

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
SERVICIO GENERAL DE CITOMETRÍA



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

CVANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FVNCIONAL DE
SVBPOBLACIONES LINFOIDES Y DE CÉLVLAS PRESENTADORAS DE
ANTÍGENO DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES INFECTADOS POR
EL VIRVS DE LA INMVNODEFICIENCIA HVMANA TIPO 1

TESIS DOCTORAL

MARÍA ALMEIDA PARRA

2008



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

**D. Alberto Orfao de Matos Correia e Vale, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular
del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por D^a. María Almeida Parra, titulado "*Cuantificación y análisis fenotípico y funcional de subpoblaciones linfoides y de células presentadoras de antígeno de sangre periférica en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1*", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca, a 13 de mayo de
2008

Fdo. Dr. Alberto Orfao de Matos



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**D. Miguel Cordero Sánchez, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular del
Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por D^a. María Almeida Parra, titulado "*Cuantificación y análisis fenotípico y funcional de subpoblaciones linfoides y de células presentadoras de antígeno de sangre periférica en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1*", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca, a 13 de mayo de
2008

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'M' followed by a long horizontal stroke and a vertical line extending downwards.

Fdo. Dr. Miguel Cordero Sánchez



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**

**D^a. Julia Almeida Parra, Doctora en Medicina y Cirugía y Profesora Contratada Doctora
Permanente del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca**

CERTIFICA:

Que el trabajo doctoral realizado bajo mi dirección por D^a. María Almeida Parra, titulado "*Cuantificación y análisis fenotípico y funcional de subpoblaciones linfoides y de células presentadoras de antígeno de sangre periférica en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1*", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Salamanca, a 13 de mayo de
2008

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.

Fdo. Dra. Julia Almeida Parra

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.
Un esfuerzo total es una victoria completa.*

Mahatma Gandhi

A Juan
A mis padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores de tesis, que han hecho posible la realización del presente trabajo doctoral. Al Dr. Alberto Orfao, del que tanto he aprendido y sigo aprendiendo cada día, le agradezco enormemente que haya depositado su confianza en mí durante todos estos años. Al Dr. Miguel Cordero, por su buen hacer con los pacientes, y por los conocimientos que me ha transmitido durante este tiempo. De manera especial quiero dar las gracias a la Dra. Julia Almeida, mi hermana mayor, por ser un referente en mi vida desde que tengo uso de razón, y por haber invertido tanto tiempo para que este trabajo alcanzase su meta final. Muchas gracias Julia.

A mis compañeros del laboratorio Herzenberg de la Facultad de Medicina, con los que conviví durante cuatro años que nunca olvidaré. Gracias por haberme apoyado y animado en los momentos más difíciles, pero sobre todo gracias por haberme brindado tantos y tan buenos momentos.

A mis compañeros del Servicio de Citometría/Hematología del Hospital Universitario de Salamanca, y del laboratorio 11 del Centro de Investigación del Cáncer, siempre dispuestos a ayudarme en lo que he necesitado, y con los que he compartido muchas risas y buenos momentos. A mis compañeros del Banco de ADN, que siempre me han apoyado y animado para que siguiera adelante.

A todas las personas que de una manera u otra colaboran en la lucha contra el SIDA.

Quiero dar las gracias de manera especial a mis padres, hermanos y sobrinos, porque la familia es el mejor patrimonio que una persona puede poseer. A mis padres, por su constante apoyo y ayuda, y por el amor que me transmiten cada día. A mi madre, por su capacidad de entrega a su familia, su gran organización, y por estar siempre disponible cuando la necesitamos. A mi padre, por su incansable esfuerzo y capacidad de trabajo, por enseñarnos

desde pequeños que “para recoger primero hay que sembrar”, pero sobre todo por su calidad humana y bondad. A mi hermana Patricia, que tan de cerca ha vivido y sentido los altibajos de este camino, por sus constantes ánimos, y porque reírnos juntas es la mejor terapia para que los malos momentos se conviertan en meras anécdotas. A Agus, por sus buenos consejos.

