

Niveles de RANTES antes y después de 3 años de TAAE y expresión de CCR5 en niños infectados por VIH-1

César Pérez-Maldonado^{1,2}, Manuel Hernández², Isabel Caragol², Josep María Bertrán³, Teresa Español²

¹Cátedra de Inmunología, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela 5101-A; ²Unidad de Inmunología, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, España; ³Unidad de Inmunodeficiencias, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, España

Recibido Abril 25, 2008. Aceptado Julio 10, 2008

RANTES LEVELS IN PRE-and-POST 3 YEARS OF HAART AND CCR5 EXPRESSION IN HIV-1 INFECTED CHILDREN

Resumen

Las quimiocinas son citocinas proinflamatorias que atraen y activan subpoblaciones leucocitarias específicas cuyos receptores son empleados como co-receptores por algunas cepas virales. El papel de las quimiocinas durante la infección por el VIH-1 ha sido poco estudiado y en casos particulares los niveles elevados en plasma de algunas, como RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), han sido asociados en los individuos infectados a un buen pronóstico, para su recuperación inmunológica. El presente trabajo evaluó el papel de RANTES y su receptor CCR5 en la reconstitución inmunológica de niños infectados por transmisión vertical con VIH-1 y bajo triple terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE). Se estudió un grupo de 32 niños infectados entre 4 y 12 años de edad y un grupo control de la misma edad. En ambos grupos se analizaron las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo (CMF), para determinar la expresión de CCR5 en células T CD4⁺, y la producción intracelular de interleucina (IL)-2 e interferón (IFN)- γ , y mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) los niveles de RANTES en plasma y sobrenadantes de cultivos linfocitarios. En los niños infectados, los niveles plasmáticos pre y post TAAE de RANTES fueron 886 y 1025 pg/ml, respectivamente, y la expresión media de CCR5 en CD4⁺ fue 18%, siendo más baja en 3 casos heterocigotos para la mutación CCR5D32. En el grupo control, la expresión media de CCR5 en CD4⁺ fue de 38% y los niveles de RANTES de 687 pg/ml. En relación a la edad, en ambos grupos los niveles de RANTES y

Abstract

Chemokines are pro-inflammatory cytokines that attract and activate specific leukocyte subsets whose receptors are used as co-receptors by some viral strains. The role of chemokines have been barely assessed and increased plasma levels, particularly RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), have been associated with better prognosis to immune recovery. To evaluate the role of RANTES and its receptor CCR5 in immunological reconstitution in HIV vertically infected children, after highly active antiretroviral therapy (HAART), lymphocytes subsets, CCR5 expression on CD4⁺ T cells and intracellular production of interleukin (IL)-2 and interferon (IFN)- γ were determined by flow cytometry (FCM). RANTES levels were assessed by ELISA in plasma and lymphocyte culture supernatants. Thirty-two infected children (4-12-years old) and an age-matched control group were studied. RANTES plasma levels were 886 and 1025 pg/ml pre and post HAART, respectively. Mean CCR5 expression on CD4⁺ cells was 18% and lower in 3 cases, heterozygous for CCR5D32 mutation. In the control group the mean CCR5 expression on CD4⁺ cells was 38% and plasma RANTES levels were 687 pg/ml. RANTES levels and CCR5 expression were also analyzed in relation to age and no significant differences were observed. Intracellular IL-2 and IFN- γ values were not significantly different from controls, although CD4⁺/CD8⁺ ratio was much lower in infected patients even after therapy. Lower CCR5 expression than controls and increased RANTES levels post

la expresión de CCR5 no arrojaron diferencias significativas. En los niños infectados, los niveles de IL-2 e IFN- γ no fueron significativamente diferentes a los del grupo control, aunque la relación CD4⁺/CD8⁺ fue más baja en los primeros, aún después de la terapia. La expresión disminuida de CCR5 en CD4⁺, con respecto a los controles y el incremento de los niveles de RANTES post TAAE, se correlacionaron al mejoramiento del número total de linfocitos T CD4⁺, las condiciones clínicas y la disminución de la carga viral, lo cual establece que los niveles de RANTES pueden ser un marcador muy útil para evaluar la recuperación inmunológica en individuos infectados por el VIH-1.

PALABRAS CLAVE: VIH-1, CCR5, RANTES, SIDA, recuperación inmune, triple terapia antirretroviral de alta eficacia (TAAE)

therapy correlate with the improvement in total CD4⁺ cells, clinical conditions and decreased viral load in the post HAART period, and could be a reliable marker of immune recovery.

KEYWORDS: HIV-1 infection, CCR5, RANTES, AIDS, immune recovery, highly active antiretroviral therapy (HAART)

Introducción

La terapia antirretroviral de alta eficiencia (TAAE) ha producido una disminución significativa en el número de muertes relacionadas al síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) y el mejoramiento de la respuesta inmunitaria en adultos (1-3) y niños (4, 5). Aunque la erradicación total del VIH-1 ha sido difícil de obtener (6, 7), está ampliamente documentada la capacidad de TAAE para controlar la infección y reducir los síntomas clínicos, así como permitir la obtención de una recuperación inmune a través de cambios específicos en el fenotipo de las subpoblaciones de células T (8, 9) y las síntesis de citocinas (10-12).

