: A TH1 → TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993;14:107-111.
 48. Resino S, Bellón JM, Gurbindo D, and Muñoz-Fernández MA: Dysfunction in cytokine and chemokine production by T cells in vertically HIV-1 infected children. *Acta Paediatr* 2001;90:989-997.
 49. Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, Blatt S, Hendrix CW, Wynn TA, *et al.*: Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* 1993;91:759-765.
 50. Brinckmann JE: Differential responses of T cell subsets: Possible role in the immunopathogenesis of AIDS. *AIDS* 2000;14:1689-1700.
 51. Stanley SK, McCune JM, Kaneshima H, Justement JS, Sullivan M, Boone E, *et al.*: Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J Infect Dis* 1993;168:810-817.
 52. Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, Brown DA, Kosek J, McCune JM, *et al.*: HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* 1993;363:728-732.

53. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, and Hale LP: The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:529-560.
54. Resino S, Navarro J, Bellón JM, Gurbindo D, León JA, and Muñoz-Fernández MA: Naïve and memory CD4⁺ T-cells and T-cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 2001;125:266-273.
55. Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, and Luzuriaga K: Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 2000;181:1479-1482.
56. Sharland M, Watkins AM, Dalgleish AG, Cammack N, and Westby M: Immune reconstitution in HAART-treated children with AIDS: Highly active anti-retroviral therapy. *Lancet* 1998;352:577-578.
57. Spina CA, Prince HE, and Richman DD: Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* 1997;99:1774-1785.
58. Gougeon ML, Lecoq H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, *et al.*: Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: Increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 1996;156:3509-3520.
59. Vigano A, Saresella M, Rusconi S, Ferrante P, and Clerici M: Expression of CD38 on CD8 T cells predicts maintenance of high viraemia in HAART-treated HIV-1-infected children: Highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 1998;352:1905-1906.
60. Plaeger-Marshall S, Isacescu V, O'Rourke S, Bertolli J, Bryson YJ, and Stiehm ER: T cell activation in pediatric AIDS pathogenesis: Three-color immunophenotyping. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;71:27-32.
61. Resino S, Bellón JM, Sánchez-Ramón S, Gurbindo D, Ruiz-Contreras J, Leon JA, *et al.*: Impact of antiretroviral protocols on dynamics of AIDS progression markers. *Arch Dis Child* 2002;86:119-124.
62. Lieberman J, Trimble LA, Friedman RS, Lisziewicz J, Lori F, Shankar P, *et al.*: Expansion of CD57 and CD62L⁻CD45RA⁺ CD8 T lymphocytes correlates with reduced viral plasma RNA after primary HIV infection. *AIDS* 1999;13:891-899.
63. Wang EC, Lehner PJ, Graham S, and Borysiewicz LK: CD8^{high} (CD57⁺) T cells in normal, healthy individuals specifically suppress the generation of cytotoxic T lymphocytes to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines. *Eur J Immunol* 1994;24:2903-2909.
64. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Moss P, Nowak MA, Monard S, *et al.*: Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J Virol* 1999;73:797-800.
65. Markowitz M, Vesanen M, Tenner-Racz K, Cao Y, Binley JM, Talal A, *et al.*: The effect of commencing combination antiretroviral therapy soon after human immunodeficiency virus type 1 infection on viral replication and antiviral immune responses. *J Infect Dis* 1999;179:527-537.

Address reprint requests to:

M. Ángeles Muñoz-Fernández

Servicio de Inmunología

Hospital General Universitario Gregorio Marañón

c/o Doctor Esquerdo 46

28007 Madrid, Spain

E-mail: Mmunoz@cbm.uam.es

Artículo 6. Correa et al. *J. Clin. Immunol.* 23:401-406, 2003*Journal of Clinical Immunology, Vol. 23, No. 5, September 2003 (© 2003)***Increased Interleukin-7 Plasma Levels Are Associated with Recovery of CD4⁺ T Cells in HIV-Infected Children**RAFAEL CORREA,¹ SALVADOR RESINO,¹ and M. ANGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ^{1,2}*Accepted: April 5, 2003*

To assess the role of interleukin 7 (IL-7) in the thymic reconstitution of CD4⁺ T cells observed in children after successful antiretroviral therapy, a longitudinal study in five vertically HIV-1-infected children was carried out. Thymic function, IL-7 plasma levels, viral load, and T-lymphocyte subsets were determined every 2 or 3 months for about 90 months. In all the children, the drop in CD4⁺ T cells below 5–10% was associated with a marked increase in IL-7 plasma levels. The drastic decrease in viral load after treatment, led in all the cases to a recovery of CD4 to levels higher than 30%, which was associated to an increase in thymic production of T cells and followed by a decrease in IL-7 to the normal levels. We conclude that the drop in CD4 in HIV children would induce an increase of IL-7 as part of a homeostatic mechanism. IL-7 would induce the thymus to produce new T cells to recover the normal levels of CD4 when the viral load was low and so the thymic function was not inhibited. The increase in the thymic production of new T cells recovers the CD4 population, and leads to a normalization of IL-7 levels.

KEY WORDS: IL-7; CD4; TRECs; HIV; children; immune reconstitution.

INTRODUCTION

HIV infection results in a severe immunodeficiency characterized by a marked decrease in the CD4⁺ T cells. This decrease could be the consequence of two facts; a peripheral CD4⁺ T-cell depletion by the virus and an insufficient replacement of the destroyed T cells. Current treatments with HAART have been successful in substantially reducing viral load in these patients, but a complete

immunologic recovery is not usually achieved, and thus, discontinuation of antiretroviral treatment results in eventual rebound in the viral load. Therefore, one of the current challenges in the treatment of HIV lies in achieving a complete restoration of the immune responses to the virus.

After antiretroviral therapy, a substantial increase in naive CD4⁺ T cells has been reported (1–3). This fact could be explained by the redistribution or peripheral expansion of preexistent naive cells (2); by the recovery of thymic production of new T cells (4); or by reversion from memory to naive phenotype in peripheral T cells (5). Thus, the identification of the source of naive cells is an important issue in immune recovery since a redistribution of proliferation of the preexistent cells only increases the number of cells from the clones that have survived the infection. In contrast, the thymic production of new T cells can lead to the recovery of the entire repertoire of specificities, some of them lost with the infection, including the specific HIV clones, that have been shown to be preferentially depleted by the virus (6).

Along these lines, the thymus has demonstrated to play a key role in the reconstitution of the immune system in HIV-infected patients, mainly in children (4, 7). Thus, treatments that enhance this thymic function, could lead to the recuperation of the immune responses against HIV and other opportunistic pathogens. The observation that, after suppression of viral load, there is a marked increase in the thymic production of new T cells to recover the depleted CD4⁺ population (4) supports the hypothesis that a compensatory feedback loop might exist, which would lead to an increase in T-cell production. This homeostatic mechanism might be regulated by production of factors that stimulates the differentiation, survival and/or, expansion of T cells, as it has been described for other hematopoietic lineages (8, 9). A similar feedback loop might connect the peripheral lymphoid compartment with bone marrow or thymus, regulating the homeostasis in the lymphoid lineage (10).

¹Department of Immunology, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón," Madrid, Spain.

²To whom correspondence should be addressed at Servicio de Inmunología, HGU Gregorio Marañón, C/Dr. Esquerdo, 46 28007 Madrid, Spain; e-mail: mmunoz@cbm.uam.es.

Among the cytokines and hormones identified as possible regulators of thymopoiesis, interleukin 7 (IL-7) may play an essential role. IL-7 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 (11, 12). In murine studies, IL-7 has shown to be essential in the maintenance of the T-cell population (13, 14), and enhances T-cell reconstitution in myeloablated mice (15, 16).

In HIV patients, several studies have reported that plasma IL-7 levels are increased and are inversely correlated with CD4 (10, 17–19). Therefore, the increase of IL-7 has been proposed to be a homeostatic response to T-cell depletion (10). However, in none of these reports, an effect of IL-7 increasing the production of T cells has been demonstrated.

Then, we have analyzed the evolution of IL-7 plasma levels and thymic function, measured as TCR rearrangement excision circles (TREC_s) (20), in children that, at difference of the adults, maintain the thymic functionality. We observe for the first time, that the increased levels of IL-7 in response to low levels of CD4⁺ T cells are associated to a marked increase in the thymic production of new T cells. Strongly suggesting the involvement of IL-7 in the recover of the depleted CD4 population in these HIV patients.

PATIENTS AND METHODS

Patients

A longitudinal study in five HIV-infected children born to HIV-infected mothers was carried out at the Department of Immunopediatrics of the General University Hospital "Gregorio Marañón" in Madrid, Spain, between February 1995 and April 2002. Median age was 7.0 years (range, 0.9–12.5 years) and none of the children were breastfed. All infected children were treated with combination therapy consisting in combinations of two nucleoside reverse-transcriptase inhibitors or HAART with the addition of a nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitor and/or a protease inhibitor. The treatment was prescribed by the treating physician according to CDCP guidelines (21) and upon obtaining written informed consent from parents or legal guardians. The antiretroviral regimens were chosen on the basis of prior treatment history and were altered, as necessary, in response to incomplete virus suppression or undesirable side effects. The study was conducted according to the declaration of Helsinki, and approved by the Ethical Committee of the Hospital. The measurements of viral load (VL), percentages of CD4⁺, and CD8⁺ lymphocytes in the children were performed every 2–3 months. CD4 cell values are expressed as percentage, because unlike

the absolute number of CD4 T cells, the percentage do not change according to age (22), and is considered a best progression marker of the infection in children (23).

Viral Load (VL) and T-Cell Subsets

VL was measured in 200 μ L plasma using a quantitative reverse polymerase chain reaction (PCR) assay (Amplicor Monitor, Roche Diagnostics System), with a sensitivity of 400 RNA copies/mL. T-lymphocyte subsets in peripheral blood were quantified by direct immunofluorescence using monoclonal antibodies of the T series and flow cytometry (FACScan, Becton-Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose CA) as previously described (24).

Measurement of Thymic Function

Thymic production of new T cells was evaluated quantifying TREC_s a known marker of the thymic function (20). TREC_s values were determined since 2–3 months in PBMCs by real-time quantitative PCR in a LightCycler system (Roche Molecular Biochemicals). A standard curve was made using a plasmid that includes a fragment of 375 pair of bases of the TREC_s sequence supplied by Douek *et al.* (20). Samples were analyzed in duplicates or triplicates, which never varied by more than 10% from each other, and the result was averaged. A β -globin control PCR was performed to verify that all the samples had the same DNA content. All samples from each child were measured in the same assay to avoid interassay variations.

Quantitative IL-7 Assay

Nonheparinized plasma aliquots were analyzed according to the manufactures' instructions using a high sensitivity immunoassay which detects both free IL-7 and IL-7 bound to carrier proteins or soluble IL-7 receptors (Quantikine HS human IL-7 kit; R & D Systems, Abingdon, UK).

Statistical Analysis

The correlation between variables was determined using the Pearson's correlation coefficient, which describes the linear relationship between two variables. Moreover, the correlation between variables was also analyzed a partial correlation coefficient, which describes the linear relationship between two variables while controlling the effects of age.

RESULTS

To address the possible homeostatic role of IL-7 on the recovery of CD4 cells during HIV-1-infection, we

performed a follow-up study in infected children, since they maintain a functional thymus, and so they have a better capacity to produce T cells than adults. We compared the evolution of IL-7 plasma levels, TRECs, CD4, and CD8 cells percentage and VL in five infected children that had a marked increase in the CD4 population after successful antiretroviral therapy. In all the cases the follow-up lasted nearly up to 100 months, and the different variables were measured each 2 or 3 months.

In all the children, the drop of CD4 below 5–10%, was associated to a marked increase in the IL-7 plasma levels (Fig. 1), reaching in some cases values up to 50 pg/mL. The suppression or drastic decrease in VL after successful treatment, led in all the cases to a marked recover of the CD4 cells to levels higher than 30%. This increase in CD4 was concomitant with the increase in TRECs levels, and was followed by a decrease in IL-7 to the levels present previously to the drop of CD4.

CD4 percentages were inversely correlated with VL in children 1, 2, and 5 ($p < 0.01$), and in all the five cases were inversely correlated with IL-7 levels ($p < 0.001$ for children 1 and 2; $p < 0.01$ for children 3, 4, and 5). There was a marked correlation between TRECs and %CD4 ($p < 0.001$ for children 1, 2, 3, and 5; $p < 0.01$ for child 4). When the age was included as a covariant, in all the cases the correlation was equally significant. TRECs values were only inversely correlated with IL-7 in children 1 and 2 ($p < 0.01$), and they did not correlate with VL. When CD8 percentages were analyzed (data not shown), no correlation with IL-7 was observed in all the five cases, and they were inversely correlated with TRECs only in child 4 ($p < 0.05$).

DISCUSSION

Increased levels of IL-7 have been proposed as partly responsible for the homeostatic response to the T-cell depletion associated with HIV-infection (10, 17–19). However, in all these studies no effect of these increase of IL-7 in the recover of T cells has been observed, and so, this hypothesis could not be demonstrated. IL-7 has been shown to enhance thymopoiesis (25, 26). However, taking into account that in adults the thymic function is greatly diminished and besides, HIV-infection inhibits this thymic function (20, 27), it is unlikely that the thymus of HIV-infected adults responds to IL-7 with an increase in the production of new T cells. In fact, in adults despite successful antiretroviral treatment and low VL, there is not a recover of naïve CD4⁺ T cells and IL-7 levels continue to be elevated (19).

To address the role of IL-7 in CD4 recovery we analyzed IL-7 levels in children younger than 5 years, who have not

suffered the thymic involution, and have been shown to be capable of reconstituting the depleted CD4 population through thymic production of new T cells (4). In agreement with other studies in adults (10, 17–19), our results show that CD4 levels are inversely correlated with IL-7 plasma levels. In all the five cases studied, when the CD4 percentage dropped below 5–10% there was a marked increase in IL-7, that probably reflects an homeostatic mechanism trying to recover the depleted cells. The IL-7 plasma levels in these HIV-infected children were much higher than those detected both in healthy children and in exposed to HIV but noninfected children (28). As proposed by Napolitano *et al.* (10), the drop in the circulating T cells would induce to dendritic-like cells residing within peripheral lymphoid organs to produce IL-7. IL-7 could then stimulate *de novo* T-cell production in the thymus, where IL-7 has demonstrated to play an essential role in the intrathymic CD4 and CD8 precursor development, and in the expansion of positively selected thymocytes (29).

However, our results show that while a high VL is present, the levels of IL-7 are maintained high but no effect in the production of T cells was observed. This fact is probably due either to the inhibitory effect of HIV on the thymic function (30) and the fact that IL-7 could augment the HIV infection of thymocytes (11), avoiding the production of T cells in response to the increased levels of IL-7. As previously described (4), a suppression or a marked decrease in VL is necessary to allow the thymus recover the CD4 population in the 5 children analyzed. Moreover, IL-7 plasma levels drop and return to the basal levels as the CD4 increases, probably due to the detection of normal CD4 values by the mentioned homeostatic mechanism. Thus, IL-7 would be regulated by peripheral T-cells number and decreases when CD4 increase, independently if this CD4 increase is thymus-mediated or because of peripheral expansion. This would agree with other lymphopenic conditions (*i.e.*, severe combined immunodeficiency syndrome, acute lymphocytic leukaemia, chemotherapy-induced lymphopenia) where elevated IL-7 levels are present and when lymphopenia resolves, a normalization of IL-7 levels occurs (16, 31). Taken together, it is unlikely that the increased IL-7 levels are secondary to HIV-related processes other than CD4 lymphopenia, as opportunistic infections or cytokine dysregulation (10).

We have observed that the increase in CD4 is concomitant with TRECs levels, indicating that the main source of these CD4 is the thymic production of those cells, and not a redistribution or peripheral expansion. This increased production could be due to the stimulatory effect on thymus of the increased IL-7 levels and the absence of the inhibitory effect of high VL. This fact is supported by a recent study that demonstrates that exogenous IL-7 *in vitro*

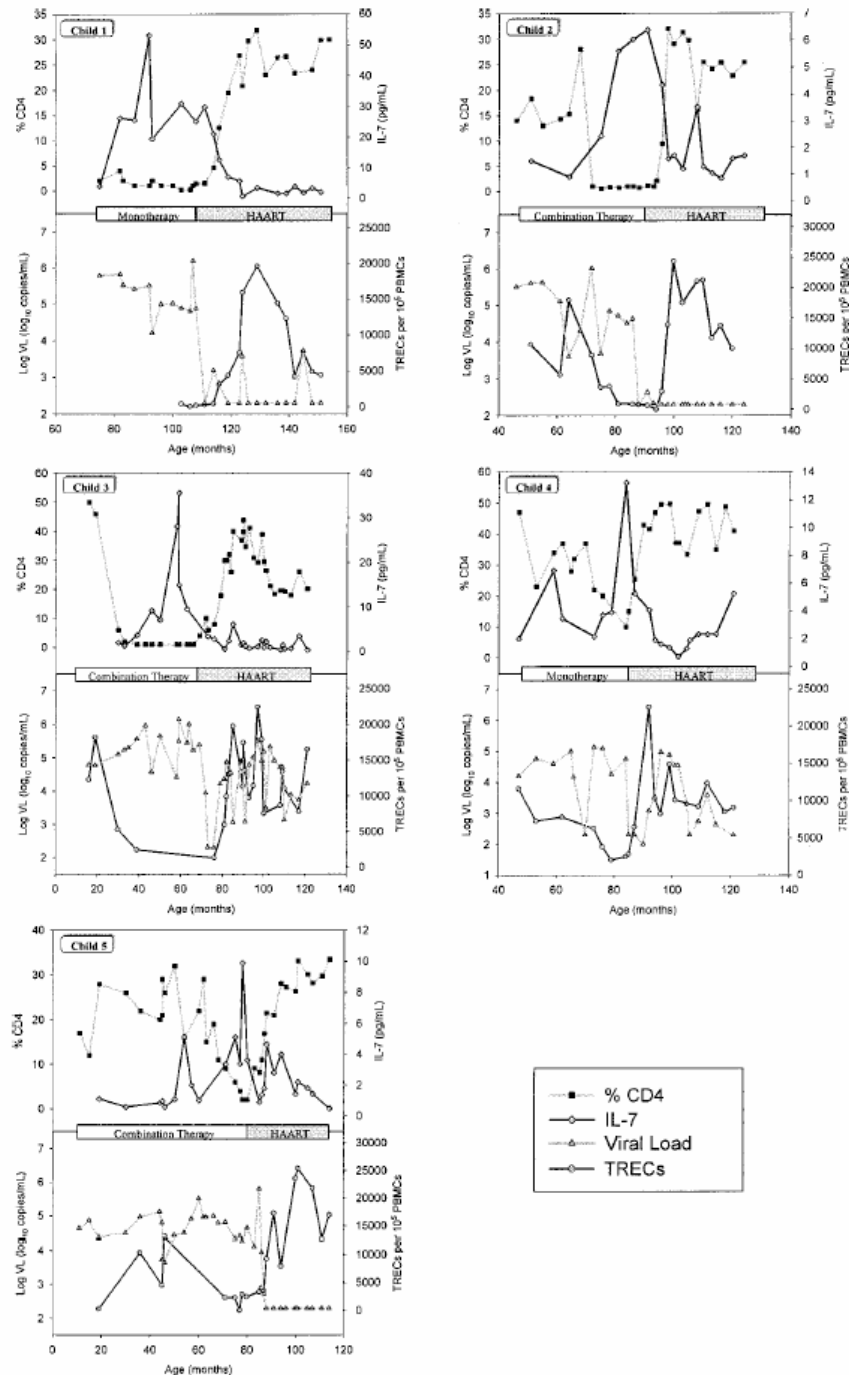


Fig. 1. Evolution of VL, CD4⁺ T-cells percentage, IL-7 plasma levels and TRECs per 10⁵ PBMCs. Variables were determined in 5 HIV-1-infected children on combination therapy and HAART. IL-7 correlates inversely with CD4. After a drastic drop in VL, there was a marked increase in CD4 concomitantly with an increase in TRECs, and IL-7 plasma levels return to basal levels.

and *in vivo* increases the thymic function measured as TREC frequency in foetal and infant thymus (32).