A mi madre, a mi tía y a Pilar, que han cocinado por mí durante todos estos meses, y a las que agradezco enormemente todo el tiempo que me han ahorrado y que he podido invertir en la escritura de la tesis.

A mis amigas del alma, Coco, María, Mónica y Zita, por estar siempre ahí, y por lo importante que su amistad es para mí.

Por último, quiero dedicar mi tesis doctoral a Juan, mi compañero de la vida, por quererme, cuidarme y apoyarme siempre. Sin su ayuda todo esto no hubiera sido posible. Mi mayor agradecimiento es para él.

GRACIAS A TODOS.

Glosario de abreviaturas

AcMo: Anticuerpo monoclonal
ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (del inglés “*antibody-dependent cellular cytotoxicity*”)
ADN: Ácido desoxirribonucleico
APC: Alofocianina (del inglés “*allophycocyanin*”)
ARN: Ácido ribonucleico
ARN_m: Ácido ribonucleico mensajero
AS: Adultos sanos
BDCA: del inglés “*Blood dendritic cell antigen*”
CAF: Factor celular antiviral (del inglés “*cellular antiviral factor*”)
CD: Célula dendrítica
CD40L: Ligando de CD40 (CD154)
CLA: Antígeno linfocitario cutáneo (del inglés “*cutaneous lymphocytic antigen*”)
CPA: Célula presentadora de antígeno
CTL: Linfocito T citotóxico (del inglés “*cytotoxic T lymphocyte*”)
DC-SIGN: del inglés “*Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin*”
Fc: Fracción constante (de las cadenas de las inmunoglobulinas)
FITC: Isotiocianato de fluoresceína (del inglés “*fluorescein isothiocyanate*”)
GM-CSF: Factor estimulante de colonias gránulo-monocíticas (del inglés “*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*”)
gp: Glicoproteína
HEV: Vénulas de endotelio alto (del inglés “*high endothelial venules*”)
HDF: Factores de dependencia del VIH (del inglés “*HIV-dependency factors*”)
HLA: Antígeno leucocitario humano (del inglés “*human leukocyte antigen*”)
ICAM: Molécula de adhesión intercelular (del inglés “*intercellular adhesion molecule*”)
IFN- γ : Interferón-gamma
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleucina
IP: Inhibidor de la proteasa
ITINN: Inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido
LFA: Antígeno asociado a la función leucocitaria (del inglés “*leukocyte function antigen*”)
LPS: Lipopolisacárido
L-SIGN: del inglés “*Liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-grabbing non-integrin*”
MDDC: Célula dendrítica derivada de monocito (del inglés “*monocyte-derived dendritic cell*”)
 μ l: Microlitro
NCR: Receptores naturales de citotoxicidad (del inglés “*natural cytotoxic receptors*”)
NK: del inglés “*natural killer*”
nm: Nanómetro
NOD: del inglés “*Nucleotide-binding oligomerization domain*”
ODN: Oligodesoxinucleótido
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés “*polymerase chain reaction*”)
PE: Ficoeritrina (del inglés “*phycoerithrin*”)
PerCP: Proteína peridinin-clorofila (del inglés “*peridinin chlorophyll protein*”)
RANTES: del inglés “*Regulated on activation, normally T cell expressed and secreted*”
SDF-1: del inglés “*Stromal derived factor-1*”
SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SIV: Virus de la inmunodeficiencia simio
SP: Sangre periférica
TAR: Tratamiento antirretroviral
TARGA: Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TCR: Receptor de la célula T (del inglés “*T-cell receptor*”)
T_{EM}: Linfocitos T CD4⁺ CCR5⁺ efectores de memoria
TI: Transcriptasa inversa
TLR: Receptor de tipo *Toll* (del inglés “*toll-like receptor*”)
TNF- α : Factor de necrosis tumoral-alfa (del inglés “*tumor necrosis factor-alpha*”).
Unidades ABC: Moléculas de anticuerpo por célula (del inglés “*Antibody Binding Capacity*”)
V3: Dominio variable 3 del receptor CD4
VHC: Virus de la hepatitis C
VHC⁺/VIH-1⁻: Pacientes VHC⁺ no co-infectados por el VIH-1
VIH-1: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
VIH-1⁺NPLP: Pacientes VIH-1⁺ en los que no se observa progresión a largo plazo
VIH-1⁺P: Pacientes VIH-1⁺ “*progresores*”
VIH-2: Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2
WGAS: estudios de asociación basados en análisis de genoma completo (del inglés “*genome-wide association studies*”)