El receptor CCR5 para RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) se expresa en la superficie de linfocitos T, células dendríticas, microglías y monocitos, y está altamente expresado en linfocitos CD4⁺ activados y de memoria (CD45RO⁺), y en niveles bajos en CD4⁺ vírgenes (CD45RA⁺) (13-15). El VIH-1 emplea a CCR5 como correceptor para infectar linfocitos CD4⁺ (16), particularmente las cepas no inductoras de sincitio (NSI/M-tróficas) durante la etapa asintomática, pudiendo además

infectar monocitos (17). En niños la progresión de la infección por VIH-1 induce defectos en la producción de citocinas tipo 1 [interleucina (IL)-2, IL-12, interferón (IFN)- γ] (18). Estudios previos han relacionado la densidad de CCR5 en la superficie de los CD4⁺ (19) y la variación de los niveles de RANTES, con la infectividad del VIH-1 durante la fase crónica de la infección (20-22). El aumento de los niveles circulantes de RANTES durante la terapia antirretroviral ha sido reportado como un factor beneficioso en adultos infectados (23-30). Opuestamente, el perfil de las citocinas y sus receptores en niños infectados verticalmente y bajo TAAE, han sido poco estudiados durante la restauración de la respuesta inmune. El presente trabajo tiene como propósito evaluar el papel protector de RANTES en éste grupo de pacientes.

Material y métodos

Población en estudio: Se estudiaron 32 niños infectados verticalmente por el VIH-1 y bajo TAAE, y 28 niños de edad similar con hemofilia tipo-A (bajo terapia con Factor VIII recombinante), no infectados, aparentemente sanos con función inmune normal (31). Los niños se dividieron de acuerdo a su estado clínico en:

grupo A (niños control) y grupo B (niños infectados), y según su edad en grupo I (1-6 años) y grupo II (>6 años). La mayoría de los niños infectados habían recibido previamente tratamiento con dos medicamentos antirretrovirales, pero desde enero 1977 todos comenzaron a recibir TAAE. Ambos grupos etarios de pacientes fueron clasificados en la categoría A de acuerdo a los estándares del CDC para la infección por el VIH-1 (32), con la excepción de cuatro en la categoría B2 y dos en la categoría B3, todos ellos pertenecientes al grupo II. En los niños estudiados se analizaron las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺, CD8⁺/CD45 RA⁻, CD8⁺/CD38⁺, CD8⁺/HLA DR (33-36) y CD8⁺/CD28⁻ (37) mediante citometría de flujo (CMF).

Análisis del fenotipo celular: A 200 µl de sangre total de cada muestra y en tubos por separado se agregaron 10 µl de cada anticuerpo monoclonal conjugado con fluorocromo. Posteriormente las muestras se mezclaron suavemente y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente (TA) por un lapso de 30 minutos. Luego de la incubación se adicionaron 2 ml de solución lítica (FACSTM, Becton & Dickinson, USA) y se incubaron nuevamente en la oscuridad y a TA por 5 minutos adicionales. Todos los tubos fueron centrifugados a 1.200 rpm por 10 minutos para descartar los sobrenadantes. Los botones celulares se resuspendieron en 0.3 ml de solución amortiguadora de fosfato (PBS) antes de su análisis en un citómetro FACSCalibur de dos-lasers (Becton & Dickinson).

Determinación del fenotipo de las citocinas intracelulares: La expresión de IL-2 e IFN-γ se llevó a cabo de acuerdo a métodos previamente descritos (38, 39). La sangre total se diluyó en proporción 1:4 (250µl+750µl) con RPMI (Gibco/BRL, Alemania) y se distribuyó en tubos de ensayo marcados E (estimuladas) y NE (no-estimuladas). En el tubo E se adicionaron 25 µl de monesina (2

µg/ml) (SIGMA, Mo. USA) en una dilución 1:10 con RPMI, 10 µl de fitohemaglutinina (PHA 10 ng/µl, SIGMA) y 25 µl de ionomicina 100 UI (SIGMA). En los tubos NE se adicionaron 25 µl of monesin solamente. Ambos grupos de tubos se incubaron en cámara de CO₂ (COC) a 37°C por 4 horas. Al final de la incubación se adicionaron a todos los tubos 2 ml de solución lisante (BIO 101, CA, USA) y se incubaron 10 minutos adicionales. Luego de centrifugar a 1.500 rpm por 5 minutos para descartar los sobrenadantes, se les adicionaron 0.5 ml de solución permeabilizante (Becton & Dickinson) por 10 minutos. Al final de la incubación se les restauró el volumen a 2 ml por adición de PBS. El botón se recuperó en PBS luego de lavar a 1.500 rpm por 5 minutos antes de la determinación del fenotipo con anticuerpos monoclonales anti-IL2^{FITC}, anti-IFNγ^{FITC}, anti-CD3^{APC} y anti-CD8^{PerCP} (Pharmlingen, USA). Se añadió anti-CD69^{PE} como marcador de activación para CD4⁺ y CD8⁺. Los análisis citométricos se realizaron en citómetro FACSCalibur BD con un programa de aplicación CellQuest.

Expresión de receptores de quimiocinas y análisis de la síntesis de quimiocinas: La expresión de los receptores en PBL se realizó por adición de 7 µl de anti-CD3^{APC}, 10 µl anti-CD4^{PerCP} (Becton & Dickinson), 15 µl de anti-CXCR4^{PE} y 15 µl de anti-CCR5^{FITC} (Pharmlingen) a 200 µl de cada muestra de sangre para el análisis de cuatro colores. Los tiempos de incubación y los pasos de lavado se realizaron como se describió previamente.

Evaluación de la síntesis de quimiocinas: Las células y el plasma se separaron mediante centrifugación a 1.250 rpm por 15 minutos. El plasma se centrifugó a 3.000 rpm antes de almacenarse a -70°C. Las células se diluyeron en proporción 1:1 con solución balanceada de Hanks (HBSS, Biowhittaker, USA) para separarlas mediante un gradiente de Ficoll (LYMPHOPREP, Nycomed, Noruega). Las

células mononucleares periféricas se ajustaron a 2×10^6 células/ml e incubaron en COC con RPMI 1640/10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco/BRL), estreptomocina y penicilina. La inducción de la expresión de CCR5 y la producción de RANTES se obtuvieron al añadir 10 μ l/ml de PHA (2,5 μ g/ml) (M-FORM Gibco/BRL) y 5 μ l/ml de rIL-2 (100 UI) (PROLEUKIN, Chiron Ibérica). Los cultivos linfocitarios se incubaron 48 horas en COC y se separaron por centrifugación a 1.250 rpm por 15 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes y se almacenaron a -70°C hasta el momento de su análisis. Los botones celulares fueron recuperados individualmente en 300 μ l de PBS y distribuidos en 2 tubos para determinar el fenotipo. Los tiempos de incubación y los pasos de lavado se realizaron como se mencionó anteriormente.