We found no correlation between IL-7 and CD8 cells, supporting the fact that the drop in CD4 levels would be responsible of these changes in IL-7. Moreover, there is no correlation between CD8 and TRECs, indicating that thymus would be specifically producing to restore the depleted CD4 population and not CD8 cells since this is not necessary.

Besides, the beneficial effects of IL-7 could not be only in the thymic function. IL-7 unlike other cytokines, also increases thymic-independent T-cell regeneration (31, 33). Moreover, IL-7 play an important role in the survival of naïve T cells, especially of naïve CD4⁺ T cells (34). Thus, it is probably that IL-7 and not other cytokines, will be the mainly responsibly of the observed recover in the CD4 population.

Our results strongly support for the first time that the proposed homeostatic role of IL-7 is effective. Following suppression of HIV replication in children, the high IL-7 plasma levels would induce the thymic production of CD4 cells. This subsequently leads to a decrease in IL-7 levels due either to downregulation of its production, or to binding to the higher number of available receptors for IL-7 within the increased number of cells.

Administration of IL-7 has been proposed as a way of restoring the immune response in HIV patients. The administration of IL-7 has been demonstrated to reconstitute T lymphocytes in mouse after allogenic bone marrow transplantation (31, 35) and restore immunity in athymic T-cell-depleted hosts (33), but there are not experiences in this regard in humans. Our results suggest a possible beneficial effect of IL-7 administration in children with low CD4, in which the thymic function is conserved. However, the possible effect of IL-7 accelerating HIV-infection (10) and augmenting naïve T-cell susceptibility to HIV (36), and the absence of beneficial effects observed in presence of high VL, point-out the importance of maintain low or undetectable VL. In the cases with low VL but low CD4, the administration of IL-7 would not produce these possible harmful effects and could restore the depleted CD4 population.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Professor Giuseppe Pantaleo for critical reading and comments, Daniel C. Douek for supplying us the plasmid for the standard curve, and Dolores Gurbindo, M.D. for the clinical follow-up of the children. This work was supported by "Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España"

(FIPSE 36365/02), "Programa Nacional de Salud" (SAF 99-0022), "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (FIS 00/0207), and Comunidad de Madrid and by the "Red Temática Cooperativa de investigación en SIDA" (RIS G03/173) del FIS. Rafael Correa is supported by a grant of "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (BEFI 99/9176). Salvador Resino is supported by a grant of Comunidad de Madrid.

REFERENCES

1. Autran B, Carcelain G, Li TS, Blanc C, Mathez D, Tubiana R, Katlama C, Debre P, Leibowitch J: Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4⁺ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease [see comments]. *Science* 277(5322):112, 1997
2. Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, Roos MT, de Wolf F, Hill A, Leonard JM, Danner SA, Miedema F, Schellekens PT: Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: A composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 4(2):208, 1998
3. Gibb DM, Newberry A, Klein N, de Rossi A, Grosch-Woerner I, Babiker A: Immune repopulation after HAART in previously untreated HIV-1-infected children. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) Steering Committee. *Lancet* 355(9212):1331, 2000
4. Correa R, Munoz-Fernandez A: Effects of highly active antiretroviral therapy on thymical reconstitution of CD4 T lymphocytes in vertically HIV-infected children. *Aids* 16(8):1181, 2002
5. McLean AR, Michie CA: In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9):3707, 1995
6. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price DA, Connors M, Koup RA: HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* 417(6884):95, 2002
7. Correa R, Munoz-Fernandez MA: Viral phenotype affects the thymic production of new T cells in HIV-1-infected children. *Aids* 15(15):1959, 2001
8. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL: Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 88(5):1576, 1996
9. Kato T, Matsumoto A, Ogami K, Tahara T, Morita H, Miyazaki H: Native thrombopoietin: Structure and function. *Stem Cells* 16(Suppl 2):11, 1998
10. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, Herndier BG, Andersson J, McCune JM: Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: Implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 7(1):73, 2001
11. Chene L, Nugeyre MT, Guillemard E, Mouliau N, Barre-Sinoussi F, Israel N: 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* 73(9):7533, 1999
12. McCune JM, Loftus R, Schmidt DK, Carroll P, Webster D, Swor-Yim LB, Francis IR, Gross BH, Grant RM: High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection [see comments]. *J Clin Invest* 101(11):2301, 1998

13. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, Park LS, Ziegler SF, Williams DE, Ware CB, Meyer JD, Davison BL: Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 180:1955–1960, 1994
14. von Freeden-Jeffrey U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R: Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181(4):1519, 1995
15. Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY: Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol* 146(5):1547, 1991
16. Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K: Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: Relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant* 23(8):783, 1999
17. Mastroianni CM, Forcina G, d'Ettore G, Lichtner M, Mengoni F, D'Agostino C, Vullo V: Circulating levels of interleukin-7 in antiretroviral-naïve and highly active antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2(2):108, 2001
18. Llano A, Barretina J, Gutierrez A, Blanco J, Cabrera C, Clotet B, Este JA: 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* 75(21):10319, 2001
19. Darcissac EC, Vidal V, De La Tribonniere X, Mouton Y, Bahr GM: Variations in serum IL-7 and 90K/Mac-2 binding protein (Mac-2 BP) levels analyzed in cohorts of HIV-1 patients and correlated with clinical changes following antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 126(2):287, 2001
20. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA: Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396(6712):690, 1998
21. Center for Diseases Control Prevention (CDCP): Guidelines for use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. *MMWR* 47:RR, 1998
22. Center for Diseases Control Prevention (CDCP): Revised classification system for HIV-1 infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 43:1, 1994
23. de Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, de Groot R, Hop WC, Boerma GJ, Lotgering FK, van Dongen JJ: Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res* 47(4, Pt 1):528, 2000
24. Muñoz-Fernández MA, Obregon E, Navarro J, Borner C, Gurbindo MD, Sampelayo TH, Fernández-Cruz E: Relationship of virologic, immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 40:597–602, 1996
25. Akashi K, Kondo M, von Freeden-Jeffrey U, Murray R, Weissman IL: Bcl-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 89(7):1033, 1997
26. Pallard C, Stegmann AP, van Kleffens T, Smart F, Venkitaraman A, Spits H: Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity* 10(5):525, 1999
27. Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, Brown DA, Kosek J, McCune JM, Kaneshima H: HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* 363(6431):728, 1993
28. Clerici M, Saresella M, Colombo F, Fossati S, Sala N, Bricalli D, Villa ML, Ferrante P, Dally L, Vigano A: T-lymphocyte maturation abnormalities in uninfected newborns and children with vertical exposure to HIV. *Blood* 96(12):3866, 2000
29. Hare KJ, Jenkinson EJ, Anderson G: An essential role for the IL-7 receptor during intrathymic expansion of the positively selected neonatal T cell repertoire. *J Immunol* 165(5):2410, 2000
30. Correa R, Muñoz-Fernández MA: Production of new T cells by thymus in children: Effect of HIV infection and antiretroviral therapy. *Pediatr Res* 52(2):207, 2002
31. Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE: IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 97(5):1491, 2001
32. Okamoto Y, Douek DC, McFarland RD, Koup RA: Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood* 99(8):2851, 2002
33. Fry TJ, Christensen BL, Komschlies KL, Gress RE, Mackall CL: Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood* 97(6):1525, 2001
34. Vivien L, Benoist C, Mathis D: T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 13(6):763, 2001
35. Alpdogan O, Schmaltz C, Muriglan SJ, Kappel BJ, Perales MA, Rotolo JA, Halm JA, Rich BE, van den Brink MR: Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. *Blood* 98(7):2256, 2001
36. Steffens CM, Managlia EZ, Landay A, Al-Harthi L: Interleukin-7-treated naïve T cells can be productively infected by T-cell-adapted and primary isolates of human immunodeficiency virus 1. *Blood* 99(9):3310, 2002

6. Discusión

La infección por el VIH se caracteriza por un deterioro progresivo de la función y del número de linfocitos T CD4+ como consecuencia de la replicación viral. Sin intervención, este deterioro del sistema inmune conduce al desarrollo de la enfermedad del sida que deja a las personas infectadas expuestas a contraer infecciones oportunistas o neoplasias [268].

La aparición de las terapias antirretrovirales de alta eficacia o HAART a mediados de los años 90 ha modificado drásticamente el curso de la infección disminuyendo de forma marcada la mortalidad y morbilidad tanto en adultos [269, 270] como en niños [271]. Tras la instauración de estos tratamientos se produce una caída marcada y sostenida de la replicación viral que hace disminuir el número de linfocitos T CD4+ que se infectan conduciendo a un incremento de linfocitos T CD4+ tanto vírgenes como memoria. Este incremento en la población CD4 permite recuperar algunas respuestas inmunes frente a patógenos oportunistas [217, 272, 273] disminuyendo la incidencia de infecciones oportunistas [269, 274, 275].

Aproximadamente, el 98% de los linfocitos presentes en el organismo se localizan en los tejidos linfoides, donde la replicación activa del VIH conduce a un estado crónico de inflamación y a un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión [276]. Tras la supresión de la replicación viral como consecuencia del tratamiento, se da un incremento en el recuento periférico de linfocitos T CD4+ en dos fases [277]. En la fase inicial de 8-12 semanas, los linfocitos que se encontraban retenidos en los sitios de inflamación en los tejidos linfoides son redistribuidos, conduciendo a un aumento en sangre periférica de la mayoría de poblaciones linfocitarias, incluyendo los linfocitos T CD4+. Las células CD4 que se ven incrementadas en esta primera fase son principalmente las de fenotipo CD45RO+, que corresponde a células memoria [217]. En la segunda fase, el incremento de linfocitos T CD4+ continúa pero es más lento que el observado en la primera fase y comprende principalmente células de fenotipo CD45RA+62L+, correspondiente a células vírgenes [217].

Sin embargo, a pesar de la prolongada supresión de la CV y el lento pero continuo incremento de la población CD4, muchos de los pacientes no alcanzan valores normales de linfocitos T CD4+. Además, no se recuperan las respuestas específicas por parte de las células T frente al VIH, por lo que no se consigue erradicar el virus ni alcanzar un estado de no progresión a largo plazo, ni permite interrumpir el TAR. Incluso se ha observado

que, dados los bajos valores de estimulación antigénica por la caída de viremia, tras la terapia HAART se da una disminución de la respuesta CTL específica frente al VIH [278].

El aumento de linfocitos T CD4⁺ observado tras la instauración de TAR puede tener un origen diverso: puede deberse a un aumento en la producción tímica de nuevos linfocitos T, pero también puede darse por una redistribución de células retenidas en los órganos linfoides, o a una expansión periférica de las células pre-existentes [218], e incluso por una reversión del fenotipo de células memoria a células vírgenes [221]. El origen de estas células va a ser clave en el proceso de reconstitución o recuperación del sistema inmunológico, ya que una redistribución o expansión periférica sólo aumentará el número de células de los clones que han sobrevivido a la infección. Teniendo en cuenta que los linfocitos T CD4⁺ VIH-específicas son preferentemente deplecionadas [222] y que por tanto estos clones específicos son los más susceptibles a desaparecer, la redistribución o expansión periférica no permitirían la recuperación de estos clones y limitaría el repertorio de células T a las células memoria que hayan sobrevivido a la infección, reduciendo la capacidad para responder a nuevos antígenos [223-225]. Sin embargo, la producción tímica de nuevos linfocitos T sí permitiría recuperar el repertorio de especificidades incluyendo las células específicas frente al VIH.

Por tanto, el deterioro en la población de linfocitos T CD4⁺ no sería debido únicamente al efecto directo del VIH destruyendo dichas células, sino también a otros efectos indirectos que conducen a una inadecuada recuperación de las células perdidas por la infección. El VIH ha demostrado ser capaz de infectar y destruir timocitos [254] que unido a la involución tímica asociada a la edad [206, 279, 280] compromete en gran medida la capacidad por parte del timo de generar nuevos linfocitos T, especialmente en individuos adultos infectados. Por tanto, el origen del incremento de CD4 en estos individuos sería principalmente por fenómenos de redistribución y expansión periférica [281]. Esto explicaría el hecho de que pacientes tratados con HAART, a pesar de recuperar niveles normales de linfocitos T CD4⁺ presentan poca capacidad de respuesta frente a antígenos de recuerdo en comparación con individuos no infectados [282]. Se ha comprobado además, que los valores de células CD4 previos al inicio del tratamiento determinan la recuperación de las respuestas inmunológicas [220, 283] y que cuanto antes se instaura la TAR, más probabilidad existe de conservar respuestas VIH-específicas [284-286]. De esta manera, los pacientes que presentaban previamente al tratamiento recuentos de CD4 inferiores a 500 células/mm³ no recuperaban respuestas VIH-específicas, mientras

que los pacientes con recuentos superiores a 500 células/mm³ tras la TAR conseguían recuperar respuestas específicas frente a p24 [283, 287]. Esto confirmaría que un repertorio de linfocitos T CD4+ mermado por la infección, como acontece en estadios avanzados de la enfermedad con bajos recuentos de CD4, tiene pocas probabilidades de regenerarse tras la terapia a pesar de la recuperación en el recuento de CD4.

Estos datos hacen pensar que el timo puede jugar un papel clave en la reconstitución inmune y en el posible control de la infección por el propio sistema inmune de los individuos infectados. El hallazgo de que, contrariamente a lo que se pensaba, el timo en el adulto conserva parte de su capacidad de producir nuevos linfocitos T [210, 288, 289] abre nuevas esperanzas a una posible reconstitución tímica del sistema inmune. La combinación de las terapias antirretrovirales con estrategias dirigidas a revertir la involución tímica asociada a la edad o a estimular la timopoiesis, o incluso el trasplante de tejido tímico, podrían ser la mejor vía par conseguir la reconstitución inmune.

Por todo ello, el estudio de la función tímica en la infección por el VIH ha adquirido un creciente interés en los últimos años. Sin embargo, la mayoría de trabajos han sido realizados en adultos infectados y muestran resultados en ocasiones contradictorios que no alcanzan a resolver la cuestión del papel que juega la función tímica en la infección. A pesar de que el timo haya mostrado seguir siendo funcional a edades de 40-50 años [280, 288, 289] la producción de nuevos linfocitos T es mínima comparada con la existente en la infancia, (unas 50 veces inferior [205]) y no está claro si esta pequeña producción tiene alguna repercusión o beneficio en la recuperación de las respuestas inmunes. Es por ello que sólo en niños sería posible elucidar la repercusión que tendría una adecuada función tímica, y si las estrategias encaminadas a estimular dicha función aportarían o no algún beneficio en el tratamiento y control de la infección.

El timo es capaz de generar durante el periodo fetal todo el repertorio de linfocitos T específicos a partir de las células progenitoras provenientes de la médula ósea, lo que supone cerca de 10⁸ clones o especificidades distintas. Además, mientras los niños han demostrado recuperar rápidamente la población de linfocitos T CD4+ tras recibir quimioterapias citotóxicas, esta recuperación es incompleta y mucho más lenta en individuos mayores de 20 años [223, 290]. Estos datos indican que el timo en el niño tendría la capacidad potencial de regenerar el repertorio de linfocitos T, recuperando completamente un sistema inmune que ha demostrado responder eficazmente a la infección por el VIH en las primeras etapas de la infección primaria [48-51].

6.1 Función Tímica en la Infección Pediátrica por el VIH.

En primer lugar se determinó como se ve afectada la función tímica por la infección por el VIH en niños, ya que existían evidencias de que el VIH podría ejercer un efecto inhibitorio sobre dicha función [42, 43, 210, 254]. Los resultados muestran claramente que la producción tímica, representada como valores de TRECs, es significativamente inferior en niños infectados verticalmente por el VIH que en niños no infectados de la misma edad (**Artículo 1. Figure 1** (pg 90), Figura 14). Algunos autores asocian los valores inferiores de TRECs observados en individuos infectados a un efecto de dilución de TRECs al aumentar la expansión periférica [291], e insisten en la importancia de una cuidadosa interpretación de los resultados obtenidos por este método [292]. Efectivamente, en individuos infectados una expansión periférica de linfocitos T CD8+ memoria o efectores (células que no presentan TRECs) por la presencia del virus, produciría una dilución de las células TRECs positivas y por tanto una disminución en los valores de TRECs en PBMCs que no correspondería a una menor timopoiesis. Sin embargo en niños, en los que la función tímica es tan activa, es muy improbable que estas diferencias en la expansión periférica de linfocitos T expliquen las grandes diferencias de los valores de TRECs observados entre niños sanos e infectados. Se ha demostrado que en presencia de un timo funcional, la expansión periférica se ve suprimida [290, 293], por lo que en el niño, la repercusión de la expansión periférica en la dinámica de las células T sería mínima. Por otro lado, análisis de TRECs realizados en linfocitos T CD4+ purificados, que no se verían afectados por la expansión de linfocitos T CD8+, muestran que los niños infectados presentan valores de TRECs muy inferiores a niños sanos [294], coincidiendo con nuestros resultados. De Rossi *et al.* demuestran que en niños, los cambios de TRECs en PBMCs totales son comparables a los obtenidos en TRECs determinados en linfocitos T CD4+ purificados [295], lo que valida nuestros resultados. Otro estudio, en el que se determina la proliferación celular mediante la cuantificación de un antígeno nuclear denominado Ki67, concluye que los valores inferiores de TRECs observados en individuos infectados no son debidos a diferencias en la proliferación, si no que reflejan realmente una menor timopoiesis [296]. Por último, la gran asociación que aparece en todos nuestros resultados entre los valores de TRECs y porcentajes de CD4 son indicativos de que, al menos en niños, los valores de

TRECs reflejan el grado de timopoiesis y están directamente relacionados con el mantenimiento de la población de linfocitos T CD4+.

En nuestros resultados se observa que los valores de porcentaje de linfocitos T CD4+ también son marcadamente inferiores en niños infectados. Como se observa en la Figura 15, existe una gran correlación entre los valores de porcentaje de CD4 y los valores de TRECs, y nuestros resultados muestran que a lo largo del seguimiento de los niños, las variaciones en el porcentaje de CD4 siempre eran concomitantes con las variaciones en los valores de TRECs (**Artículo 1. Figure 3** (pg 92)). Todo ello indica que los valores de CD4 en periferia dependen en gran medida de la producción tímica. La población de linfocitos T en periferia es mantenida gracias a un equilibrio dinámico entre la timopoiesis y la expansión post-tímica de los linfocitos T periféricos [297, 298]. Se ha demostrado que durante el periodo fetal y el desarrollo postnatal, es la timopoiesis la que contribuye en mayor medida al mantenimiento de este “pool” de linfocitos T [299, 300], que va a estar constituido principalmente por células de fenotipo virgen (CD45RA⁺ CD62L⁺) que son además TREC⁺ [210]. La atrofia tímica que acontece con la edad va a hacer que la aportación tímica disminuya y en compensación que aumente la expansión periférica, que en edades avanzadas será la principal responsable de mantener una adecuada población de linfocitos T [297, 301, 302]. Es por tanto lógico pensar que la caída de CD4 asociada a la infección, se debería a la destrucción de células CD4 por parte del virus y, al menos en niños, también se debería en gran medida a la inhibición de la función tímica que impide una regeneración adecuada de estas células [303, 304]. Esto podría explicar por qué la infección por el VIH en niños, antes de la aparición de la HAART, era más agresiva y de curso más rápido que en adultos (0) [10, 74]. De hecho, la disfunción tímica se ha asociado con progresión temprana a la enfermedad en niños infectados perinatalmente [305-307] y se ha observado que la infección por el VIH produce una depleción de linfocitos con las mismas características que la deficiencia tímica congénita o *síndrome de DiGeorge* [305].

Por el contrario, el porcentaje de linfocitos T CD8+ no ha mostrado estar asociado a los niveles de TRECs. En la infección por el VIH, son los linfocitos T CD4+ la principal diana del virus y las que son eliminadas preferentemente, mientras que las células CD8 no son deplecionadas, si no que han mostrado sufrir una marcada expansión en respuesta a la presencia del virus. Por tanto el timo estaría produciendo de forma específica linfocitos T CD4+ con el fin de repoblar las células perdidas, mientras que los valores de linfocitos

CD8 dependerían por el contrario de los fenómenos de expansión periférica y activación de la respuesta CTL, como se ha apuntado en otros estudios realizados en adultos [308].

Existen evidencias de que la infección por el VIH es capaz de inhibir la función tímica, que explicarían los valores inferiores de TRECs observados en niños infectados. Diversos estudios clínicos han mostrado que el timo de niños y adultos infectados por el VIH sufre cambios morfológicos anormales que incluyen depleción de timocitos y una involución avanzada [281, 309-312]. Además, la infección por SIV en macacos *reshus*, ha mostrado producir alteraciones similares en la función tímica [313, 314]. Estudios realizados en cultivos de tejido tímico, en modelos de cultivo de órgano tímico y ratones SCID-hu han mostrado que los timocitos en casi todos los estados de maduración son susceptibles de ser infectados por el VIH [254, 315-319]. Por último, se ha comprobado que la infección por VIH produce un incremento de los infiltrados de células CTL en el espacio perivascular y una mayor desaparición de áreas con timopoiesis activa, casi idéntica a la observada durante la atrofia tímica o en pacientes con miastenia gravis [299]. Estas evidencias apoyan la inhibición de función tímica que se extrae de nuestros resultados, que además ha sido confirmada por diversos estudios tanto en niños [294, 300, 305, 307] como en adultos [296, 308, 320-324] en los que se observan niveles inferiores de TRECs asociados a la infección.

Es interesante observar cómo en los 3 primeros meses de vida, los valores de TRECs en niños infectados son idénticos a niños sanos (**Artículo 1. Figure 1** (pg 90)). Esto podría deberse a que en el 70 % de los casos, la transmisión vertical del VIH se produce en el momento del parto [71, 111-113], y por tanto es necesario que transcurran unos meses para que el efecto de la infección se vea reflejado en la función tímica. Trabajos recientes han confirmado que los niños que son infectados en el momento del parto, desarrollan los síntomas de la infección por el VIH más tarde que aquellos que adquieren la infección durante la gestación en el útero [325].

Una prueba más de la importancia del timo en niños infectados es el hecho de que los niños definidos como asintomáticos a largo plazo (LTA) son precisamente los que presentan unos valores de TRECs similares a niños no infectados (**Artículo 2. Figure 1a** (pg 99)) que podrían permitir una adecuada repoblación de linfocitos T que permite un control más eficaz de la infección evitando la progresión de la enfermedad. Estos niños LTA han conservado estables los valores de linfocitos T CD4+, no han progresado a la enfermedad y han mantenido valores bajos de CV durante varios años, que puede estar

permitiendo que el timo no sufra la inhibición por parte del VIH y que por tanto conserve su funcionalidad. Además, los resultados presentados en esta Memoria muestran que los niños LTA conservan las respuestas proliferativas frente a aloantígenos, presentan bajos valores de activación, y en general se puede decir que conserva un sistema inmune similar al de niños no infectados. Por el contrario, los niños definidos como progresores rápidos (RP) tienen una función tímica deficiente, como reflejan sus valores dramáticamente inferiores de TRECs, que podría ser responsable de su progresión más rápida a la enfermedad, de los bajos valores de linfocitos T CD4+ vírgenes y de las alteraciones inmunológicas que se reflejan en los resultados mostrados en esta Memoria (**Artículo 2** (pg 94)). Estos hechos son corroborados por varios estudios que confirman que la progresión rápida de la enfermedad en niños VIH+ se asocia con una involución temprana del timo a causa de la infección [307, 326].

Tras comprobar que la función tímica es clave en niños infectados por el VIH, y que de ella depende en gran parte la progresión a la enfermedad y la conservación de un adecuado sistema inmunológico, cabría pensar que la distinta progresión observada con cepas virales distintas podría deberse al grado de afectación tímica que producen dichas cepas.

Tanto en adultos como en niños, la aparición de cepas X4 o SI se asocia con una mayor progresión a la enfermedad y con una mayor depleción de linfocitos T CD4+ [150, 255-257, 327-330]. Los resultados presentados muestran efectivamente, que los niños que presentaban cepas X4 presentan valores de linfocitos T CD4+ muy inferiores a los de cepas R5, y los valores de TRECs, que correlacionan significativamente con las células CD4, también son muy inferiores en presencia de virus X4 (**Artículo 3. Figure 1a** (pg 105)). Esto hace indicar que las cepas X4 presentan un mayor efecto inhibitorio de la función tímica que sería responsable de los valores inferiores de linfocitos CD4 observados, y que dada la importancia ya mencionada del timo en la progresión de la enfermedad, podría ser también responsable de la mayor progresión asociada a la aparición de estas cepas X4 o SI. Este hecho es confirmado por los resultados obtenidos en el estudio longitudinal, ya que en un mismo paciente el cambio de fenotipo de X4 a R5 produce una marcada disminución de los valores de TRECs (**Artículo 3. Figure 1b** (pg 105)).

Cabe la posibilidad de que la correlación observada entre la presencia de cepas X4 y valores inferiores de TRECs fuera secundaria a otros factores. Los valores de TRECs han mostrado depender en gran medida de la edad [210, 280, 289]. Dado que las cepas R5 han

mostrado ser predominantes en las fases tempranas de la infección y las X4 en fases más avanzadas [331, 332], cabe la posibilidad de que las muestras con cepas X4 correspondan a edades más avanzadas que las muestras R5. Sin embargo, al incluir la edad como covariable en el análisis estadístico, los valores de TRECs continúan siendo significativamente inferiores en presencia de virus X4 independientemente de la edad. Otra posibilidad es que las cepas X4, presenten una cinética de replicación más alta y rápida [29, 30] y que por tanto la presencia de estas cepas conlleve una mayor carga viral, que se asociaría con una mayor inhibición tímica simplemente por existir una mayor cantidad de virus. Sin embargo, los resultados presentados muestran que no existen diferencias en los valores de TRECs entre niños con cepas de replicación S/L (lenta/baja) y R/H (rápida/alta), y que las cargas virales de los niños con cepas X4 y R5 no son significativamente diferentes. Por lo tanto, se puede concluir que las cepas X4 producen una mayor inhibición tímica que es independiente de la edad y que no está asociada a la cinética de replicación o a la viremia asociada a la presencia de estas cepas.

Estudios recientes han demostrado que las cepas virales X4 y no las cepas R5 tienen la capacidad de infectar timocitos, lo cual explicaría y confirmaría los resultados presentados en esta Memoria. Zaitseva *et al.* demuestran que las cepas X4 son capaces de infectar timocitos inmaduros, que presentan una alta expresión del correceptor CXCR4, afectando la función tímica [333]. Zamarchi *et al.* observan que cerca del 30% de los timocitos expresan CXCR4 en gran cantidad (aprox. 10000 moléculas por célula), mientras que el correceptor CCR5 está presente en menos del 5% de timocitos con una expresión más baja (menos de 4000 moléculas por célula). También observan que existen altos niveles de mRNA de CXCR-4 en timocitos mientras que el mRNA de CCR5 es casi inexistente, y que la infección *in vitro* de timocitos es mucho más eficiente con cepas CXCR-4 o T-trópicas que con cepas CCR5 o M-trópicas [334]. Recientemente, Schmitt *et al.* demuestran que el entorno tímico favorece la replicación de las cepas X4 al modular positivamente la expresión de CXCR4 en timocitos maduros CD4+CD8-CD3+. La interacción de células tímicas epiteliales con estos timocitos induce un incremento en la expresión de CXCR4, mediante la secreción de citocinas entre las que se incluye la IL-7 [335]. Estudios aparecidos en el año pasado, muestran modelos matemáticos de timopoiesis que confirman los resultados presentados en esta Memoria. Mediante estos modelos, Ye *et al.* predicen que la infección tímica mediante cepas distintas del VIH inducen diferentes grados de disfunción tímica que contribuyen a la progresión de la

enfermedad. Además, observan que la infección tímica en niños es mucho más severa que en adultos, especialmente en presencia de cepas X4, dado que el timo es mucho más activo en pacientes pediátricos, y que el cambio de cepas R5 a X4 induce mayor deterioro de la timopoiesis [300]. Por último, un estudio aparecido en los últimos meses muestra que al infectar macacos recién nacidos con un virus quimérico de tipo X4 producía una involución tímica severa, mientras que la infección con virus de fenotipo R5 sólo producía alteraciones menores en la morfología del timo [336].

Por tanto, la alta expresión del co-receptor CXCR-4 en timocitos permite la entrada de las cepas X4 del VIH, que se asocia con una mayor infección de timocitos, una mayor inhibición de la timopoiesis y una mayor progresión a la enfermedad. Por el contrario, las cepas R5 del VIH son menos eficaces infectando timocitos dada la baja expresión del co-receptor CCR5 en estas células.

6.2 Repoblación de Linfocitos T CD4+ tras la Terapia Antirretroviral.

Dado el efecto inhibitorio mencionado del VIH sobre la función tímica, cabe esperar que una disminución drástica de la viremia conduzca a una recuperación de la función tímica, y que esta recuperación sea especialmente patente en niños, los cuales conservan intacta su capacidad timopoiética. Los resultados presentados en esta Memoria confirman de forma patente esta hipótesis, ya que la instauración de terapias antirretrovirales, especialmente la HAART, producen una marcada caída de la viremia que se ve seguida por una recuperación drástica en el porcentaje de linfocitos T CD4+. Este aumento de CD4 es concomitante con un aumento igualmente marcado en los valores de TRECs (**Artículo 4. Figure 1** (pg 108), **Artículo 1. Figure 3** (pg 92)). Esta correlación tan estrecha entre valores de TRECs y CD4 es indicativa de que la repoblación de linfocitos CD4 en niños tras el control de la viremia tiene un origen mayoritariamente tímico, como han confirmado otros estudios [295, 337]. Además, otros marcadores de función tímica como el volumen tímico, determinado por tomografía computerizada del tórax, también han mostrado incrementar con la terapia [338] y estar estrechamente correlacionados con los valores de TRECs en linfocitos T CD4+ purificados y con la recuperación de CD4 [339]. Los resultados muestran además que, los niños que tras recibir TAR durante más de 3 años no habían conseguido recuperar la población de linfocitos CD4 (Non-Rec), eran precisamente aquellos que presentaban niveles significativamente inferiores de TRECs (**Artículo 5. Figure 2c** (pg 118)). Esto confirma que una adecuada timopoesis es necesaria para alcanzar el nivel de repoblación de linfocitos CD4 observado en los niños que responden a la terapia o recuperadores (Rec).

Existen diversos estudios que muestran un incremento de TRECs tras la terapia HAART en adultos infectados [210, 294, 324, 340] e incluso un incremento en la talla del timo [341]. Sin embargo, no está demostrado que el posible incremento en la timopoesis sea el responsable de la recuperación de la población CD4, ya que se han observado incrementos en linfocitos CD4 vírgenes sin que exista el correspondiente incremento en TRECs [342], e incluso se han mostrado incrementos de linfocitos CD4 vírgenes tras la terapia HAART en individuos timectomizados [281]. En adultos, el porcentaje de células TRECs positivas raramente supera el 5% de los linfocitos T en periferia, lo que refleja una escasa timopoesis que no está claro si es suficiente para recuperar la población CD4, por

lo que otros mecanismos distintos a la timopoiesis como la redistribución de linfocitos T o expansión periférica serían los principales responsables de la recuperación en los recuentos de CD4 [326].

En los resultados presentados en esta Memoria se observa una marcada recuperación en los valores de CD4 tras la instauración de las terapias antirretrovirales, llegando en algunos niños a incrementar desde menos de un 5 % hasta un 50 % en menos de un año (**Artículo 4. Figure 1** (pg 108)). Además, varios trabajos muestran un marcado incremento de linfocitos T CD4+ vírgenes tras terapia HAART en niños [219, 343, 344] que están asociados al incremento de TRECs y que alcanzan valores próximos a los observados en niños no infectados [343]. Diversos estudios muestran que la repoblación de CD4 tras la terapia depende en gran medida de la edad del paciente, coincidiendo en que la preservación de la función y masa tímica a edades tempranas sería la responsable de estas diferencias con la edad y de la marcada repoblación que alcanzan los niños infectados [279, 289, 345-347].

Los resultados muestran además, que la HAART se asocian con un mayor incremento en TRECs y una mayor recuperación de CD4 que las terapias combinadas (**Artículo 4. Figure 1** (pg 108)). La mayor disminución de CV alcanzada con HAART sería la explicación lógica a estas diferencias, pero la distinta accesibilidad de los diferentes fármacos a los tejidos también podría influir. Ye *et al.* muestran que la eficacia de los fármacos inhibiendo la replicación viral dentro del timo determina en gran medida la recuperación de TRECs, sobretodo en niños con cepas de tipo X4. Mediante un modelo matemático, muestran que los inhibidores de la RT son poco eficaces recuperando la función tímica, mientras que los IP serían capaces de entrar en el timo y controlar la replicación de los virus X4, aumentando de forma marcada la timopoiesis [348].

Por tanto podemos concluir que, dado el efecto inhibitorio mencionado del VIH sobre el timo, la marcada disminución de la CV debido a los TAR sería un requisito indispensable para que el timo pueda recuperar su función timopoiética y repoblar la población de linfocitos T CD4+.

6.3 Implicación de la Interleucina -7 en la Homeostasis de Linfocitos T CD4+.

Los resultados mencionados muestran que tras la supresión de la CV el timo aumenta su actividad timopoiética recuperando la población de linfocitos T CD4+ hasta alcanzar valores similares a niños no infectados. Este hecho indica que podría existir un mecanismo de homeostasis que responde a la depleción de CD4 que acontece con la infección con un incremento en la producción de dichas células para repoblar y mantener los niveles adecuados de dicha población. Este mecanismo homeostático estaría regulado por la producción de factores que estimulen la diferenciación, supervivencia y/o expansión de las células T, como ha sido descrito para otros grupos hematopoiéticos [349, 350]. Se piensa que un mecanismo homeostático similar podría conectar los órganos linfoides periféricos con la médula ósea o el timo, regulando la homeostasis de las células linfoides [260]. Entre las distintas citocinas y hormonas identificadas como posibles reguladores de la timopoesis, la IL-7 ha mostrado tomar parte en la diferenciación de timocitos en linfocitos T maduros que pasan del timo a la periferia [258, 259]. Estudios realizados en ratones muestran que la IL-7 es esencial en el mantenimiento de la población de linfocitos T [351, 352], y que mejora la reconstitución inmune en ratones *myeloablated* [353, 354]. Por otro lado, se ha observado que los pacientes VIH+ presentan valores plasmáticos de IL-7 elevados que además correlacionan negativamente con los valores de linfocitos T CD4+ [260-263]. Por todo ello, se ha propuesto el incremento de IL-7 como la respuesta homeostática a la depleción de linfocitos T CD4+ causada por la infección [260].