Análisis de los niveles de RANTES: Los niveles plasmáticos y de cultivo celular de RANTES se obtuvieron mediante el empleo de un equipo ELISA (Endogen, USA) siguiendo la metodología del fabricante.

Análisis citométrico: Se creó una ventana FL-4 (CD3^{APC}) vs. SSC para seleccionar los linfocitos T. Igualmente se combinaron FL-1 (citocina) vs FL-3 ($\text{CD8}^{\text{PerCP}}$) para observar las células positivas para cada citocina (IL-2 e IFN- γ , respectivamente). Debido a la imposibilidad de observar la expresión de CD4^+ por el estímulo de ionomicina, las células que expresaron $\text{CD3}^+ \text{CD8}^-$ se consideraron CD4^+ . Los tubos marcados NE se emplearon como marcadores negativos en el análisis citométrico.

Resultados

Niveles plasmáticos de RANTES: Es importante señalar la existencia de una variación significativa ($p \leq 0.05$) al comparar los niveles plasmáticos de RANTES entre los controles y los niños infectados, registrándose valores de 687 y 1025 pg/ml respectivamente (Fig 1).

Al comparar los niveles de RANTES en los pacientes durante las etapas pre y post-TAAE, se observa una variación significativa ($p \leq$

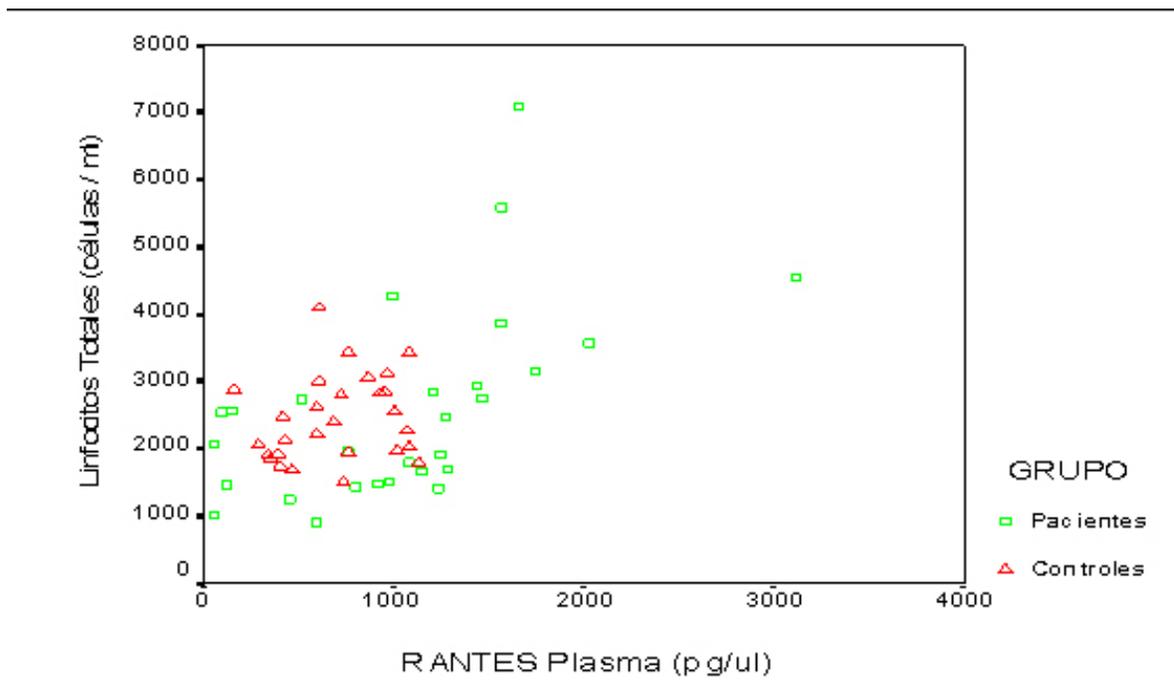


Figura 1. Distribución de los niveles plasmáticos de RANTES basal entre el grupo de pacientes en la etapa post TAAE y los niños control.

0.05) entre ambos, con valores de 886 y 1025 pg/ml, respectivamente. También existe un incremento directamente proporcional de los niveles de RANTES y las subpoblaciones CD4⁺, especialmente en los pacientes del grupo I (Fig. 2).

Expresión intracelular de citocinas y subpoblaciones linfocitarias: La expresión de IL-2 en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ mostró, en

ambos grupos de pacientes, una ligera disminución no significativa al compararse con los valores de referencia (37). Por otra parte, en el grupo II destaca el incremento en la síntesis de IFN- γ por los linfocitos CD8⁺ de los pacientes infectados (Fig. 3).

En el grupo de los niños infectados por el VIH los porcentajes de las subpoblaciones mostraron un aumento significativo ($p \leq 0.05$) en

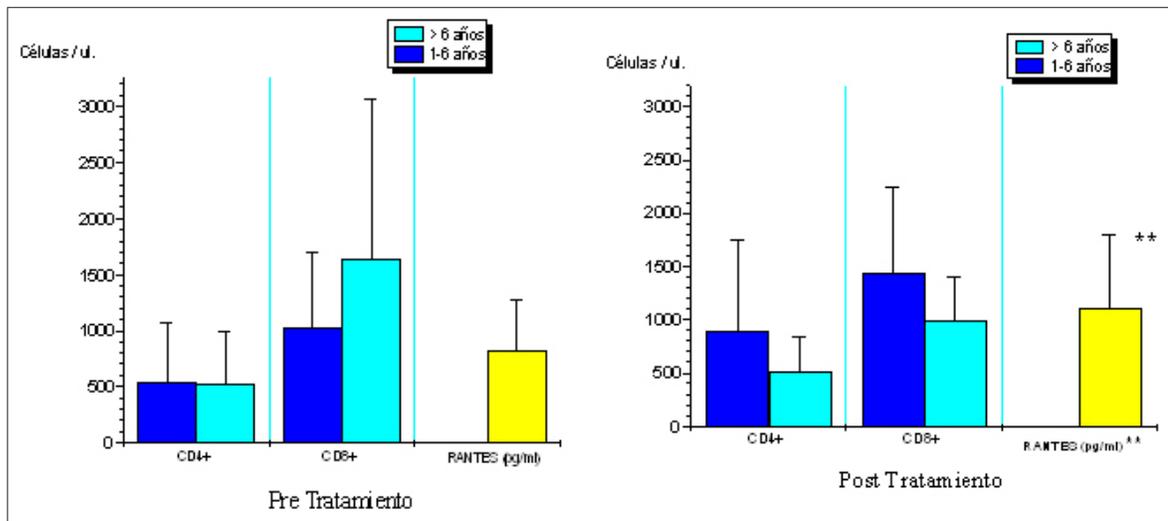


Figura 2. Dinámica de las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ con respecto a la edad y su relación a los niveles de RANTES, en los grupos de pacientes en las etapas de pre y post TAAE. Promedio \pm 2 D.E. ** $p \leq 0.05$.

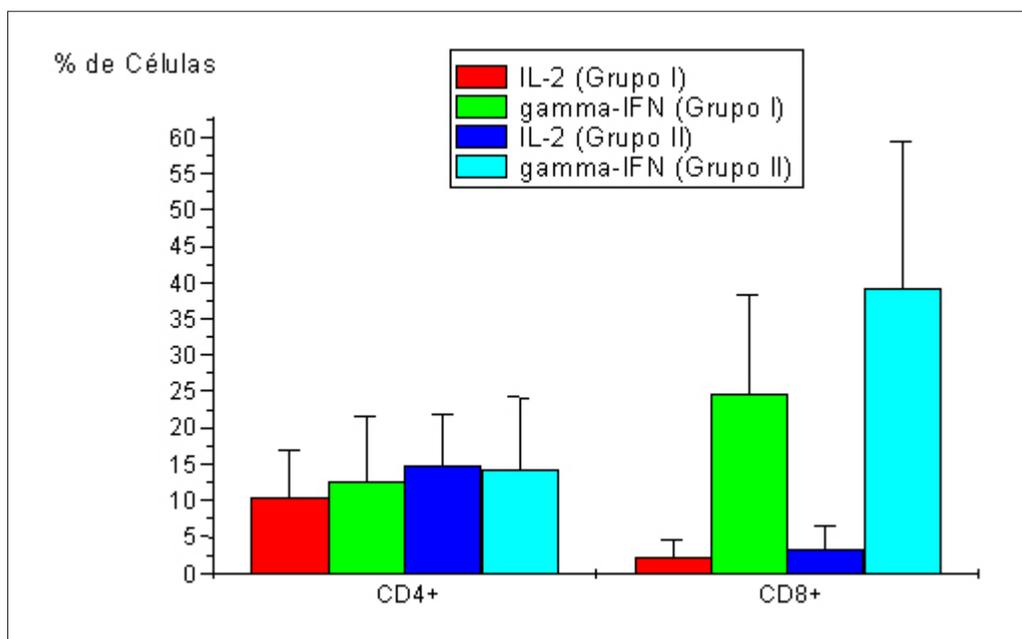


Figura 3. Porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺ con síntesis intracelular de IL-2 e IFN- γ en los grupos de pacientes en la etapa post TAAE, de acuerdo a la edad. Promedio \pm 2 D.E.

relación al grupo control. Al comparar ambos grupos de pacientes se observa en el grupo I un aumento significativo ($p \leq 0.05$) de la subpoblación CD8⁺/38⁺ (89%) (Fig. 4).

Expresión de CCR5: La expresión basal

del receptor CCR5 en los linfocitos CD4⁺ entre los grupos de niños enfermos y sanos, mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$), arrojando valores de 28% y 35%, respectivamente (Fig. 5).