Sin embargo, en los estudios realizados en adultos [260-263], no se ha observado que estos altos valores de IL-7 tengan efecto alguno en la repoblación de linfocitos T. El efecto inhibitorio del VIH sobre el timo, y sobre todo, la involución tímica que se da en adultos, puede estar anulando la capacidad del timo de responder a estos altos valores de IL-7 con un incremento en la timopoesis. De hecho, se ha observado en adultos que, a pesar de disminuir la CV tras el TAR, no se da una recuperación de linfocitos T CD4+ vírgenes y los valores de IL-7 permanecen elevados [263]. Los datos presentados en esta Memoria muestran sin embargo, que en niños el timo sí sería capaz de responder a estos altos niveles de IL-7 y se observa una asociación entre el incremento de TRECs y los valores plasmáticos de IL-7.

Coincidiendo con otros estudios realizados en adultos [260-263], los resultados muestran una correlación inversa entre el porcentaje de CD4 y los valores de IL-7. En los 5 niños analizados, cuando el porcentaje de CD4 estaba por debajo del 5-10% la IL-7 sufría un marcado incremento, muy por encima de los valores observados en niños no infectados. Sin embargo, los niños definidos como asintomáticos (LTA), cuyos porcentajes de CD4 eran próximos al 30% presentaban valores plasmáticos de IL-7 similares a los de niños no infectados. No se observó sin embargo, correlación alguna entre IL-7 y el porcentaje de linfocitos T CD8+. Esto indica que el incremento de IL-7 podría ser la respuesta homeostática que se desencadena tras la caída de CD4. Como proponen Napolitano *et al.* la caída de linfocitos T en circulación induciría a las células dendríticas presentes en los órganos linfoides secundarios a producir IL-7, la cual, estimularía la producción de nuevos linfocitos T en el timo, donde la IL-7 ha demostrado jugar un papel clave en el desarrollo de los precursores CD4 y CD8, y en la expansión de los timocitos seleccionados positivamente [260].

Mientras la CV se mantenía elevada, los valores de IL-7 se mantuvieron elevados y no se observó ningún incremento de TRECs o linfocitos T CD4+, probablemente debido al efecto inhibitorio ya comentado del VIH sobre el timo y al hecho de que la IL-7 podría estar favoreciendo la infección de timocitos por el VIH [258]. Estudios realizados *in vitro*, indican que la IL-7 aumenta la expresión de CXCR4 en timocitos CD4+ [335] y en PBMCs [262], lo que podría aumentar la susceptibilidad de los linfocitos T frente a cepas X4 del VIH. Sin embargo, al disminuir de forma drástica la CV a consecuencia de los TAR, se observa un marcado incremento de TRECs acompañado del incremento en el porcentaje de CD4, e interesantemente, se observa como tras la normalización de los valores de CD4, la IL-7 disminuye drásticamente volviendo a sus niveles basales. Este hecho apoya la implicación de la IL-7 en la homeostasis de linfocitos T, ya que al normalizarse los valores de CD4, por un posible mecanismo de retroalimentación negativo se dejaría de activar la producción de IL-7, disminuyendo sus valores plasmáticos. Este hecho coincide con otras situaciones en las que se da linfopenia (síndrome de inmunodeficiencia severa combinada, leucemia linfoide aguda, linfopenia inducida por quimioterapia), donde también aparecen valores de IL-7 elevados que, cuando se revierte la linfopenia, se normalizan hasta recuperar los valores basales [354, 355]. A la vista de estos datos parece improbable que el incremento de IL-7 se deba a otros factores asociados

a la infección, y sería la depleción de CD4 la principal responsable de este incremento, como ya han apuntado otros autores [260].

Por otro lado, el incremento de TRECs observado podría deberse directamente al efecto ya comentado de la IL-7 estimulando la timopoiesis. Datos recientes demuestran que la administración exógena de IL-7 tanto *in vitro* como *in vivo*, incrementa los valores de TRECs en timo fetal e infantil [356]. Además del efecto directo sobre el timo, la IL-7 también incrementa la regeneración extra-tímica de linfocitos T [355, 357], y ha mostrado jugar un papel clave en la supervivencia de linfocitos T vírgenes, especialmente de los linfocitos T CD4+ vírgenes [358]. También se ha descrito recientemente que la IL-7 promueve la generación y aumenta la supervivencia de linfocitos T CD4+ memoria [359, 360].

Estos datos apoyan la hipótesis de que la IL-7 sea la principal responsable de la repoblación de linfocitos T CD4+ observada. El incremento de IL-7 estaría induciendo al timo a incrementar la producción de linfocitos T, que al desaparecer la inhibición tímica con la caída de la carga viral, incrementaría la timopoiesis que se reflejaría como un aumento de TRECs, y conduciría al marcado incremento de linfocitos T CD4+. Una vez alcanzados niveles adecuados de CD4, los mecanismos de homeostasis harían disminuir los niveles de IL-7 hasta los valores basales.

Los resultados presentados en esta Memoria sugieren por tanto, un posible efecto beneficioso de la administración de IL-7 en niños con bajos recuentos de CD4 con el fin de estimular la repoblación tímica de estas células. Existe controversia sobre los posibles efectos perjudiciales de la IL-7. Se ha descrito que la IL-7 podría acelerar la progresión de la infección [260], y aumentar la susceptibilidad al VIH de linfocitos T vírgenes [361]. Pero también hay datos de que en macacos la administración de IL-7 estimula la producción tímica y la expansión periférica de linfocitos T sin incrementar la replicación del virus [362] y que en ratones incrementa la supervivencia de timocitos sin acelerar la infección por VIH [363]. Estos datos, así como la ausencia de efectos beneficiosos en adultos, hacen necesario más estudios para determinar el beneficio o perjuicio de esta terapia en adultos o en individuos con CV elevada.

6.4 Recuperación de Respuestas Inmunológicas tras la Reconstitución Inmune.

El origen tímico de la repoblación de linfocitos T CD4+ podría permitir una recuperación en el repertorio de especificidades que conduciría a una recuperación de respuestas específicas frente a patógenos oportunistas y también frente al VIH. De hecho, se ha visto que el incremento en la población CD4 permite recuperar algunas respuestas inmunes frente a patógenos oportunistas [217, 272, 273] disminuyendo la incidencia de infecciones oportunistas [269, 274, 275]. Con el fin de caracterizar estas respuestas en niños y su asociación con la repoblación tímica se analizó la capacidad de proliferación y la producción de citocinas en respuesta a distintos mitógenos y antígenos de recuerdo en PBMCs.

La pérdida de respuestas proliferativas de los linfocitos T CD4+ a antígenos de recuerdo como el TT, es una de las primeras manifestaciones que aparecen en la infección por VIH. A continuación, aparecen alteraciones en la respuesta proliferativa frente a aloantígenos, y con el continuo declive de los linfocitos T CD4+ se pierden también las respuestas a mitógenos como PHA o PWM [87]. Los resultados muestran que los niños definidos como LTA, conservaban las respuestas proliferativas frente a aloantígenos, pero las respuestas frente a antígenos de recuerdo estaban disminuidas con respecto a los controles no infectados. Esto podría ser indicativo de que los niños definidos como LTA estarían estabilizados en las primeras etapas de la infección, al no haber perdido todavía las respuestas a aloantígenos. Sin embargo, los niños definidos como RP muestran una baja capacidad proliferativa tanto a antígenos de recuerdo como a aloantígenos, que podría estar asociada a los altos valores de linfocitos T CD4+ memoria y activados con un alto grado de diferenciación y baja capacidad proliferativa [364]. En los niños LTA, los valores de linfocitos T CD4+ vírgenes, memoria y de células activadas fueron similares a los observados en controles, lo cual podría explicar la similar respuesta proliferativa en comparación con los controles no infectados. Se observa además que, cuando la terapia antirretroviral es efectiva, las respuestas proliferativas frente a mitógenos volvieron a valores normales (**Artículo 5** (pg 110). Resino, Correa *et al.* *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18:1395-1406, 2002), al igual que se ha observado en adultos [365, 366] y en trabajos posteriores en niños [344]. La baja respuesta proliferativa observada en los niños que no habían respondido a la terapia (Non-Rec), podría ser igualmente debida a la mayor

proporción de linfocitos T memoria y activados. Un reciente estudio muestra que los niños Non-Rec, presentan una mayor expansión de linfocitos T CD4⁺ (determinada por la expresión de Ki67), así como una mayor activación inmune y una reducción de los valores de TRECs [367]. De gran interés es que los niños que responden a la terapia (Rec), al igual que los LTA no recuperan respuestas proliferativas frente a antígenos de recuerdo, que podría deberse a la pérdida temprana e irreversible de estas respuestas en las primeras etapas de la infección.

En cuanto a la producción de citocinas, se ha observado que los linfocitos T colaboradores de tipo Th1 producen grandes cantidades de IFN- γ , IL-2 y TNF- α [368], y estas respuestas de tipo Th1 están especialmente disminuidas en el curso de la infección por el VIH [369, 370]. Esto explicaría los bajos valores de IFN- γ y TNF- α observados en los niños definidos como RP y tanto en los que respondieron a la terapia (Rec) como los que no respondieron (Non-Rec), reflejando una función alterada de los linfocitos T CD4⁺ [370]. Mientras que los niños definidos como LTA, que como se ha comentado estarían estabilizados en las primeras fases de la infección, presentaron valores de IFN- γ y TNF- α muy superiores.

El timo podría estar desempeñando un papel clave en la preservación de estos parámetros inmunológicos. Los resultados muestran que tanto los niños que responden a la terapia como los definidos como LTA, presentan altos valores de TRECs próximos a los observados en controles no infectados. La mayor timopoiesis en estos niños estaría recuperando la población de linfocitos T CD4⁺ vírgenes [219, 343, 344] que permitiría preservar distintos parámetros inmunológicos. Sin embargo, tanto los niños que no responden a la terapia (Non-Rec) como los definidos como RP, presentan valores muy inferiores de TRECs. La ausencia de generación de nuevos linfocitos T por la inhibición tímica secundaria a la infección [254], así como el continuo estímulo antigénico del VIH en estos niños, estaría favoreciendo la caída de linfocitos T vírgenes y la diferenciación de los linfocitos T a células memoria y activadas que han mostrado tener una capacidad proliferativa disminuida [364].

El análisis de las respuestas proliferativas frente a antígenos del VIH (p24) realizado en PBMCs, mostró que no existían diferencias entre niños LTA y RP. Diversos estudios han mostrado que la proliferación frente al VIH se encuentra disminuida desde el inicio de la infección [87, 371-374], lo que explicaría que incluso en los LTA sean bajas y similares a las de niños RP.

Los ensayos de respuestas proliferativas han sido frecuentemente utilizados para estudiar respuestas específicas, y se ha asociado la detección de repuestas proliferativas específicas con la inmunidad protectora frente a infecciones virales [183, 286]. Sin embargo, esta metodología no permitía determinar de forma precisa la frecuencia de linfocitos T CD4+ VIH-específicos. Además del importante papel que juegan los linfocitos T CD8+ en la respuesta antiviral, se ha demostrado tanto en ratones como humanos el papel crítico de los linfocitos T CD4+ específicos frente al virus y su asociación con la respuesta protectora antiviral [179, 183, 286, 375-380], pero también se ha observado que en la infección por el VIH las respuestas CD4 VIH-específicas se ven alteradas desde el inicio de la infección y disminuyen incluso antes de que se de la caída en los valores de linfocitos T CD4+ [87, 371-374]. Por todo ello, se realizó un análisis mediante citometría de flujo de la frecuencia de linfocitos T CD4+ VIH-específicos en base a su capacidad de secretar IFN- γ e IL-2 en respuesta a la estimulación antigénica con la proteína p55 gag del VIH.

El análisis mediante citometría mostró 3 tipos de linfocitos T CD4+ VIH-específicos: células que secretaban IL-2, células que secretaban IFN- γ y células que secretaban ambas citocinas. Harari *et al.* [264] han demostrado que estos 3 tipos celulares corresponden con 3 subpoblaciones funcionalmente distintas de linfocitos T CD4+, cuya proporción va a variar con la progresión de la enfermedad y el estado inmunológico del paciente. Harari *et al.* [264] mostraban que al analizar las respuestas específicas frente a CMV en adultos infectados LTNP, progresores, e individuos VIH negativos, la mayoría de las linfocitos T CD4+ secretoras de IFN- γ y las secretoras de ambas citocinas (IL-2⁺/IFN- γ ⁺) eran células memoria CCR7⁻, que correspondería a células memoria con función efectora. Sin embargo, las células secretoras de IL-2 eran células CCR7⁺ que correspondería con células de memoria central. También observaron que en individuos LTNP los linfocitos T CD4+ VIH-específicos estaban igualmente distribuidas entre las 3 poblaciones, al igual que ocurría con los linfocitos T CD4+ CMV-específicas en individuos infectados y no infectados. Sin embargo, en los pacientes infectados por VIH definidos como progresores, las células IL-2⁺ y las IL-2⁺/IFN- γ ⁺ estaban prácticamente ausentes lo que representaba una acumulación de células de tipo efectoras (IFN- γ ⁺). En estos individuos progresores, el control de la viremia mediante la terapia antirretroviral hacia disminuir los valores de células IFN- γ ⁺ y recuperar ligeramente los de células IL-2⁺, presentando un patrón similar al de LTNP [264].

El estudio realizado en niños infectados, muestra 3 patrones distintos de linfocitos T CD4⁺ VIH-específicos. En un grupo de niños existe un predominio de células IFN- γ^+ semejante al observado en adultos progresores, otros 9 niños presentaban los 3 tipos de células semejante a adultos LTNP y 10 de los niños presentaban un patrón de predominio de células IL-2⁺ que nunca se había descrito en adultos infectados. A pesar de las similitudes en el patrón de producción de citocinas, la cantidad de linfocitos T CD4⁺ VIH-específicos fue muy superior en niños con respecto a la de adultos. Harari *et al.* [264] muestran un valor medio de células IFN- γ^+ de 0,11% en adultos progresores y de 0,12% en LTNP, similares a los observados por otros autores en adultos [185, 264-267]. Sin embargo, en los niños estudiados el porcentaje de células IFN- γ^+ alcanzó valores del 0,90%, siendo el valor medio en el grupo con predominio de IFN- γ^+ de 0,48%, comparable a los valores obtenidos por Scott *et al.* en niños [381]. En cuanto a las células IL-2⁺, Harari *et al.* [264] obtienen valores medios de 0,03% en progresores y 0,17 en LTNP, mientras que Younes *et al.* [265] obtienen valores medios no detectables en pacientes con viremia alta y de 0,06% en pacientes avirémicos. En los niños analizados se alcanzan valores de células IL-2⁺ de 0,88% y la media en el grupo con predominio de IL-2⁺ es de 0,27%.

El análisis estadístico muestra que únicamente la CV tiene efecto sobre la frecuencia de células específicas, mostrando una correlación positiva con las células IFN- γ^+ . Efectivamente, los niños que presentaban un predominio de IFN- γ^+ experimentaban en el momento del estudio un pico de CV, y era la CV la única variable que diferenciaba a este grupo de niños del resto. Esto sería debido a que el incremento de carga viral induciría la diferenciación y expansión de células específicas a adquirir función efectora (que presentarían un fenotipo CCR7⁻ e IFN- γ^+), con el fin de controlar la replicación del virus, como se ha observado en adultos [264]. Se ha comprobado que una exposición transitoria al antígeno sería suficiente para desencadenar la proliferación y diferenciación de los linfocitos T [382-385]. La diferencia de magnitud entre adultos y niños sería debida a que la reserva de células vírgenes presentes en niños como consecuencia de la adecuada repoblación tímica, es mucho mayor que la presente en adultos en los que la función tímica está muy disminuida. Esta reserva de linfocitos T CD4⁺ vírgenes podría diferenciarse en linfocitos efectora específicas tras el estímulo antigénico provocado por la subida de viremia, en un proceso que implicaría la interacción de citocinas específicas [386] como ha sido propuesto por Seder y Ahmed [387], generando por tanto una gran cantidad de linfocitos efectora VIH-específicos (Figura 21).

En la mayoría de estos niños, estos repuntes de CV son finalmente controlados debido a la TAR y a la respuesta específica generada por estas células efectoras que se han formado, que podrían estar controlando la replicación del virus. Este hecho se ve reflejado en el grupo de niños que presentaban las 3 poblaciones de linfocitos T CD4⁺ específicos. Los niños que sufrieron un pico de CV en el último año consiguieron controlar la viremia volviendo a ser indetectable en la actualidad, y tras la desaparición del antígeno, las células efectoras (IFN- γ ⁺) disminuyeron y se produjo un ligero incremento en la frecuencia de T_{MC} (IL-2⁺), tal y como se ha descrito en adultos tras el TAR [264]. La activación y expansión de los linfocitos T viene siempre seguida de una fase de muerte celular en la que la mayoría (~ 90%) de las células efectoras son eliminadas. Éste es un mecanismo complejo, en el que están implicados múltiples mecanismos que conducen a la apoptosis de las células efectoras [388, 389]. Además, se ha observado que los linfocitos T CD4⁺ se vuelven más susceptibles a la muerte celular cuando se convierten en células secretoras de IFN- γ ⁺ [390]. Estos datos explican la caída observada de células T_{ME} (IFN- γ ⁺) por los mecanismos de apoptosis y porque en ausencia del antígeno se pararía la diferenciación de nuevas células efectoras. El ligero incremento de células IL-2⁺ podría explicarse porque en presencia del antígeno la población de células vírgenes presentes en el niño podría generar estas células de memoria central (T_{MC}) como ha sido propuesto por Seder *et al.* [387](Figura 21). Además de la generación de células T_{MC} a partir de las células vírgenes, también podría ocurrir que un pequeño porcentaje de las células T_{ME} se diferenciaron en T_{MC} como se ha descrito en ratones para linfocitos T CD8⁺ [391, 392]. El que el aumento de células IL-2⁺ no sea muy marcado podría explicarse por el hecho de que la reserva de células vírgenes ha sido agotada en la generación de células efectoras y se requiere un tiempo para que el timo recupere las células vírgenes. De hecho los resultados muestran una correlación positiva en este grupo entre los valores de TRECs y la frecuencia de células IL-2⁺. La producción por parte del timo de nuevos linfocitos T permitiría recuperar la población de linfocitos T vírgenes con un amplio repertorio de especificidades y con una capacidad multipotencial de generar células específicas frente a un amplio repertorio de antígenos, entre ellos el VIH. Esto explicaría la presencia del tercer grupo de niños con predominio de células IL-2⁺. Tras un año en el que la viremia se ha mantenido controlada y por lo tanto no ha sido necesario generar células efectoras, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes repobladas por el timo se diferenciarían en células T_{MC} [387] aumentando considerablemente la población de células VIH-específicas IL-2⁺. De hecho los resultados

presentados muestran que en este grupo de niños el porcentaje de células IL-2⁺ se correlaciona con la CV media de los últimos 2 años, pero no con la del último año, y que los valores más altos de células IL-2⁺ se obtuvieron en niños que habían sufrido un pico de viremia en los 2-3 últimos años, lo que podría representar la necesidad de la presencia del Ag para activar la diferenciación de células T_{MC}. En los niños que tuvieron controlada la viremia durante largos periodos de tiempo (3-5 años) se observa que aunque la población predominante siga siendo la de células IL-2⁺, la cantidad de estas células ha disminuido. Esto se debería a que tras largos periodos sin la presencia del antígeno dejan de generarse células específicas, manteniendo únicamente una pequeña población de células T_{MC}, capaces de generar una respuesta secundaria si se produce una re-exposición al antígeno. Se ha propuesto que la población de células T_{MC} podría diferenciarse en células T_{ME} tras la re-exposición al antígeno [181, 393, 394], lo que contribuiría a generar la elevada población de células IFN-γ⁺ observada cuando se produce un aumento de viremia (Figura 21).

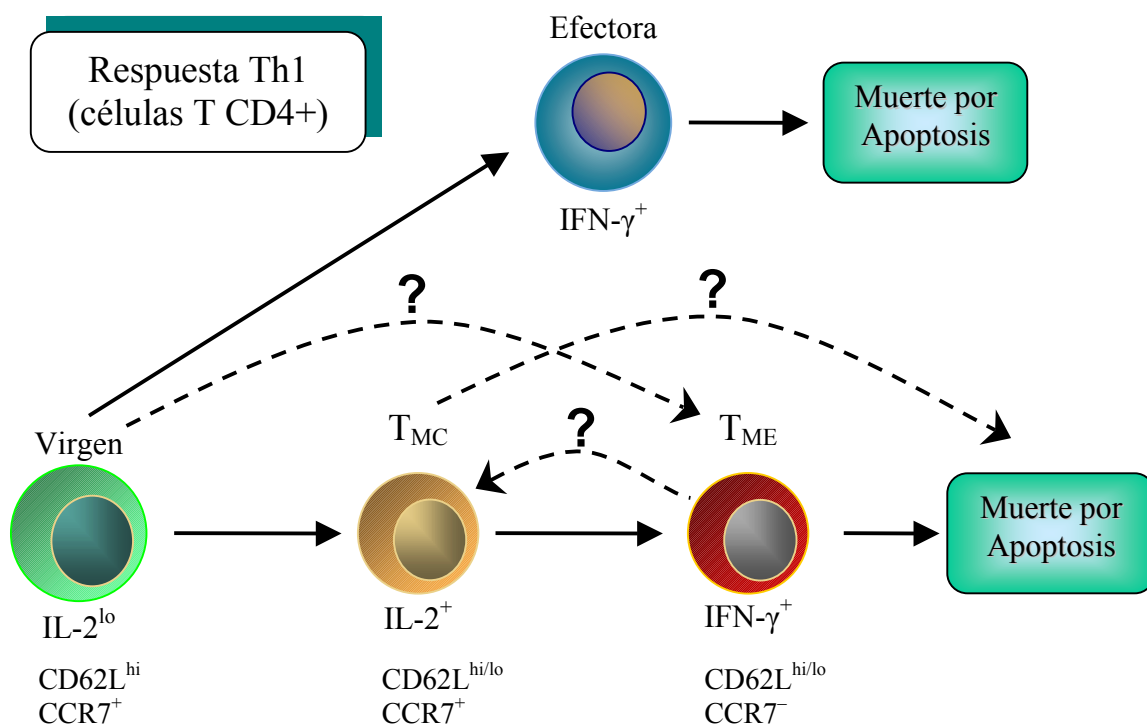


Figura 21. Modelo de diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ en la respuesta de tipo Th1. Adaptado de Seder y Ahmed [387].

Todo ello sería corroborado por el hecho de que en adultos infectados no se ha observado nunca este patrón de predominio de células IL-2⁺. Se ha descrito que tras la terapia antirretroviral hay un ligero incremento de células IL-2⁺, que podría tener su origen en el pequeño porcentaje de células T_{ME} que se diferencian T_{MC}, pero a pesar del control de la viremia nunca se llegan a recuperar más células IL-2⁺. La involución del timo en el adulto impediría repoblar la población de linfocitos T CD4⁺ vírgenes impidiendo la recuperación del repertorio de especificidades mermado por la infección, por lo que el sistema inmunológico sería incapaz de formar nuevas células VIH-específicas para mantener la reserva de células memoria frente al VIH.

Los pocos trabajos que han analizado los linfocitos T CD4⁺ VIH-específicos en niños, concluyen que las células específicas secretoras de IFN- γ están presentes en niños VIH⁺ con una replicación activa del VIH, pero su frecuencia es muy baja en niños con la viremia controlada o tras la HAART [381, 395]. Feeney *et al.* [395] describen que a pesar de presentar una marcada respuesta proliferativa específica frente a Gag, la frecuencia de células CD4 IFN- γ ⁺ específicas frente a Gag era baja en la mayoría de los niños tratados con HAART [395]. A la vista de estos resultados Scott *et al.* [381] desaconsejan la interrupción de la terapia antirretroviral en niños con el fin de preservar la función VIH-específica de los linfocitos T CD4⁺. Sin embargo, en ambos estudios no se han analizado las células VIH-específicas secretoras de IL-2, y por tanto la población de células T_{MC} que es justo la población que se ve afectada en adultos, no es contemplada. Las marcadas respuestas proliferativas frente a Gag observadas, corresponderían a las células T_{MC} que han demostrado tener una alta capacidad proliferativa [264], y no a las T_{ME}. Nuestros resultados demuestran que los niños conservan una adecuada capacidad de reconstituir la inmunidad VIH-específica, y por tanto apoyan la eficacia potencial de las interrupciones de tratamiento supervisadas, la inmunización terapéutica y otras terapias inmunomoduladoras en niños.

Por último, un artículo reciente en el que se describe el patrón de linfocitos T CD4⁺ específicos en tres infecciones que difieren en la exposición al antígeno confirmaría nuestro modelo [396]. En este trabajo, Harari *et al.* analizan en adultos las respuestas de células memoria en: un modelo de persistencia del Ag y alta CV (infección por VIH), un modelo de exposición repetida al Ag con baja CV (infección por CMV), y un modelo de aclarado del Ag (infección por tétanos). Es interesante observar que el patrón observado en adultos infectados por VIH (persistencia del antígeno) corresponde al observado en el

grupo con predominio de células IFN- γ^+ , donde se daba un pico de viremia. El patrón observado en la respuesta frente a CMV (exposición repetida al Ag), corresponde con el obtenido en el grupo con los 3 tipos de células específicas, que se daba en niños que habían sufrido una re-exposición al VIH en el último año. Por último, el patrón observado en la respuesta frente al toxoide tetánico, que correspondería a una situación de aclarado del Ag, es idéntico al obtenido en el grupo con predominio de células IL-2⁺. Este dato es de gran interés, porque podría ser la primera demostración de que un sistema inmunológico adecuado podría controlar la infección y producir un aclarado del antígeno del VIH.

Podemos concluir que en niños, donde la función tímica está preservada, el mantenimiento de una población adecuada de linfocitos T vírgenes preservaría la población de células CD4 VIH-específicas de memoria central. Estas T_{MC} proporcionarían una fuente de células CD4 efectoras VIH-específicas capaz de controlar los picos de viremia. La capacidad observada en niños de generar linfocitos T CD4⁺ VIH-específicos permitiría un control de la replicación viral y conduciría a un aclarado del Ag similar al que acontece para el tétanos en adultos. Este hecho podría ser la explicación a la no progresión a la enfermedad durante largos periodos de tiempo observada en algunos niños, y a la buena respuesta que están mostrando los niños a las interrupciones de tratamiento, manteniendo estabilizadas viremia y linfocitos T CD4⁺ sin tratamiento antirretroviral [397].

7. Conclusiones

1. La infección por VIH en niños ejerce un efecto inhibitorio sobre el timo que se ve reflejado en los valores inferiores de TRECs y que impide el mantenimiento de la adecuada homeostasis de linfocitos T.
2. En los niños infectados por VIH, el timo juega un papel clave y determina en gran medida los valores de linfocitos T CD4+ en periferia.
3. Las distintas cepas virales del VIH tienen un efecto diferencial sobre la función tímica. El efecto inhibitorio sobre el timo de las cepas X4 es superior al de cepas R5 dada la alta expresión en timocitos del receptor CXCR4.
4. El tratamiento antirretroviral produce una marcada caída de la viremia que conduce a una repoblación por parte del timo de la población de linfocitos T CD4+.
5. La Interleucina-7 parece ser la principal molécula implicada en el mecanismo de homeostasis de la población CD4. La caída de linfocitos T CD4+ en periferia produce un aumento en los valores plasmáticos de IL-7 que parecen estimular la producción por parte del timo de nuevos linfocitos T.
6. La reconstitución tímica de los linfocitos T CD4+ se asocia con una preservación de distintos parámetros inmunológicos como la respuesta proliferativa y producción de citocinas.
7. La adecuada repoblación de linfocitos T vírgenes por parte del timo permitiría la generación de linfocitos T CD4+ memoria específicos frente al VIH. El mantenimiento de esta población de células específicas contribuiría al control de la infección y podría conducir a un aclarado del antígeno VIH.

8. Bibliografía

1. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 1981,305:1425-1431.
2. Masur H, Michelis MA, Greene JB, *et al.* An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1981,305:1431-1438.
3. CDCP. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1982,31:507-508, 513-504.
4. Zhu T, Korber BT, Nahmias AJ, Hooper E, Sharp PM, Ho DD. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998,391:594-597.
5. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983,220:868-871.
6. Gallo R, Salahuddin S, Popovic M, *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984,224:500-503.
7. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 1984,225:840-842.
8. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* 1987,326:662-669.
9. Haase AT. Pathogenesis of lentivirus infections. *Nature* 1986,322:130-136.
10. Levy JA. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* 1993,57:183-289.
11. Frankel AD, Young JA. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* 1998:1-25.
12. Gaynor R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression. *Aids* 1992,6:347-363.
13. Alcamí J. Virología del VIH-1. In: *Manual del SIDA*. Edited by Soriano V, Gonzalez-Lahoz J. Madrid: IDEPSA; 1999:20-40.
14. Dagleish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4(T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 1984,312:763-767.
15. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, *et al.* lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 1984,312:767-76856.
16. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor [see comments]. *Science* 1996,272:872-877.
17. Dragic T, Litwin V, Allaway G, *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 1996,381:667-673.
18. Choe H, Farzan M, Sun Y, *et al.* The b-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 1996,85:1135-1138.
19. Varmus H. Retroviruses. *Science* 1988,240:1427-1435.

20. Mahalingam S, Ayyavoo V, Patel M, Kieber-Emmons T, Weiner DB. Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 1997,71:6339-6347.
21. Bukrinsky MI, Haffar OK. HIV-1 nuclear import: matrix protein is back on center stage, this time together with Vpr. *Mol Med* 1998,4:138-143.
22. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990,61:213-222.
23. Gaynor R. Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression [published erratum appears in *AIDS* 1992 Jun;6(6):following 606]. *AIDS* 1992,6:347-363.
24. Chang DD, Sharp PA. Messenger RNA transport and HIV rev regulation. *Science* 1990,249:614-615.
25. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995,373:123-126.
26. Ho DD. Viral counts count in HIV infection. *Science* 1996,272:1124-1125.
27. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996,271:1592-1594.
28. Benyoucef S, Hober D, Lion G, *et al.* Combination of whole blood culture and a rapid and sensitive cell assay for the determination of the cytopathogenicity of human immunodeficiency virus type-1 isolates. *J Virol Methods* 1998,71:123-131.
29. Liesnard C, Delforge ML, Tchetcheroff M, De Maertelaer V, Farber CM, Van Vooren JP. Importance of method in the determination of syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J Virol Methods* 1997,64:137-145.
30. Bjorndal A, Deng H, Jansson M, *et al.* Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol* 1997,71:7488-7497.
31. Kupfer B, Kaiser R, Rockstroh JK, Matz B, Schneeweis KE. Role of HIV-1 phenotype in viral pathogenesis and its relation to viral load and CD4+ T-cell count. *J Med Virol* 1998,56:259-263.
32. Galan I, Jimenez JL, Gonzalez-Rivera M, *et al.* Virological phenotype switches under salvage therapy with lopinavir-ritonavir in heavily pretreated HIV-1 vertically infected children. *AIDS* 2004,18:247-255.
33. Zhu T, Mo H, Wang N, *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of HIV-1 patients with primary infection. *Science* 1993,261:1179-1181.
34. Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, *et al.* Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997,3:1369-1375.
35. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. Change in co-receptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J Exp Med* 1997,185:621-628.
36. Levy J, Shimabukuro J, McHugh T, Casavant C, Stites D, Oshiro L. AIDS-associated retroviruses (ARV) can productively infect other cells besides human T helper cells. *Virology* 1985,147:441-448.

37. Broder CC, Berger EA. Fusogenic selectivity of the envelope glycoprotein is a major determinant of human immunodeficiency virus type 1 tropism for CD4- T-cell lines vs. primary macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,92:9004-9008.
38. Obregón E, Punzon C, Fernandez-Cruz E, Fresno M, Munoz-Fernandez MA. HIV-1 infection induces differentiation of immature neural cells through autocrine tumor necrosis factor and nitric oxide production. *Virology* 1999,261:193-204.
39. Alvarez Losada S, Canto-Nogues C, Munoz-Fernandez MA. A new possible mechanism of human immunodeficiency virus type 1 infection of neural cells. *Neurobiol Dis* 2002,11:469-478.
40. Arias RA, Munoz LD, Munoz-Fernandez MA. Transmission of HIV-1 infection between trophoblast placental cells and T-cells take place via an LFA-1-mediated cell to cell contact. *Virology* 2003,307:266-277.
41. Saha K, Zhang J, Gupta A, Dave R, Yimen M, Zerhouni B. Isolation of primary HIV-1 that target CD8+ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat Med* 2001,7:65-72.
42. Burke A, Anderson D, Benson W, et al. Localization of human immunodeficiency virus 1 RNA in thymic tissues from asymptomatic drug addicts. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1995,119:36-41.
43. McCune JM. Thymic function in HIV-1 disease. *Semin Immunol* 1997,9:397-404.
44. Tindall B, Cooper DA. Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 1991,5:1-14.
45. Gaines H, von Sydow MA, von Stedingk LV, et al. Immunological changes in primary HIV-1 infection. *AIDS* 1990,4:995-999.
46. Clark SJ, Saag MS, Decker WD, et al. High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection. *N Engl J Med* 1991,324:954-960.
47. Daar ES, Moudgil T, Meyer RD, Ho DD. Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1991,324:961-964.
48. Ho DD, Sarngadharan MG, Resnick L, Dimarzo-veronese F, Rota TR, Hirsch MS. Primary human T-lymphotropic virus type III infection. *Ann Intern Med* 1985,103:880-883.
49. Cooper DA, Imrie AA, Penny R. Antibody response to human immunodeficiency virus after primary infection. *J Infect Dis* 1987,155:1113-1118.
50. Cooper DA, Tindall B, Wilson EJ, Imrie AA, Penny R. Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988,157:889-896.
51. Gaines H, Albert J, von Sydow M, et al. HIV antigenaemia and virus isolation from plasma during primary HIV infection. *Lancet* 1987,1:1317-1318.
52. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994,68:4650-4655.
53. Kinloch-De Loes S, Hirschel BJ, Hoen B, et al. A controlled trial of zidovudine in primary human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995,333:408-413.
54. Buchbinder SP, Katz MH, Hessol NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994,8:1123-1128.

55. Fauci AS, Lane HC. The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). In: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Edited by Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ. 12 ed. New York: McGraw-Hill; 1991:1402-1410.
56. Lifson AR, Buchbinder SP, Sheppard HW, 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* 1991,163:959-965.
57. Pantaleo G, Graziosi C, Butini L, et al. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991,88:9838-9842.
58. Pantaleo G, Graziosi C, Demarest JF, et al. HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* 1993,362:355-358.
59. Piatak M, Jr., Saag MS, Yang LC, et al. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* 1993,259:1749-1754.
60. Fauci AS, Masur H, Gelmann EP, Markham PD, Hahn BH, Lane HC. NIH conference. The acquired immunodeficiency syndrome: an update. *Ann Intern Med* 1985,102:800-813.
61. Phair JP. Keynote address: variations in the natural history of HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994,10:883-885.
62. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995,332:201-208.
63. Easterbrook PJ. Non-progression in HIV infection. *Aids* 1994,8:1179-1182.
64. Levy JA. HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 1993,7:1427-1433.
65. Pantaleo G, Menzo S, Vaccarezza M, et al. Studies in subjects with long-term nonprogressive human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1995,332:209-216.
66. Sheppard HW, Lang W, Ascher MS, Vittinghoff E, Winkelstein W. The characterization of non-progressors: long-term HIV-1 infection with stable CD4+ T-cell levels. *AIDS* 1993,7:1159-1166.
67. Schragger L, Young J, Fowler M, Mathieson B, Vermund S. Long-term survivors of HIV-1 infection: definitions and research challenges. *AIDS* 1994,8:95-108.
68. Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Microbiol* 1996,50:825-854.
69. European Collaborative Study. Children born to women with HIV-1 infection: natural history and risk of transmission. *Lancet* 1991,337:253-260.
70. Blanche S, Tardieu M, Duliege A, et al. Longitudinal study of 94 symptomatic infants with perinatally acquired human immunodeficiency virus infection. Evidence for a bimodal expression of clinical and biological symptoms. *Am J Dis Child* 1990,144:1210-1215.
71. Bryson YJ, Luzuriaga K, Sullivan JL, Wara DW. Proposed definitions for in utero versus intrapartum transmission of HIV-1 [letter]. *Presse Med* 1992,21:1686.
72. Tovo PA, de Martino M, Gabiano C, et al. Prognostic factors and survival in children with perinatal HIV-1 infection. The Italian Register for HIV Infections in Children. *Lancet* 1992,339:1249-1253.
73. Italian Register HIVc. Features of children perinatally infected with HIV-1 surviving longer than 5 years. *Lancet* 1994,343:191-195.