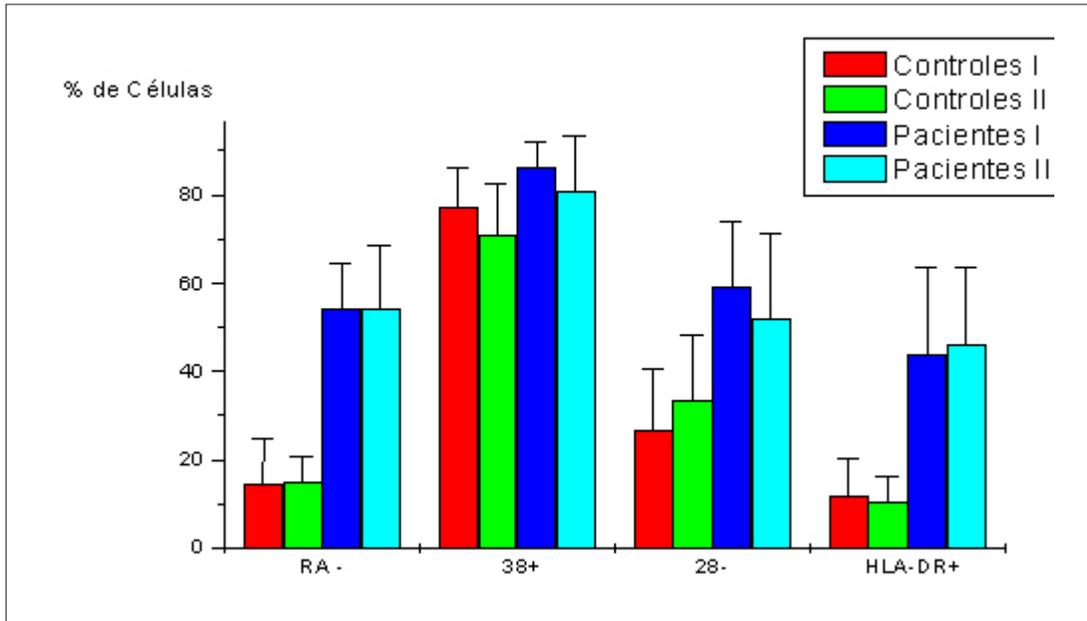


Figura 4. Comparación de los porcentajes de las subpoblaciones linfocitarias CD8⁺ de acuerdo a la edad, entre los niños control y el grupo de pacientes en la etapa post TAAE. Promedio \pm 2 D.E.

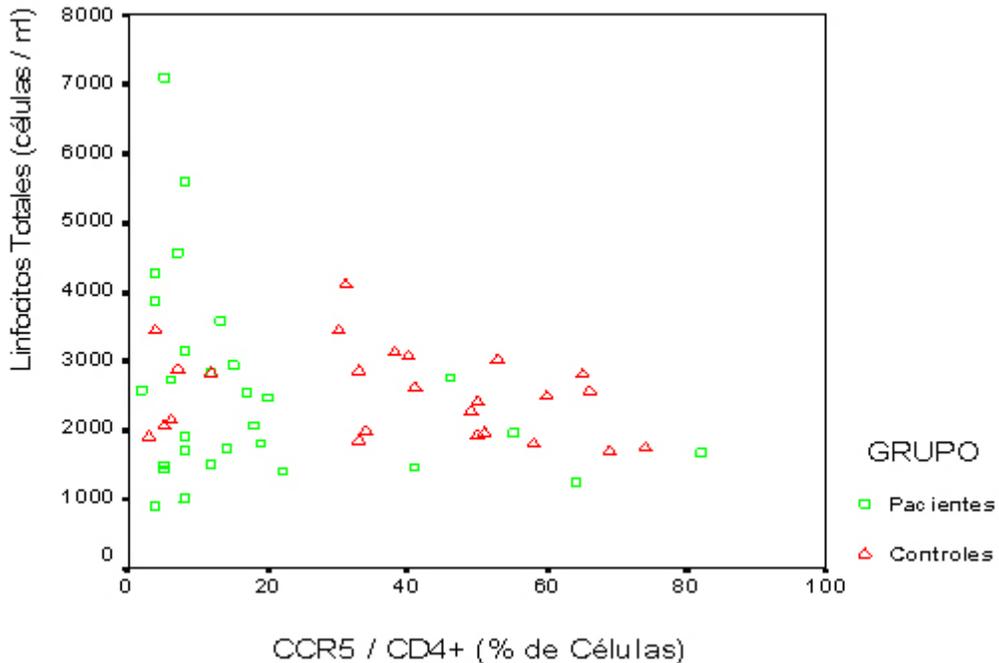


Figura 5. Distribución de la expresión basal del receptor CCR5 en los linfocitos CD4⁺ de acuerdo a la edad, entre el grupo de pacientes en la etapa post TAAE y los niños control.

Niveles de RANTES y carga viral en las etapas pre y post TAAE: Los niveles de RANTES y la carga viral muestran una correlación inversa durante las etapas de pre y postratamiento triple antirretroviral. En la etapa pretratamiento existe un nivel disminuido de RANTES (886 pg/ml) y una carga viral elevada (922 copias/ml x 1000) mientras que en la etapa postratamiento se observa una disminución significativa ($p \leq 0.05$) de la carga viral y un aumento de RANTES (50 copias/ml x 1000 vs. 1025 pg/ml) (Fig. 6).

Discusión

Los resultados del presente estudio en niños infectados con el VIH-1 por transmisión vertical y bajo TAAE, confirman la recuperación inmunológica descrita por varios autores. El aumento de las cifras de linfocitos CD4⁺ y la síntesis de citocinas comparable a niños normales, y la rápida disminución de los niveles de ARN viral desde el inicio del tratamiento, reflejan el logro de los objetivos terapéuticos fijados. El análisis y cuantificación de las subpoblaciones

CD8⁺ es un criterio que permite evaluar los cambios funcionales asociados a una evolución positiva durante la infección por el VIH-1; especialmente el discreto descenso de CD8⁺, hacen que la relación CD4⁺/CD8⁺ se acerque a los valores normales en los pacientes con una buena respuesta a la terapia (40-45), aunado también al incremento significativo de los niveles plasmáticos de RANTES, tal y como se observa en la Figura 2. El incremento del número de todas la subpoblaciones de CD8⁺ en los niños infectados, y en especial el aumento de la subpoblación CD8⁺/38⁺ en los pacientes del grupo I (Fig. 4), establece un nivel más alto de activación linfocitaria para un mejor control de la infección por el VIH-1 y la disminución del riesgo al desarrollo de SIDA (46, 47). De igual forma, la observación del incremento en la síntesis de IFN- γ por parte de los linfocitos CD8⁺ en el grupo II de los pacientes, se relaciona con la disminución en la expresión del receptor CCR5 y la regulación en la síntesis de RANTES (48).