74. Oxtoby M. Vertically acquired HIV infection in the United States. In: *Pediatric AIDS: the challenge of HIV infection in infants, children, and adolescents*. Edited by Pizzo PA, Wilfert C. 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994:3-20.
75. Des Jarlais DC, Friedman SR, Choopanya K, Vanichseni S, Ward TP. International epidemiology of HIV and AIDS among injecting drug users. *Aids* 1992,6:1053-1068.
76. Mann JM, Tarantola DJ. AIDS in the World II. Global dimensions, social roots, and response. New York: Oxford University Press; 1996.
77. Fernandez Sierra MA, Gomez Olmedo M, Delgado Rodriguez M, Galvez Vargas R. [Infection by the human immunodeficiency virus in the Spanish population (II). A meta-analysis of the time and geographic trends]. *Med Clin (Barc)* 1990,95:366-371.
78. CDCP. Center for Diseases Control Prevention. Revised classification system for HIV-1 infection in children less than 13 years of age. *MMWR* 1994,43:1-13.
79. Connor EM, Sperling RS, Gelber R, *et al.* Reduction of maternal-infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076 Study Group. *N Engl J Med* 1994,331:1173-1180.
80. Leitner T. Genetic subtypes of HIV-1. In: *Human retroviruses and AIDS*. Edited by Laboratory NLAN. Los Alamos; 1996:28-40.
81. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970,226:1209-1211.
82. Kostrikis LG, Bagdades E, Cao Y, Zhang L, Dimitriou D, Ho DD. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 strains from patients in Cyprus: identification of a new subtype designated subtype I. *J Virol* 1995,69:6239-6248.
83. Temin H, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970,226:1211-1213.
84. McDougal J, Kennedy M, Sligh J, Cort S, Mawle A, Nicholson J. Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* 1986,231:382-385.
85. Powderly WG, Landay A, Lederman MM. Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: the end of opportunism? *JAMA* 1998,280:72-77.
86. Connors M, Kovacs JA, Krevat S, *et al.* HIV infection induces changes in CD4+ T-cell phenotype and depletions within the CD4+ T-cell repertoire that are not immediately restored by antiviral or immune-based therapies. *Nat Med* 1997,3:533-540.
87. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, *et al.* Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging. *J Clin Invest* 1989,84:1892-1899.
88. Margolick JB, Munoz A, Donnenberg AD, *et al.* Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. The Multicenter AIDS Cohort Study. *Nat Med* 1995,1:674-680.
89. Stanley SK, Fauci AS. T-cell homeostasis in HIV infection: part of the solution, or part of the problem? *J AIDS* 1993,6:142-143.
90. Choremi-Papadopoulou H, Viglis V, Gargalianos P, Kordossis T, Iniotaki-Theodoraki A, Kosmidis J. Down-regulation of CD28 surface antigen on CD4+ and CD8+ T lymphocytes during HIV-1 infection. *J AIDS* 1994,7:245-253.

91. Borthwick NJ, Bofill M, Gombert WM, *et al.* Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28- T cells. *Aids* 1994,8:431-441.
92. Spina CA, Prince HE, Richman DD. Preferential replication of HIV-1 in the CD45RO memory cell subset of primary CD4 lymphocytes in vitro. *J Clin Invest* 1997,99:1774-1785.
93. Resino S, Gurbindo D, Cano JM, Sanchez-Ramon S, Muoz-Fernandez MA. Predictive markers of clinical outcome in vertically HIV-1-infected infants. A prospective longitudinal study. *Pediatr Res* 2000,47:509-515.
94. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, *et al.* HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987,328:345-348.
95. Gurbindo D, Resino S, Sánchez-Ramón S, León JA, Muñoz-Fernández MA. Neurological manifestations of HIV-1 infection in infants: viro-immunologic markers. *Neuropediatrics* 1999,30:197-204.
96. Giorgi JV, Ho HN, Hirji K, *et al.* CD8+ lymphocyte activation at human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: development of HLA-DR+ CD38-CD8+ cells is associated with subsequent stable CD4+ cell levels. *J Infect Dis* 1994,170:775-781.
97. Mocroft A, Bofill M, Lipman M, *et al.* CD8+,CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997,14:158-162.
98. Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, *et al.* Elevated relative fluorescence intensity of CD38 antigen expression on CD8+ T cells is a marker of poor prognosis in HIV infection: results of 6 years of follow-up. *Cytometry* 1996,26:1-7.
99. Kammerer R, Iten A, Frei PC, Burgisser P. Expansion of T cells negative for CD28 expression in HIV infection. Relation to activation markers and cell adhesion molecules, and correlation with prognostic markers. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1996,185:19-25.
100. Carmichael A, Jin X, Sissons P, Borysiewicz L. Quantitative analysis of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) response at different stages of HIV-1 infection: differential CTL responses to HIV-1 and Epstein-Barr virus in late disease. *J Exp Med* 1993,177:249-256.
101. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995,270:1811-1815.
102. Zanussi S, D'Andrea M, Simonelli C, Tirelli U, DePaoli P. Serum levels of RANTES and MIP-1a in HIV-positive long-term survivors and progressor patients. *AIDS* 1996,10:1431-1432.
103. Scala E, D'Offizi G, Rosso R, *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* 1997,158:4485-4492.
104. Reddy M, Goetz R, Gorman J, Grieco M, Chess L, Lederman S. Human immunodeficiency virus type-1 infection of homosexual men is accompanied by a decrease in circulating B cells. *J AIDS* 1991,4:428-434.
105. Amadori A, Chieco-Bianchi L. B-cell activation and HIV-1 infection: deeds and misdeeds. *Immunol Today* 1990,11:374-379.
106. Rieckmann P, Poli G, Kehrl JH, Fauci AS. Activated B lymphocytes from human immunodeficiency virus-infected individuals induce virus expression in infected T cells and a promonocytic cell line, U1. *J Exp Med* 1991,173:1-5.

107. Mazza DS, Grieco MH, Reddy MM, Meriney D. Serum IgE in patients with human immunodeficiency virus infection. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995,74:411-414.
108. de Martino M, Rossi ME, Azzari C, Chiarelli F, Galli L, Vierucci A. Interleukin-6 synthesis and IgE overproduction in children with perinatal human immunodeficiency virus-type 1 infection. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999,82:212-216.
109. Vigano A, Balotta C, Trabattoni D, et al. Virologic and immunologic markers of disease progression in pediatric HIV infection. *AIDS Res Hum Retrovir* 1996,12:1255-1262.
110. Rodriguez C, Thomas JK, O'Rourke S, Stiehm ER, Plaeger S. HIV disease in children is associated with a selective decrease in CD23+ and CD62L+ B cells. *Clin Immunol Immunopathol* 1996,81:191-199.
111. **CEVIHP**. Colaborativo Español para la infección VIH pediátrica. Manual práctico de la infección por VIH en el niño. 2ª ed. Barcelona-Philadelphia: Claudia Fortuny Guasch; 2000.
112. Goedert JJ, Duliege AM, Amos CI, Felton S, Biggar RJ. High risk of HIV-1 infection for first-born twins. The International Registry of HIV-exposed Twins [see comments]. *Lancet* 1991,338:1471-1475.
113. Simonon A, Lepage P, Karita E, et al. An assessment of the timing of mother-to-child transmission of human immunodeficiency virus type 1 by means of polymerase chain reaction. *J Acquir Immun Def Syndr* 1994:952-957.
114. Mofenson L, Wolinsky S. Vertical Transmission. In: *Pediatric AIDS*. Baltimore: Wilians & Wilkins. Edited by En Pizzo PA WC. 2th ed. Philadelphia; 1993:179-203.
115. Mayaux MJ, Burgard M, Teglas JP, et al. Neonatal characteristics in rapidly progressive perinatally acquired HIV-1 disease. The French Pediatric HIV Infection Study Group. *JAMA* 1996,275:606-610.
116. Navarro M, Gurbindo D, Sampelayo T, Muñoz-Fernández MA. SIDA pediátrico. *Medicine* 1998,7:3990-3998.
117. Maldonado Y. Human immunodeficiency virus HIV and acquired immunodeficiency syndrome. In: *Principle and practice of Pediatric Infectious Disease*. Edited by Livingston Ca. 4th ed; 1997:2169-2226.
118. Eastman PS, Shapiro DE, Coombs RW, et al. Maternal viral genotypic zidovudine resistance and infrequent failure of zidovudine therapy to prevent perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1 in pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 076. *J Infect Dis* 1998,177:557-564.
119. Samson M, Libert F, Doranz B, et al. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996,382:722-725.
120. Huang Y, Paxton W, Wolinsky S, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996,2:1240-1243.
121. Study TEC. Natural history of vertically acquired human immunodeficiency virus infection. *Pediatrics* 1994:815-819.
122. Barnhart HX, Caldwell MB, Thomas P, et al. Natural history of human immunodeficiency virus disease in perinatally infected children: an analysis from the Pediatric Spectrum of Disease Project. *Pediatrics* 1996,97:710-716.
123. Galli L, De Martino M, Tovo PA, et al. Onset of clinical signs in children with HIV-1 perinatal infection. *AIDS* 1995,9:455-461.

124. Leroy V, Newell ML, Dabis F, *et al.* International multicentre pooled analysis of late postnatal mother-to-child transmission of HIV-1 infection. Ghent International Working Group on Mother-to-Child Transmission of HIV [published erratum appears in *Lancet* 1998 Oct 3;352(9134):1154] [see comments]. *Lancet* 1998;352:597-600.
125. Resino S, Gurbindo D, Navarro J, Sánchez-Ramón S, León JA, Muñoz-Fernández MA. Prognostic markers in naive infants younger than two months of age with HIV-1 infection. *Pediatrics and Related Topics (Padiatr Grenzgeb)* 1999;38:431-446.
126. Resino S, Jiménez JL, Gurbindo D, Navarro J, Abad ML, Muñoz-Fernández MA. Infección primaria en niños VIH-1 infectados verticalmente: características biológicas de los aislados virales, carga viral y linfocitos T CD4+. *An Esp Padiatr* 1999;51:469-474.
127. Pliner V, Weedon J, Thomas PA, *et al.* Incubation period of HIV-1 in perinatally infected children. New York City Perinatal HIV Transmission Collaborative Study Group. *AIDS* 1998;12:759-766.
128. Blanche S, Newell ML, Mayaux MJ, *et al.* Morbidity and mortality in European children vertically infected by HIV-1. The French Pediatric HIV Infection Study Group and European Collaborative Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;14:442-450.
129. Denny T, Yogev R, Gelman R, *et al.* Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. *JAMA* 1992;267:1484-1488.
130. de Vries E, de Bruin-Versteeg S, Comans-Bitter WM, *et al.* Longitudinal survey of lymphocyte subpopulations in the first year of life. *Pediatr Res* 2000;47:528-537.
131. Pediatric European Network for treatment of AIDS (PENTA). HIV-1 viral load and CD4 cell count in untreated children with vertically acquired asymptomatic or mild disease. *AIDS* 1998;12:F1-F8.
132. Fauci AS, Schnittman SM, Poli G, Koenig S, Pantaleo G. NIH conference. Immunopathogenic mechanisms in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1991;114:678-693.
133. Lange JM, de Wolf F, Goudsmit J. Markers for progression in HIV infection. *AIDS* 1989;3:S153-160.
134. Phillips AN, Sabin CA, Elford J, Bofill M, Lee CA, Janossy G. CD8 lymphocyte counts and serum immunoglobulin A levels early in HIV infection as predictors of CD4 lymphocyte depletion during 8 years of follow-up. *AIDS* 1993;7:975-980.
135. Anderson RE, Shiboski SC, Royce R, Jewell NP, Lang W, Winkelstein W, Jr. CD8+ T lymphocytes and progression to AIDS in HIV-infected men: some observations. *AIDS* 1991;5:213-215.
136. Chevret S, Roquin H, Ganne P, Lefrere JJ. Prognostic value of an elevated CD8 lymphocyte count in HIV infection. Results of a prospective study of 152 asymptomatic HIV-positive individuals. *AIDS* 1992;6:1349-1352.
137. Navarro J, Resino S, Bellón JM, *et al.* Association of CD8+ T lymphocyte subsets with the most commonly used markers to monitor HIV-1 infection in children treated with highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17:525-532.
138. Muñoz-Fernández MA. Estudio de resistencias antirretrovirales en el niño: del laboratorio a la clínica. Primera Edición ed: ReproDigita; 2001.

139. Resino S, Navarro J, Bellón JM, Gurbindo D, León JA, Muñoz-Fernández MA. Naïve and memory CD4+ T-cells and T-cell activation markers in HIV-1 infected children on HAART. *Clin Exp Immunol* 2001,125:266-273.
140. Sánchez-Ramón S, Bellón JM, Resino S, *et al.* Low blood CD8+ T-lymphocytes and high circulating monocytes are predictors of HIV-1-associated progressive encephalopathy in children. *Pediatrics* 2003,111:e168-e175.
141. Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocidalo JJ, Bach BA. The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin Exp Immunol* 1992,90:376-382.
142. Resino S, Bellón JM, Sanchez-Ramon S, Gurbindo D, León J, Muñoz-Fernandez MA. CD8+ T-cells predict viral response to highly active antiretroviral therapy in HIV-1-infected children. *Pediatr Res* 2003:In Press.
143. Resino S, Jiménez JL, Gurbindo D, Muñoz-Fernández MA. Marcadores predictivos de supervivencia en niños menores de 12 meses de edad infectados verticalmente por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Med Clin (Barc)* 1999,113:561-566.
144. McIntosh K, Shevitz A, Zaknun D, *et al.* Age- and time-related changes in extracellular viral load in children vertically infected by human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 1996,15:1087-1091.
145. Palumbo PE, Raskino C, Fiscus S, *et al.* Predictive value of quantitative plasma HIV RNA and CD4+ lymphocyte count in HIV-infected infants and children. *JAMA* 1998,279:756-761.
146. Shearer WT, Quinn TC, LaRussa P, *et al.* Viral load and disease progression in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. Women and Infants Transmission Study Group. *N Engl J Med* 1997,336:1337-1342.
147. Mellors JW, Munoz A, Giorgi JV, *et al.* Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* 1997,126:946-954.
148. Mofenson LM, Korelitz J, Meyer WA, 3rd, *et al.* The relationship between serum human immunodeficiency virus type 1 (HIV- 1) RNA level, CD4 lymphocyte percent, and long-term mortality risk in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *J Infect Dis* 1997,175:1029-1038.
149. Valentine ME, Jackson CR, Vavro C, *et al.* Evaluation of surrogate markers and clinical outcomes in two-year follow-up of eighty-six human immunodeficiency virus-infected pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J* 1998,17:18-23.
150. Muñoz-Fernandez MA, Obregon E, Navarro J, *et al.* Relationship of virologic, immunologic, and clinical parameters in infants with vertically acquired human immunodeficiency virus type 1 infection. *Pediatr Res* 1996,40:597-602.
151. Pizzo PA, Wilfert CM. Markers and determinants of disease progression in children with HIV infection. The Pediatric AIDS Siena Workshop II. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1995,8:30-44.
152. De Jose MI, Ramos JT, Alvarez S, Jimenez J, Muñoz-Fernandez MA. Vertical transmission of HIV-1 Variants resistant to reverse transcriptase and protease inhibitors. *Arch Intern Med* 2001,161:2738-2739.
153. Spijkerman I, de Wolf F, Langendam M, Schuitemaker H, Coutinho R. Emergence of syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 variants coincides with a transient increase in viral RNA level and is an independent predictor for progression to AIDS. *J Infect Dis* 1998,178:397-403.

154. Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, *et al.* Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989,86:3322-3326.
155. Muñoz-Fernández MA, Navarro J, Obregón E, Arias RA, Gurbindo MD, Sampelayo TH. Immunological and virological markers of disease progression in HIV-1 infected children. *Acta Paediatr Suppl* 1997,421:46-51.
156. Resino S, Ma Bellon J, Gurbindo D, Tomas Ramos J, Ruiz Contreras J, Angeles Munoz-Fernandez M. [Prognostic markers of progression to aids in infants vertically infected by human immunodeficiency virus type-1] [In Process Citation]. *Med Clin (Barc)* 2000,115:564-567.
157. Nixon DF, Broliden K, Ogg G, Broliden PA. Cellular and humoral antigenic epitopes in HIV and SIV. *Immunology* 1992,76:515-534.
158. Paul WE. Can the immune response control HIV infection? *Cell* 1995,82:177-182.
159. Westby M, Manca F, Dalgleish AG. The role of host immune responses in determining the outcome of HIV infection. *Immunol Today* 1996,17:120-126.
160. Haigwood NL, Zolla-Pazner S. Humoral immunity to HIV, SIV, and SHIV. *Aids* 1998,12 Suppl A:S121-132.
161. Parren PW, Burton DR, Sattentau QJ. HIV-1 antibody--debris or virion? *Nat Med* 1997,3:366-367.
162. Gandhi RT, Walker BD. Immunologic control of HIV-1. *Annu Rev Med* 2002,53:149-172.
163. Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *Aids* 1999,13 Suppl A:S137-162.
164. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, *et al.* Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996,12:593-610.
165. Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* 2000,6:207-210.
166. Baba TW, Liska V, Hofmann-Lehmann R, *et al.* Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* 2000,6:200-206.
167. Beaumont T, van Nuenen A, Broersen S, Blattner WA, Lukashov VV, Schuitemaker H. Reversal of human immunodeficiency virus type 1 IIIB to a neutralization-resistant phenotype in an accidentally infected laboratory worker with a progressive clinical course. *J Virol* 2001,75:2246-2252.
168. Chackerian B, Rudensey LM, Overbaugh J. Specific N-linked and O-linked glycosylation modifications in the envelope V1 domain of simian immunodeficiency virus variants that evolve in the host alter recognition by neutralizing antibodies. *J Virol* 1997,71:7719-7727.
169. Reitter JN, Means RE, Desrosiers RC. A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat Med* 1998,4:679-684.
170. Alcamí J. Inmunopatología del SIDA. In: *Manual del SIDA*. Edited by Soriano V, Gonzalez-Lahoz J. Madrid: IDEPSA; 1999:58-81.
171. Walker BD, Flexner C, Paradis TJ, *et al.* HIV-1 reverse transcriptase is a target for cytotoxic T lymphocytes in infected individuals. *Science* 1988,240:64-66.

172. Addo MM, Altfeld M, Rosenberg ES, *et al.* The HIV-1 regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001,98:1781-1786.
173. Yang OO, Walker BD. CD8+ cells in human immunodeficiency virus type I pathogenesis: cytolytic and noncytolytic inhibition of viral replication. *Adv Immunol* 1997,66:273-311.
174. Yang OO, Kalams SA, Rosenzweig M, *et al.* Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1996,70:5799-5806.
175. Wagner L, Yang OO, Garcia-Zepeda EA, *et al.* Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* 1998,391:908-911.
176. Hadida F, Vieillard V, Autran B, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Debre P. HIV-specific T cell cytotoxicity mediated by RANTES via the chemokine receptor CCR3. *J Exp Med* 1998,188:609-614.
177. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994,68:6103-6110.
178. Brodie SJ, Patterson BK, Lewinsohn DA, *et al.* HIV-specific cytotoxic T lymphocytes traffic to lymph nodes and localize at sites of HIV replication and cell death. *J Clin Invest* 2000,105:1407-1417.
179. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, *et al.* Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998,188:2205-2213.
180. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, *et al.* HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000,192:63-75.
181. Champagne P, Ogg GS, King AS, *et al.* Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001,410:106-111.
182. Schwartz D, Sharma U, Busch M, *et al.* Absence of recoverable infectious virus and unique immune responses in an asymptomatic HIV+ long-term survivor. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994,10:1703-1711.
183. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 1997,278:1462-1464.
184. Kalams SA, Goulder PJ, Shea AK, *et al.* Levels of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T- lymphocyte effector and memory responses decline after suppression of viremia with highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 1999,73:6721-6728.
185. Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, *et al.* HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med* 1999,5:518-525.
186. Harari A, Rizzardi GP, Ellefsen K, *et al.* Analysis of HIV-1- and CMV-specific memory CD4 T-cell responses during primary and chronic infection. *Blood* 2002,100:1381-1387.
187. Evans LA, Thomson-Honniebier G, Steimer K, *et al.* Antibody-dependent cellular cytotoxicity is directed against both the gp120 and gp41 envelope proteins of HIV. *Aids* 1989,3:273-276.

188. Cai Q, Huang XL, Rappocciolo G, Rinaldo CR, Jr. Natural killer cell responses in homosexual men with early HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990,3:669-676.
189. McMichael AJ, Phillips RE. Escape of human immunodeficiency virus from immune control. *Annu Rev Immunol* 1997,15:271-296.
190. Goulder PJ, Rowland-Jones SL, McMichael AJ, Walker BD. Anti-HIV cellular immunity: recent advances towards vaccine design. *Aids* 1999,13 Suppl A:S121-136.
191. Brander C, Walker BD. Modulation of host immune responses by clinically relevant human DNA and RNA viruses. *Curr Opin Microbiol* 2000,3:379-386.
192. Coffin JM. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* 1995,267:538-539.
193. Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996,2:338-342.
194. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998,391:397-401.
195. Le Gall S, Erdtmann L, Benichou S, *et al.* Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* 1998,8:483-495.
196. Cohen GB, Gandhi RT, Davis DM, *et al.* The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity* 1999,10:661-671.
197. Graham BS. Clinical trials of HIV vaccines. *Annu Rev Med* 2002,53:207-221.
198. Kovacs JA, Vogel S, Albert JM, *et al.* Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1996,335:1350-1356.
199. David D, Nait-Ighil L, Dupont B, Maral J, Gachot B, Theze J. Rapid effect of interleukin-2 therapy in human immunodeficiency virus-infected patients whose CD4 cell counts increase only slightly in response to combined antiretroviral treatment. *J Infect Dis* 2001,183:730-735.
200. Dhodapkar MV, Bhardwaj N. Active immunization of humans with dendritic cells. *J Clin Immunol* 2000,20:167-174.
201. Fong L, Engleman EG. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2000,18:245-273.
202. Lu W, Wu X, Lu Y, Guo W, Andrieu JM. Therapeutic dendritic-cell vaccine for simian AIDS. *Nat Med* 2003,9:27-32.
203. Davis NL, Caley IJ, Brown KW, *et al.* Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol* 2000,74:371-378.
204. Amara RR, Villinger F, Altman JD, *et al.* Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001,292:69-74.
205. Rodewald HR. The thymus in the age of retirement. *Nature* 1998,396:630-631.
206. Steinmann GG. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol* 1986,75:43-88.
207. George AJ, Ritter MA. Thymic involution with ageing: obsolescence or good housekeeping? [see comments]. *Immunol Today* 1996,17:267-272.

208. Mackall CL, Gress RE. Thymic aging and T-cell regeneration. *Immunol Rev* 1997,160:91-102.
209. Muller-Hermelink HK, Steinmann G, Stein H. Structural and functional alterations of the aging human thymus. *Adv Exp Med Biol* 1982,149:303-312.
210. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, *et al.* Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 1998,396:690-695.
211. Bogue M, Roth DB. Mechanism of V(D)J recombination. *Curr. Opin. Immunol.* 1996,8:3261-3270.
212. Fujimoto S, Yamagishi H. Isolation of an excision product of T-cell receptor alpha-chain gene rearrangements. *Nature* 1987,327:242-243.
213. Okazaki K, Davis DD, Sakano H. T cell receptor beta gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D-J joining. *Cell* 1987,49:477-485.
214. Kong F, Chen CH, Cooper MD. Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity* 1998,8:97-104.
215. Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol* 1996,16:609-618.
216. Takeshita S, Toda M, Yamagishi H. Excision products of the T cell receptor gene support a progressive rearrangement model of the alpha/delta locus. *Embo J* 1989,8:3261-3270.
217. Autran B, Carcelain G, Li TS, *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease [see comments]. *Science* 1997,277:112-116.
218. Pakker NG, Notermans DW, de Boer RJ, *et al.* Biphasic kinetics of peripheral blood T cells after triple combination therapy in HIV-1 infection: a composite of redistribution and proliferation. *Nat Med* 1998,4:208-214.
219. Gibb DM, Newberry A, Klein N, de Rossi A, Grosch-Woerner I, Babiker A. Immune repopulation after HAART in previously untreated HIV-1-infected children. Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) Steering Committee. *Lancet* 2000,355:1331-1332.
220. Lange CG, Lederman MM. Immune reconstitution with antiretroviral therapies in chronic HIV-1 infection. *J Antimicrob Chemother* 2003,51:1-4.
221. McLean AR, Michie CA. In vivo estimates of division and death rates of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995,92:3707-3711.
222. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 2002,417:95-98.
223. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE. T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 1997,18:245-251.
224. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, *et al.* Distinctions between CD8+ and CD4+ T-cell regenerative pathways result in prolonged T-cell subset imbalance after intensive chemotherapy. *Blood* 1997,89:3700-3707.
225. Mackall CL, Bare CV, Granger LA, Sharrow SO, Titus JA, Gress RE. Thymic-independent T cell regeneration occurs via antigen-driven expansion of peripheral T cells resulting in a repertoire that is limited in diversity and prone to skewing. *J Immunol* 1996,156:4609-4616.
226. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, *et al.* Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 1995,373:117-122.
227. Perelson AS, Essunger P, Cao Y, *et al.* Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 1997,387:188-191.

228. Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, *et al.* Treatment of Human Immunodeficiency Virus Infection with Saquinavir, Zidovudine, and Zalcitabine. *N Engl J Med* 1996,334:1011-1018.
229. Gulick R, Mellors J, Havlir D, *et al.* Treatment with indinavir, zidovudine, and lamivudine in adults with human immunodeficiency virus infection and prior antiretroviral therapy. *N Engl J Med* 1997,337:734-739.
230. Kohl NE, Emini EA, Schleif WA, *et al.* Active human immunodeficiency virus protease is required for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988,85:4686-4690.
231. Markowitz M, Mo H, Kempf DJ, *et al.* Selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor. *J Virol* 1995,69:701-706.
232. Deeks SG, Smith M, Holodny M, Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *JAMA* 1997,277:145-153.
233. Farnet CM, Bushman FD. HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development. *AIDS* 1996,10:S3-11.
234. CDCP. Guidelines for use of antiretroviral agents in pediatric HIV infection. *MMWR* 1998,47:RR-4.
235. Richman DD, Guatelli JC, Grimes J, Tsiatis A, Gingeras T. Detection of mutations associated with zidovudine resistance in human immunodeficiency virus by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991,164:1075-1081.
236. Bryant ML, Ratner L, Duronio RJ, *et al.* Incorporation of 12-methoxydodecanoate into the human immunodeficiency virus 1 gag polyprotein precursor inhibits its proteolytic processing and virus production in a chronically infected human lymphoid cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991,88:2055-2059.
237. McNeely TB, Dealy M, Dripps DJ, Orenstein JM, Eisenberg SP, Wahl SM. Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro. *J Clin Invest* 1995,96:456-464.
238. Navarro J, Punzon MC, Pizarro A, Fernandez Cruz E, Fresno M, Munoz Fernandez MA. Pentoxifylline inhibits acute HIV-1 replication in human T cells by a mechanism not involving inhibition of tumour necrosis factor synthesis or nuclear factor-kappa B activation. *AIDS* 1996,10:469-475.
239. Alvarez S, Jiménez J, Muñoz-Fernández M. Técnicas de secuenciación del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana y su aplicación en la practica clinica pediátrica. *Acta pediátrica española (sometido)* 2000.
240. Resino S, Alonso Arias R, Jiménez JL, Gurbindo D, Muñoz-Fernández MA. Determinación de la carga viral para el diagnóstico precoz de la infección perinatal por VIH-1. *An Esp Pediat* 1998:60-64.
241. Muñoz-Fernández MA. Diagnóstico virológico de la infección en el niño. *Revista de Inmunología clínica y Alergología pediátrica* 1998:117-124.
242. Muñoz-Fernández MA. Aplicación de la PCR al diagnóstico de la Infección por VIH. *En Reuniones de Consenso sobre la infección por VIH. Diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH, Marcadores de Progresión.* 1994:63-73.
243. Group TPV. Center for Diseases Control and Prevention. Revised classification system for HIV-1 infection in children less than 13 years of age
A randomized double-blind trial of the addition of lamivudine or matching placebo to current nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitor therapy in HIV-1 infected children: The PENTA-4 trial. *MMWR* 1994,43:1-13.

244. CDCP. Center for Diseases Control Prevention. Revised for guiedlines for performing CD4+ T-cell determinations in persons with human immunodeficiency virus (HIV). *MMWR* 1997,46:1-29.
245. Landay A, Ohlsson-Wilhelm B, Giorgi JV. Application of flow cytometry to the study of HIV infection. *AIDS* 1990,4:479-497.
246. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* 1996,26:227-230.
247. Nicholson JK, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Cytometry* 1996,26:16-21.
248. Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 1985:563.
249. Armitage P, Berry G. Métodos no paramétricos. In: *Estadística para la investigación Biomédica*. Edited by Doyma. Barcelona; 1992:477-492.
250. Alvarez R. Estadística no paramétrica. El procedimiento Npar. In: *Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS*. Edited by Santos Dd. Madrid; 1995:305-382.
251. Martínez MA, Irala Jd, López I. Introducción a los modelos multivariados. In: *Bioestadística amigable*. Edited by Martínez MA: Díaz de Santos; 2001:465-494.
252. Martínez MA, Calasanz MJ. Variables cuantitativas: comparación de la media entre dos grupos. In: *Bioestadística amigable*. Edited by Martínez MA: Díaz de Santos; 2001:211-258.
253. Armitage P, Berry G. Comparación de varios grupos. In: *Estadística para la investigación Biomédica*. Edited by Doyma. Barcelona; 1992:217-249.
254. Bonyhadi ML, Rabin L, Salimi S, *et al.* HIV induces thymus depletion in vivo. *Nature* 1993,363:728-732.
255. Schuitemaker H, Koot M, Kootstra NA, Derksen MW, de Goede RE, Van Steenwijk RP. Biological phenotype of human immunodeficiency virus tipe 1 clones at different stages of infection: progression of the disease is associated with a shift from monocytotropic to T-cell-tropic virus population. *J Virol* 1992:1354-1360.
256. Katzenstein TL, Nielsen C, Bruun L, Mathiesen LR, Pedersen C, Gerstoft J. Quantification of HIV-1 RNA during antiretroviral therapy: association with viral phenotype and development of resistance. *Antivir Ther* 1996,1:246-254.
257. Koot M, Keet IP, Vos AH, De G, Roos MT, Coutinho RA. Prognostic value of HIV-1 biological phenotype for rate of CD4+ count cell depletion and progression to AIDS. *Ann Intern Med* 1993:681-688.
258. Chene L, Nugeyre MT, Guillemard E, Moulian N, Barre-Sinoussi F, Israel N. 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* 1999,73:7533-7542.
259. McCune JM, Loftus R, Schmidt DK, *et al.* High prevalence of thymic tissue in adults with human immunodeficiency virus-1 infection [see comments]. *J Clin Invest* 1998,101:2301-2308.
260. Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, *et al.* Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 2001,7:73-79.

261. Mastroianni CM, Forcina G, d'Ettorre G, *et al.* Circulating levels of interleukin-7 in antiretroviral-naive and highly active antiretroviral therapy-treated HIV-infected patients. *HIV Clin Trials* 2001,2:108-112.
262. Llano A, Barretina J, Gutierrez 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* 2001,75:10319-10325.
263. Darcissac EC, Vidal V, De La Tribonniere X, Mouton Y, Bahr GM. Variations in serum IL-7 and 90K/Mac-2 binding protein (Mac-2 BP) levels analysed in cohorts of HIV-1 patients and correlated with clinical changes following antiretroviral therapy. *Clin Exp Immunol* 2001,126:287-294.
264. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* 2004,103:966-972.
265. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, *et al.* HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 2003,198:1909-1922.
266. Palmer BE, Boritz E, Blyveis N, Wilson CC. Discordance between frequency of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific gamma interferon-producing CD4(+) T cells and HIV-1-specific lymphoproliferation in HIV-1-infected subjects with active viral replication. *J Virol* 2002,76:5925-5936.
267. Boaz MJ, Waters A, Murad S, Easterbrook PJ, Vyakarnam A. Presence of HIV-1 Gag-specific IFN-gamma+IL-2+ and CD28+IL-2+ CD4 T cell responses is associated with nonprogression in HIV-1 infection. *J Immunol* 2002,169:6376-6385.
268. Miedema F, Petit AJ, Terpstra FG, *et al.* Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)- infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *J Clin Invest* 1988,82:1908-1914.
269. Palella FJ, Jr., Delaney KM, Moorman AC, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998,338:853-860.
270. Valdez H, Chowdhry TK, Asaad R, *et al.* Changing spectrum of mortality due to human immunodeficiency virus: analysis of 260 deaths during 1995--1999. *Clin Infect Dis* 2001,32:1487-1493.
271. de Martino M, Tovo PA, Balducci M, *et al.* Reduction in mortality with availability of antiretroviral therapy for children with perinatal HIV-1 infection. Italian Register for HIV Infection in Children and the Italian National AIDS Registry. *Jama* 2000,284:190-197.
272. Kelleher AD, Carr A, Zaunders J, Cooper DA. Alterations in the immune response of human immunodeficiency virus (HIV)-infected subjects treated with an HIV-specific protease inhibitor, ritonavir. *J Infect Dis* 1996,173:321-329.
273. Li TS, Tubiana R, Katlama C, Calvez V, Ait Mohand H, Autran B. Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* 1998,351:1682-1686.
274. Cameron DW, Heath-Chiozzi M, Danner S, *et al.* Randomised placebo-controlled trial of ritonavir in advanced HIV-1 disease. The Advanced HIV Disease Ritonavir Study Group. *Lancet* 1998,351:543-549.

275. Hammer S, Squires K, Hughes M, et al. A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. *N Engl J Med* 1997,337:725-733.
276. Stellbrink HJ, van Lunzen J. Lymph nodes during antiretroviral therapy. *Curr Opin Infect Dis* 2001,14:17-22.
277. Connick E, Lederman MM, Kotzin BL, et al. Immune reconstitution in the first year of potent antiretroviral therapy and its relationship to virologic response. *J Infect Dis* 2000,181:358-363.
278. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998,279:2103-2106.
279. Steinmann GG, Klaus B, Muller-Hermelink HK. The involution of the ageing human thymic epithelium is independent of puberty. A morphometric study. *Scand J Immunol* 1985,22:563-575.
280. Sempowski GD, Hale LP, Sundry JS, et al. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J Immunol* 2000,164:2180-2187.
281. Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, et al. Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 1999,103:453-460.
282. Valdez H, Smith KY, Landay A, et al. Response to immunization with recall and neoantigens after prolonged administration of an HIV-1 protease inhibitor-containing regimen. ACTG 375 team. AIDS Clinical Trials Group. *Aids* 2000,14:11-21.
283. Al-Harthi L, Landay A. Immune recovery in HIV disease: role of the thymus and T cell expansion in immune reconstitution strategies. *J Hematother Stem Cell Res* 2002,11:777-786.
284. Angel JB, Parato KG, Kumar A, et al. Progressive human immunodeficiency virus-specific immune recovery with prolonged viral suppression. *J Infect Dis* 2001,183:546-554.
285. Blankson JN, Gallant JE, Siliciano RF. Proliferative responses to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antigens in HIV-1-infected patients with immune reconstitution. *J Infect Dis* 2001,183:657-661.
286. Rosenberg ES, Altfeld M, Poon SH, et al. Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* 2000,407:523-526.
287. Al-Harthi L, Siegel J, Spritzler J, Pottage J, Agnoli M, Landay A. Maximum suppression of HIV replication leads to the restoration of HIV-specific responses in early HIV disease. *Aids* 2000,14:761-770.
288. Jamieson BD, Douek DC, Killian S, et al. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity* 1999,10:569-575.
289. Flores KG, Li J, Sempowski GD, Haynes BF, Hale LP. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J Clin Invest* 1999,104:1031-1039.
290. Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Age, thymopoiesis, and CD4+ T-lymphocyte regeneration after intensive chemotherapy [see comments]. *N Engl J Med* 1995,332:143-149.
291. Hazenberg MD, Otto SA, Stuart JW, 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. *Nat Med* 2000,6:1036-1042.