Este hecho, señala la existencia de una capacidad autónoma e inalterada en la actividad del sistema inmune en los niños infectados, similar

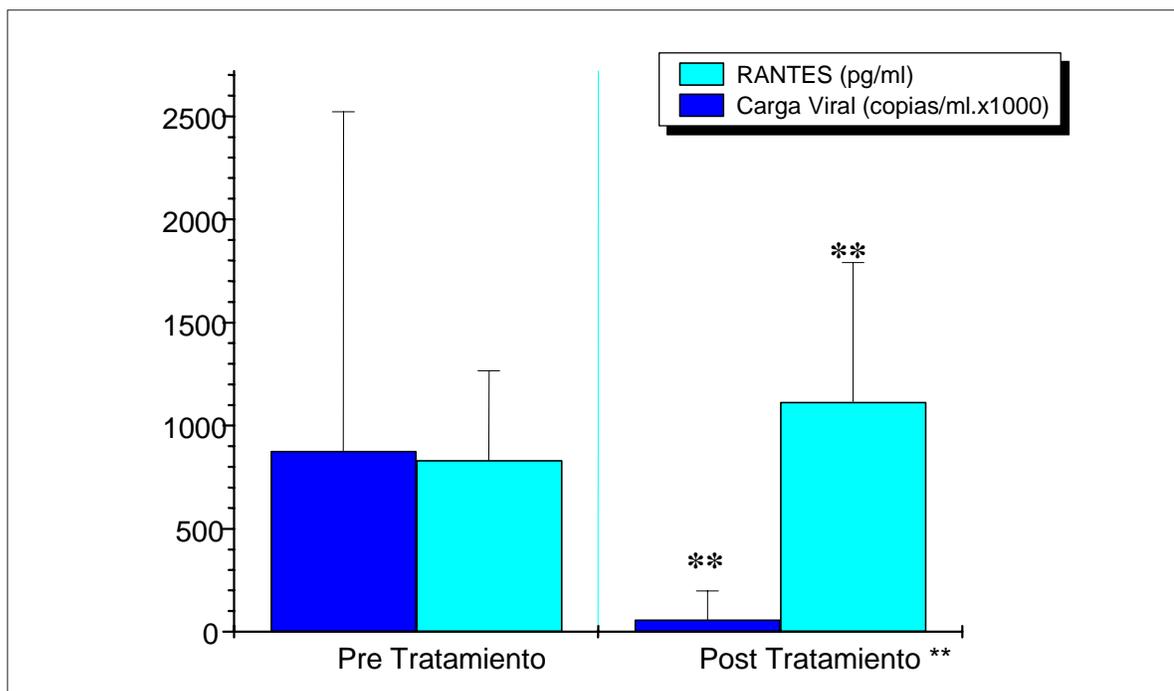


Figura 6. Niveles plasmáticos de RANTES en el grupo de pacientes y su relación con la carga viral, durante las etapas pre y post TAAE. ** $p < 0.05$

a lo reportado previamente en los adultos (49). La baja expresión basal del receptor CCR5 de los linfocitos CD4⁺ en el grupo de pacientes con respecto al grupo control (Fig.5), es un efecto directo del estado clínico de los infectados, debido probablemente a la ocupación de éste receptor por parte de RANTES. Los datos expuestos en la Figura 1, permiten corroborar la diferencia de los niveles de RANTES en el grupo de los niños infectados en relación a los niños control, y esto podría estar relacionado con la baja disposición de moléculas de CCR5 libres en la superficie de los CD4⁺ de los primeros. El análisis de los valores en la síntesis intracelular de IL-2 e IFN- γ por los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, muestra que la mayoría de los pacientes están dentro de valores normales, en correspondencia con su edad (50). El número elevado de linfocitos CD8⁺ en los pacientes durante la etapa post TAAE, está relacionado directamente al incremento en los niveles plasmáticos de RANTES, debido esencialmente a la recuperación de la respuesta Th1 representada por el aumento en la producción de b-quimiocinas (51-53). Los resultados de los valores de RANTES y su relación con la carga viral en las etapas pre y post TAAE (Fig.1), son significativos ($p \leq 0.05$) e inversamente proporcionales, corroborando la eficacia de ésta terapia sobre el control de la replicación viral y la recuperación de la respuesta inmune en los individuos bajo tratamiento. En el grupo de los niños infectados verticalmente por el VIH-1, se pudo observar de manera fehaciente una asociación beneficiosa representada por el aumento de RANTES y el mejoramiento de la respuesta inmune, ya que ésta última se manifiesta por el aumento del peso corporal y la desaparición de infecciones recurrentes en la casi totalidad de los pacientes, debido esencialmente a una mejor respuesta antiviral (54). A pesar de algunas controversias establecidas por otros reportes (55, 56), el presente estudio describe la existencia de una cooperación entre la elevada producción de RANTES y la variación de la

expresión de CCR5, manifestada en la restauración de las funciones protectoras de sistema inmune mediante la regulación y el control de la infección por el VIH-1, en individuos infectados y bajo TAAE (57-59). El papel protector de RANTES contra la infección por el VIH-1 ha sido anteriormente demostrado en cultivos de macrófagos, inhibiendo su entrada y alterando la replicación de algunas cepas virales dentro de éstas células. De igual forma, se ha demostrado que la entrada de RANTES a través del receptor CCR3 causa el incremento de la actividad citolítica de los linfocitos T citotóxicos (60). La evaluación y observación de los niveles plasmáticos basales de RANTES en individuos infectados por el VIH-1 parece ser un indicador de importancia al momento de valorar su recuperación inmunológica, ya que posibilita la aplicación de estrategias terapéuticas más idóneas para inducir un efectivo control y regulación de la infección, permitiendo así la participación equitativa del sistema inmune y los fármacos administrados.