292. Hazenberg MD, Borghans JA, de Boer RJ, Miedema F. Thymic output: a bad TREC record. *Nat Immunol* 2003,4:97-99.
293. Mackall CL, Granger L, Sheard MA, Cepeda R, Gress RE. T-cell regeneration after bone marrow transplantation: differential CD45 isoform expression on thymic-derived versus thymic-independent progeny. *Blood* 1993,82:2585-2594.
294. Douek DC, Koup RA, McFarland RD, Sullivan JL, Luzuriaga K. Effect of HIV on thymic function before and after antiretroviral therapy in children. *J Infect Dis* 2000,181:1479-1482.
295. De Rossi A, Walker AS, Klein N, De Forni D, King D, Gibb DM. Increased thymic output after initiation of antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children in the Paediatric European Network for Treatment of AIDS (PENTA) 5 Trial. *J Infect Dis* 2002,186:312-320.
296. Douek DC, Betts MR, Hill BJ, *et al.* Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J Immunol* 2001,167:6663-6668.
297. Tanchot C, Rocha B. The peripheral T cell repertoire: independent homeostatic regulation of virgin and activated CD8+ T cell pools. *Eur J Immunol* 1995,25:2127-2136.
298. Haynes BF. HIV infection and the dynamic interplay between the thymus and the peripheral T cell pool. *Clin Immunol* 1999,92:3-5.
299. Sempowski GD, Haynes BF. Immune reconstitution in patients with HIV infection. *Annu Rev Med* 2002,53:269-284.
300. Ye P, Kourtis AP, Kirschner DE. The effects of different HIV type 1 strains on human thymic function. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002,18:1239-1251.
301. Haynes BF, Hale LP. The human thymus. A chimeric organ comprised of central and peripheral lymphoid components [corrected and republished in *Immunol Res* 1998;18(3):175-92]. *Immunol Res* 1998,18:61-78.
302. Mehr R, Perelson AS, Fridkis-Hareli M, Globerson A. Feedback regulation of T cell development: manifestations in aging. *Mech Ageing Dev* 1996,91:195-210.
303. Haase AT. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu Rev Immunol* 1999,17:625-656.
304. Rowland-Jones S. HIV infection: where have all the T cells gone? *Lancet* 1999,354:5-7.
305. Kourtis AP, Ibegbu C, Nahmias AJ, *et al.* Early progression of disease in HIV-infected infants with thymus dysfunction. *N Engl J Med* 1996,335:1431-1436.
306. Nahmias AJ, Clark WS, Kourtis AP, *et al.* Thymic dysfunction and time of infection predict mortality in human immunodeficiency virus-infected infants. CDC Perinatal AIDS Collaborative Transmission Study Group. *J Infect Dis* 1998,178:680-685.
307. Meyers A, Shah A, Cleveland RH, *et al.* Thymic size on chest radiograph and rapid disease progression in human immunodeficiency virus 1-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 2001,20:1112-1118.
308. Ye P, Kirschner DE. Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *J Immunol* 2002,168:4968-4979.
309. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2000,18:529-560.
310. Rosenzweig M, Clark DP, Gaulton GN. Selective thymocyte depletion in neonatal HIV-1 thymic infection. *Aids* 1993,7:1601-1605.

311. Schuurman HJ, Krone WJ, Broekhuizen R, *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* 1989,134:1329-1338.
312. Papiernik M, Brossard Y, Mulliez N, *et al.* Thymic abnormalities in fetuses aborted from human immunodeficiency virus type 1 seropositive women. *Pediatrics* 1992,89:297-301.
313. Baskin GB, Murphey-Corb M, Martin LN, Davison-Fairburn B, Hu FS, Kuebler D. Thymus in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Lab Invest* 1991,65:400-407.
314. Wykrzykowska JJ, Rosenzweig M, Veazey RS, *et al.* Early regeneration of thymic progenitors in rhesus macaques infected with simian immunodeficiency virus. *J Exp Med* 1998,187:1767-1778.
315. Bonyhadi ML, Su L, Auten J, McCune JM, Kaneshima H. Development of a human thymic organ culture model for the study of HIV pathogenesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995,11:1073-1080.
316. Aldrovandi GM, Feuer G, Gao L, *et al.* The SCID-hu mouse as a model for HIV-1 infection. *Nature* 1993,363:732-736.
317. Stanley SK, McCune JM, Kaneshima H, *et al.* Human immunodeficiency virus infection of the human thymus and disruption of the thymic microenvironment in the SCID-hu mouse. *J Exp Med* 1993,178:1151-1163.
318. Schnittman SM, Denning SM, Greenhouse JJ, *et al.* Evidence for susceptibility of intrathymic T-cell precursors and their progeny carrying T-cell antigen receptor phenotypes TCR alpha beta + and TCR gamma delta + to human immunodeficiency virus infection: a mechanism for CD4+ (T4) lymphocyte depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990,87:7727-7731.
319. Jamieson BD, Uittenbogaart CH, Schmid I, Zack JA. High viral burden and rapid CD4+ cell depletion in human immunodeficiency virus type 1-infected SCID-hu mice suggest direct viral killing of thymocytes in vivo. *J Virol* 1997,71:8245-8253.
320. McCune JM. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* 2001,410:974-979.
321. Franco JM, Rubio A, Martinez-Moya M, *et al.* T-cell repopulation and thymic volume in HIV-1-infected adult patients after highly active antiretroviral therapy. *Blood* 2002,99:3702-3706.
322. Hatzakis A, Touloumi G, Karanicolos R, *et al.* Effect of recent thymic emigrants on progression of HIV-1 disease. *Lancet* 2000,355:599-604.
323. Poulin JF, Sekaly RP. Function of the thymus in HIV-infected adults. *Jama* 1999,282:219.
324. Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, *et al.* Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1-infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med* 1999,190:725-732.
325. Pedroza-Martins L, Boscardin WJ, Anisman-Posner DJ, Schols D, Bryson YJ, Uittenbogaart CH. Impact of cytokines on replication in the thymus of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from infants. *J Virol* 2002,76:6929-6943.
326. Pido-Lopez J, Burton C, Hardy G, *et al.* Thymic output during initial highly active antiretroviral therapy (HAART) and during HAART supplementation with interleukin 2 and/or with HIV type 1 immunogen (Remune). *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003,19:103-109.

327. Koot M, van Leeuwen R, de Goede RE, *et al.* Conversion rate towards a syncytium-inducing (SI) phenotype during different stages of human immunodeficiency virus type 1 infection and prognostic value of SI phenotype for survival after AIDS diagnosis. *J Infect Dis* 1999,179:254-258.
328. Penn ML, Grivel JC, Schramm B, Goldsmith MA, Margolis L. CXCR4 utilization is sufficient to trigger CD4+ T cell depletion in HIV-1-infected human lymphoid tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999,96:663-668.
329. Spencer LT, Ogino MT, Dankner WM, Spector SA. Clinical significance of human immunodeficiency virus type 1 phenotypes in infected children. *J Infect Dis* 1994,169:491-495.
330. Tersmette M, Lange JM, de Goede RE, *et al.* Association between biological properties of human immunodeficiency virus variants and risk for AIDS and AIDS mortality. *Lancet* 1989,6:983-985.
331. Richman DD, Bozzette SA. The impact of the syncytium-inducing phenotype of human immunodeficiency virus on disease progression. *J Infect Dis* 1994,169:968-974.
332. Scarlatti G, Tresoldi E, Bjorndal A, *et al.* In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 1997,3:1259-1265.
333. Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, *et al.* CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 1998,161:3103-3113.
334. Zamarchi R, Allavena P, Borsetti A, *et al.* Expression and functional activity of CXCR-4 and CCR-5 chemokine receptors in human thymocytes. *Clin Exp Immunol* 2002,127:321-330.
335. Schmitt N, Chene L, Boutolleau D, *et al.* Positive regulation of CXCR4 expression and signaling by interleukin-7 in CD4+ mature thymocytes correlates with their capacity to favor human immunodeficiency X4 virus replication. *J Virol* 2003,77:5784-5793.
336. Reyes RA, Canfield DR, Esser U, *et al.* Induction of Simian AIDS in Infant Rhesus Macaques Infected with CCR5- or CXCR4-Utilizing Simian-Human Immunodeficiency Viruses Is Associated with Distinct Lesions of the Thymus. *J Virol* 2004,78:2121-2130.
337. Ometto L, De Forni D, Patiri F, *et al.* Immune reconstitution in HIV-1-infected children on antiretroviral therapy: role of thymic output and viral fitness. *Aids* 2002,16:839-849.
338. Vigano A, Vella S, Saresella M, *et al.* Early immune reconstitution after potent antiretroviral therapy in HIV-1-infected children correlates with the increase in thymus volume. *AIDS* 2000,14:251-261.
339. Kolte L, Dreves AM, Ersboll AK, *et al.* Association between larger thymic size and higher thymic output in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2002,185:1578-1585.
340. Markert ML, Hicks CB, Bartlett JA, *et al.* Effect of highly active antiretroviral therapy and thymic transplantation on immunoreconstitution in HIV infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000,16:403-413.
341. de la Rosa R, Leal M. Thymic involvement in recovery of immunity among HIV-1-infected adults on highly active antiretroviral therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003,52:155-158.

342. De Paoli P, Bortolin MT, Zanussi S, Monzoni A, Pratesi C, Giacca M. Changes in thymic function in HIV-positive patients treated with highly active antiretroviral therapy and interleukin-2. *Clin Exp Immunol* 2001,125:440-446.
343. Resino S, Sanchez-Ramon S, Correa R, Navarro ML, Bellon JM, Munoz-Fernandez MA. [Complete immune and clinical recovery after highly active antiretroviral therapy in advanced vertically HIV-1 infected children]. *Med Clin (Barc)* 2003,120:417-420.
344. Hainaut M, Ducarme M, Schandene L, et al. Age-related immune reconstitution during highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus type 1-infected children. *Pediatr Infect Dis J* 2003,22:62-69.
345. Cohen Stuart J, Hamann D, Borleffs J, et al. Reconstitution of naive T cells during antiretroviral treatment of HIV-infected adults is dependent on age. *Aids* 2002,16:2263-2266.
346. Teixeira L, Valdez H, McCune JM, et al. Poor CD4 T cell restoration after suppression of HIV-1 replication may reflect lower thymic function. *Aids* 2001,15:1749-1756.
347. Viard JP, Mocroft A, Chiesi A, et al. Influence of age on CD4 cell recovery in human immunodeficiency virus-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy: evidence from the EuroSIDA study. *J Infect Dis* 2001,183:1290-1294.
348. Ye P, Kourtis AP, Kirschner DE. Reconstitution of thymic function in HIV-1 patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Clin Immunol* 2003,106:95-105.
349. Silva M, Grillot D, Benito A, Richard C, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through Bcl-XL and Bcl-2. *Blood* 1996,88:1576-1582.
350. Kato T, Matsumoto A, Ogami K, Tahara T, Morita H, Miyazaki H. Native thrombopoietin: structure and function. *Stem Cells* 1998,16:11-19.
351. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1994,180:1955-1960.
352. von Freeden-Jeffry U, Vieira P, Lucian LA, McNeil T, Burdach SE, Murray R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 1995,181:1519-1526.
353. Morrissey PJ, Conlon P, Braddy S, Williams DE, Namen AE, Mochizuki DY. Administration of IL-7 to mice with cyclophosphamide-induced lymphopenia accelerates lymphocyte repopulation. *J Immunol* 1991,146:1547-1552.
354. Bolotin E, Annett G, Parkman R, Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplant* 1999,23:783-788.
355. Mackall CL, Fry TJ, Bare C, Morgan P, Galbraith A, Gress RE. IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. *Blood* 2001,97:1491-1497.
356. Okamoto Y, Douek DC, McFarland RD, Koup RA. Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood* 2002,99:2851-2858.
357. Fry TJ, Christensen BL, Komschlies KL, Gress RE, Mackall CL. Interleukin-7 restores immunity in athymic T-cell-depleted hosts. *Blood* 2001,97:1525-1533.
358. Vivien L, Benoist C, Mathis D. T lymphocytes need IL-7 but not IL-4 or IL-6 to survive in vivo. *Int Immunol* 2001,13:763-768.

359. Li J, Huston G, Swain SL. IL-7 promotes the transition of CD4 effectors to persistent memory cells. *J Exp Med* 2003,198:1807-1815.
360. Kondrack RM, Harbertson J, Tan JT, McBreen ME, Surh CD, Bradley LM. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 2003,198:1797-1806.
361. Steffens CM, Managlia EZ, Landay A, Al-Harhi L. Interleukin-7-treated naive T cells can be productively infected by T- cell-adapted and primary isolates of human immunodeficiency virus 1. *Blood* 2002,99:3310-3318.
362. Nugeyre MT, Monceaux V, Beq S, *et al.* IL-7 stimulates T cell renewal without increasing viral replication in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Immunol* 2003,171:4447-4453.
363. Napolitano LA, Stoddart CA, Hanley MB, Wieder E, McCune JM. Effects of IL-7 on early human thymocyte progenitor cells in vitro and in SCID-hu Thy/Liv mice. *J Immunol* 2003,171:645-654.
364. Brinchmann JE, Dobloug JH, Heger BH, Haaheim LL, Sannes M, Egeland T. Expression of costimulatory molecule CD28 on T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection: functional and clinical correlations. *J Infect Dis* 1994,169:730-738.
365. Kelleher AD, Sewell WA, Cooper DA. Effect of protease therapy on cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1999,115:147-152.
366. Sondergaard SR, Aladdin H, Ullum H, Gerstoft J, Skinhoj P, Pedersen BK. Immune function and phenotype before and after highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999,21:376-383.
367. Solomon A, Cameron PU, Bailey M, *et al.* Immunological and virological failure after antiretroviral therapy is associated with enhanced peripheral and thymic pathogenicity. *J Infect Dis* 2003,187:1915-1923.
368. Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993,14:107-111.
369. Clerici M, Hakim FT, Venzon DJ, *et al.* Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J Clin Invest* 1993,91:759-765.
370. Resino S, Bellon JM, Gurbindo D, Munoz-Fernandez MA. Disruption in cytokine and chemokine production by T-cells in vertically HIV-1-infected children. *Acta Paediatr* 2001,90:989-997.
371. Lane HC, Depper JM, Greene WC, Whalen G, Waldmann TA, Fauci AS. Qualitative analysis of immune function in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Evidence for a selective defect in soluble antigen recognition. *N Engl J Med* 1985,313:79-84.
372. Wahren B, Morfeldt-Mansson L, Biberfeld G, *et al.* Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human immunodeficiency virus infection. *J Virol* 1987,61:2017-2023.
373. Berzofsky JA, Bensussan A, Cease KB, *et al.* Antigenic peptides recognized by T lymphocytes from AIDS viral envelope-immune humans. *Nature* 1988,334:706-708.
374. Clerici M, Stocks NI, Zajac RA, *et al.* Interleukin-2 production used to detect antigenic peptide recognition by T-helper lymphocytes from asymptomatic HIV-seropositive individuals. *Nature* 1989,339:383-385.

375. Matloubian M, Concepcion RJ, Ahmed R. CD4+ T cells are required to sustain CD8+ cytotoxic T-cell responses during chronic viral infection. *J Virol* 1994,68:8056-8063.
376. Kalams SA, Walker BD. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 1998,188:2199-2204.
377. Kalams SA, Buchbinder SP, Rosenberg ES, *et al.* Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1999,73:6715-6720.
378. von Herrath MG, Yokoyama M, Dockter J, Oldstone MB, Whitton JL. CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* 1996,70:1072-1079.
379. Gerlach JT, Diepolder HM, Jung MC, *et al.* Recurrence of hepatitis C virus after loss of virus-specific CD4(+) T-cell response in acute hepatitis C. *Gastroenterology* 1999,117:933-941.
380. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, *et al.* Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000,191:1499-1512.
381. Scott ZA, Beaumier CM, Sharkey M, Stevenson M, Luzuriaga K. HIV-1 replication increases HIV-specific CD4+ T cell frequencies but limits proliferative capacity in chronically infected children. *J Immunol* 2003,170:5786-5792.
382. van Stipdonk MJ, Lemmens EE, Schoenberger SP. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat Immunol* 2001,2:423-429.
383. Wong P, Pamer EG. Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation. *J Immunol* 2001,166:5864-5868.
384. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2001,2:415-422.
385. Lee WT, Pasos G, Cecchini L, Mittler JN. Continued antigen stimulation is not required during CD4(+) T cell clonal expansion. *J Immunol* 2002,168:1682-1689.
386. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity* 1998,8:275-283.
387. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol* 2003,4:835-842.
388. Harty JT, Badovinac VP. Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. *Curr Opin Immunol* 2002,14:360-365.
389. Hildeman DA, Zhu Y, Mitchell TC, Kappler J, Marrack P. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr Opin Immunol* 2002,14:354-359.
390. Zhang X, Brunner T, Carter L, *et al.* Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* 1997,185:1837-1849.
391. Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 2002,111:837-851.
392. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003,4:225-234.
393. Migueles SA, Laborico AC, Shupert WL, *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat Immunol* 2002,3:1061-1068.

394. Baron V, Bouneaud C, Cumano A, *et al.* The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct. *Immunity* 2003,18:193-204.
395. Feeney ME, Draenert R, Roosevelt KA, *et al.* Reconstitution of virus-specific CD4 proliferative responses in pediatric HIV-1 infection. *J Immunol* 2003,171:6968-6975.
396. Harari A, Vallelian F, Pantaleo G. Functional and phenotypic Heterogeneity of memory CD4 T cells: Persistence of high antigen load prevents the generation of HIV-1-specific memory helper CD4 T cells. *submitted* 2004.
397. Chakraborty R, Musoke R, Palakudy T, Cross A, D'Agostino A. Management of severely immunocompromised human immunodeficiency virus type 1-infected African orphans with structured treatment interruption: another kind of salvage therapy. *Clin Infect Dis* 2003,36:1483-1485.