*Correspondencia: Dr. César Pérez-Maldonado.
Correo electrónico: cesarp@ula.ve*

Referencias

1. Pezzotti, P., Napoli, P.A., Acciai, S., et al. 1999. Increasing survival time after AIDS in Italy: the role of new combination antiretroviral therapies. *AIDS* 13:249-255.
2. CDSC. 1997. Changes in the incidence of AIDS and in AIDS-deaths: the effect of antiretroviral treatment. *CDR Weekly* 7:381.
3. Mouton, Y., Alifandari, S., Valette, M., et al. 1997. Impact of protease inhibitors on AIDS-defining events and hospitalizations in 10 french AIDS reference centers. *AIDS* 11:101-105.
4. Cohen, S.J.W., Sliker, W.A., Rijkers, G.T., et al. 1998. Early recovery of CD4 + T lymphocytes in children on highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 12:2155-2159.

5. Essajee, S.M., Kim, M., Gonzalez, C., et al. 1999. Immunologic and virologic responses to HAART in severely immunocompromised HIV-1-infected children. *AIDS* 13:2523-2532.
6. Molla, A., Korneyeva, M., Gao, Q., et al. 1996. Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to RITONAVIR. *Nat. Med.* 2:760-766
7. Kaye, S. (PENTA 1998). 1998. Plasma viral load and genotypic resistance patterns in children adding lamivudine to current reverse transcriptase therapy. *AIDS* 12 (suppl 4); S93.
8. Cohen Stuart, J.W., Sliker, W.A., Rijkers, G.T., et al. 1998. Early recovery of CD4 T lymphocytes in children on HAART. *AIDS* 12:2155-2159.
9. Sondergaard, S.R., Aladdin, H., Ullum, H., et al. 1999. Immune function and phenotype before and after HAART. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 21:376-383.
10. Cocchi, F., DeVico, A.L., Garzino-Demo, A., et al. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 a and MIP-1 b as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 270:1811-1815.
11. Lusso, P. 1997. HIV-suppressive chemokines. *J. Acquir. Immune Def. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15 (suppl.1): S27-S30.
12. Weiss, L., Ancuta, P., Girard, P.M., et al. 1999. Restoration of normal interleukin-2 production by CD4+ T cells of human immunodeficiency virus-infected patients after 9 months of highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 4:1057-1063.
13. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. 1997. Human chemokines: an update. *Annu. Rev. Immunol.* 15:675-705.
14. Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., et al. 1997. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:1925-1930.
15. Berger, E.A. 1997. HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection. *AIDS* 11 (suppl. A):S3-S16.
16. Ayeahunie, S., Garcia-Zepeda, E.A., Hoxie, J.A. et al. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine receptors. *Blood* 90:1379-1386.
17. Berkowitz, R.D., Alexander, S., Bare, C. et al. 1998. CCR5 and CXCR4-utilizing strains of HIV-1 exhibit differential tropism and pathogenesis in vivo. *J. Virol.* 72:10108-10117.
18. Vigano, A., Balotta, C., Trabattoni, D. et al. 1997. Long-term resistance to HIV infection in vertical HIV infection: cytokine production, HIV isolation and HIV phenotype define long-term resistant host. *Pathobiol.* 65:169-176.
19. Reynes, J., Portales, P., Segondy, M., et al. 2000. CD4+ T cell surface CCR5 density as a determining factor of virus load in persons infected with human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 181:927-932.
20. McKenzie, S.W., Dallalio, G., North, F.M., et al. 1996. Serum chemokine levels in patients with non-progressing (HIV) infection. *AIDS* 10:F29-F33.
21. Polo, S., Veglia, F., Malnati, M.S., et al. 1999. Longitudinal analysis of serum chemokine levels in the course of HIV-1 infection. *AIDS* 13:447-454.
22. Abbate, I., Carletti, F., Dianzani, F., Capobianchi, M.R. 1999. RANTES upregulation by HIV-1 infected cells: lack of correlation with viral replication and induction of interferon. *AIDS* 13:288-290.
23. Kaufmann, G.R., Zaunders, J., Cooper, D.A. 1999. Immune reconstitution in HIV-1 infected subjects treated with potent antiretroviral therapy. *Sex. Transm. Infect.* 75:218-224.
24. Fleury, S., de Boer, R.J., Rizzardi, G.P., et al. 1998. Limited CD4+ T-cell renewal in early HIV-1 infection: effect of highly active antiretroviral therapy. *Nat. Med.* 4:794-801.
25. Schrum, S., Probst, P., Fleischer, B., Zipfel, P.F. 1996. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J. Immunol.* 157:3598-3604.
26. Mackewicz, C., Levy, J.A. 1992. CD8+ cell anti-HIV activity: non-lytic suppression of virus replication. *AIDS Res. Human Retroviruses* 8:1039-1050.
27. Levy, J.A., Mackewicz, C.E. Barker, E. 1996. Controlling HIV pathogenesis: the role of non-cytotoxic anti-HIV activity of CD8+ cells. *Immunol. Today* 17:217-224.
28. Levy, J.A., Blackbourne, D.J., Barker, E. 1997. The CD8+ cell antiviral factor. *J. Acquir. Imm. Def. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15:S23-S26.
29. Schall, T.J. 1991. Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine* 3:165-183.
30. Aukrust, P., Muller, F., Frolan, S.S. 1998. Circulating levels of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection: effect of potent antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 177:1091-1096.
31. Altisent, C., Barretina, J., Blanco, J., et al. 2000. Immunological characterization of haemophiliac children treated with recombinant FVIII. *Haemophilia* 6:359.
32. CDC. 1994. Revised classification system for human immunodeficiency virus infection in children less than 13 years of age. *MMWR.* 43: 1-10.
33. Denny, Y., Yorgev, R., Gelman, R., et al. 1992. Lymphocyte subsets in healthy children during the first 5 years of life. *JAMA* 267:1484-1488.
34. López, A., Caracol, I., Candeias, J., et al. 1999. Enumeration of CD4+ T-cells in the peripheral blood of HIV-1 infected patients: An interlaboratory study of the FACSCount system. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 38:231-237.
35. Mocroft, A., Boffil, M., Lipman, M., et al. 1997. CD8+, CD38+ lymphocyte percent: a useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Hum. Retrovir.* 14: 158-162.

36. Bürgiser, P., Hammann, C., Kauffman, D., et al. 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. *Clin. Exper. Immunol.* 115:458-463.
37. Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., et al. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 159:197-207.
38. Oppenshaw, P., Murphy, E.E., Hosken, N.A., et al. 1995. Heterogeneity of intracellular cytokines synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J. Exp. Med.* 182:1357-1367.
39. Benito, J.M., Zabay, J.M., Gil, J., et al. 1997. Quantitative alterations of the functionally distinct subsets of CD4 and CD8 lymphocytes in asymptomatic HIV infection: Changes in the expression of CD45RO, CD45Ra, CD11b, CD38, HLA-DR and CD25 antigens. *J. Acquir. Immune Def. Hum. Retrovirol.* 14:128-135.
40. Fleury, S., Pantaleo, G. 1999. T cell regeneration in HIV-infected subjects under highly active retroviral therapy. *Int. J. Mol. Med.* 4:91-97.
41. Giorgi, J.V., Hausner, M.A., Hultin, L.E. 1999. Detailed immunophenotype of CD8+ memory cytotoxic T-lymphocytes (CTL) against HIV-1 with respect to expression of CD45RA/RO, CD62L and CD28 antigens. *Immunol. Lett.* 66:105-110.
42. Lewis, D.E., Yang, L., Luo, W., et al. 1999. HIV-specific cytotoxic T lymphocyte precursors exist in CD28-CD8+ T cell subset and increase with loss of CD4 T cells. *AIDS* 13:1029-1033.
43. Dalod, M., Sinet, M., Deschemin, J.C., et al. 1999. Altered ex vivo balance between CD28+ and CD28- cells within HIV-specific CD8+T cells of HIV-seropositive patients. *Eur. J. Immunol.* 29:38-44.
44. De Martino, M., Rossi, M.E., Asir, C. et al. 1998. 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.* 43:752-758.
45. Mugnaini, E.N., Spurkland, A., Egeland, T., et al. 1998. Demonstration of identical expanded clones within both CD8+ CD28+ and CD8+ CD28- T cells subsets in HIV type 1-infected individuals. *Eur. J. Immunol.* 28: 1738-1742.
46. Bürgiser, P., Hammann, C., Kauffmann, D. et al. 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. *Clin. Exper. Immunol.* 115:458-463.
47. D'Offizi, G. 1997. Immunologic characterization of long-term non progressive HIV-1 infection. *J. Acquir. Imm. Def. Syndr. Hum. Retrovirol.* 15: S47-S50.
48. Signoret, N., Rosenkilde, M.M., Klasse, P.J., et al. 1998. Differential regulation of CXCR4 and CCR5 endocytosis. *J. Cell Sci.* 111:2819-2830.
49. Trumpfheller, C., Tenner-Racz, K., Racz, P., et al. 1998. Expression of macrophage inflammatory protein (MIP)-alpha, (MIP)-beta and RANTES genes in lymph nodes from HIV+ individuals: correlation with a Th1-type cytokine response. *Clin. Exp. Immunol.* 112:92-99.
50. Krampera, M., Vinante, F., Tavecchia, L., et al. 1999. Progressive polarization towards a T helper/cytotoxic type-1 cytokine pattern during age-dependent maturation of the immune response inversely correlates with CD30 cell expression and serum concentration. *Clin. Exp. Immunol.* 117:291-297.
51. Price, D.A., Klenerman, P., Booth, B.L., et al. 1999. Cytotoxic T lymphocytes, chemokines and antiviral immunity. *Immunol. Today* 20:212-216.
52. Clerici, M., Shearer, G.M. 1994. The Th1-Th2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol. Today.* 15:575-580.
53. Auskurt, P., Muller, F., Froland, S.S. 1998. Circulating levels of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection: effect of potent antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 177:1091-1096.
54. Benyoucef, S., Hober, D., De Groote, D., et al. 1998. RANTES production on HIV-1 antigen-stimulated whole blood culture: relationship with type 1 immune response and plasma viral load in individuals infected with HIV-1. *Scand. J. Immunol.* 48:212-216.
55. Sanchez-Carrasquillo, E., Garcia, V., Rivera, C.E., Melendez-Guerrero, L.M. 2000. CCR5 and beta-chemokines in HIV-1 infected children. *P. R. Health Sci. J.* 19:345-351.
56. Yamashita, T.E., Phair, J.P., Munoz, A., et al. 2001. Immunologic and virologic response to highly active antiretroviral therapy in the Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* 15:735-746.
57. Annunziato, F., Galli, G., Nappi, F., et al. 2000. Limited expression of R5-tropic HIV-1 in CCR5-positive type 1-polarized T cells explained by their ability to produce RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta. *Blood* 95:1167-1174.
58. Pierdominici, M., Giovannetti, A., Ensoli, F., et al. 2002. Changes in CCR5 and CXCR4 expression and beta-chemokine production in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 29:122-31.
59. Llano, A., Barretina, J., Gutiérrez, A., et al. 2003. Interleukin-7-dependent production of RANTES that correlates with human immunodeficiency virus disease progression. *J. Virol.* 77:4389-4395.
60. Hadida, F., Vieillard, V., Autran, B., et al. 1998. HIV-specific T cell cytotoxicity mediated by RANTES via the chemokine receptor CCR3. *J. Exp. Med.* 188:609-14.