Índice

I. INTRODUCCIÓN	1
1. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)	3
1.1. Características del VIH-1	4
1.1.1. Transmisión de la infección	5
1.1.2. Entrada del VIH-1 a la célula diana	6
1.1.3. Ciclo biológico del VIH-1	7
1.2. Patogenia de la infección por el VIH-1	9
1.2.1. Aspectos generales	9
1.2.2. Infección por el VIH-1 <i>in vivo</i>	11
1.2.2.1. Fase aguda de la infección	11
1.2.2.2. Fase crónica de la infección	12
1.2.2.3. Estadio de inmunodeficiencia acelerada	14
1.2.3. Mecanismos de depleción de linfocitos T CD4+	14
1.2.3.1. Destrucción de linfocitos T CD4+ por efecto citopático directo	14
1.2.3.2. Destrucción de linfocitos T CD4+ por mecanismos indirectos	15
1.2.3.3. Alteraciones en la homeostasis linfocitaria	16
1.3. Aspectos inmunológicos de la infección por el VIH-1	17
1.3.1. Respuesta del sistema inmunitario frente a la infección por el VIH-1	17
1.3.1.1. Respuesta inmunitaria innata o inespecífica	17
1.3.1.2. Respuesta inmunitaria adaptativa o específica	19
1.3.2. Mecanismos de evasión del VIH-1 a la respuesta inmunitaria	23
1.3.2.1. Variabilidad genética	24
1.3.2.2. Escape inmunológico a la respuesta de los linfocitos T citotóxicos	24
1.3.2.3. Escape a la acción de los anticuerpos neutralizantes	25
1.3.2.4. Reservorios virales	25
1.3.3. Infección por el VIH-1 y marcadores fenotípicos de activación del sistema inmunitario	26
2. CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS	27
2.1. Recuerdo histórico	27
2.2. Características generales de las células dendríticas	28
2.3. Origen, producción y función de las células dendríticas de sangre periférica	31
2.3.1. Precursores de células dendríticas	32
2.3.2. Células dendríticas de sangre periférica	34
2.3.2.1. Células dendríticas mieloides	35
2.3.2.2. Células dendríticas plasmocitoides	39
3. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)	42

3.1. Células presentadoras de antígeno en la infección por el VIH-1: aspectos generales	42
3.1.1. Depleción de células dendríticas de sangre periférica en la infección por el VIH-1	43
3.1.2. Infección de las células dendríticas de sangre periférica por el VIH-1	45
3.1.3. Alteraciones funcionales de las células dendríticas de sangre periférica en la infección por el VIH-1	47
3.2. Papel de las células dendríticas en la patogenia de la infección por el VIH-1	49
3.3. Efecto del tratamiento antirretroviral sobre las células dendríticas de sangre periférica de pacientes VIH-1+	51
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	55
III. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS	63
▪ ARTÍCULO 1: Las diferentes subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica de pacientes infectados por el VIH-1 presentan distintas alteraciones fenotípicas y funcionales.	67
▪ ARTÍCULO 2: Las alteraciones de las células dendríticas y monocitos de sangre periférica de pacientes VIH-1+ persisten tras 1 año de tratamiento antirretroviral.	83
▪ ARTÍCULO 3: Las alteraciones observadas en la capacidad de producción de citocinas por monocitos y células dendríticas de origen mieloide de sangre periférica de pacientes VIH-1+ sometidos a tratamiento antirretroviral se relacionan con la recuperación de los niveles de células T CD4+ y con la co-infección por el virus de la hepatitis C.	99
▪ ARTÍCULO 4: Relación entre la expresión de CD38 en linfocitos T y monocitos de sangre periférica y la respuesta al tratamiento antirretroviral (TAR): estudio longitudinal de una serie de pacientes VIH-1+ en fase crónica no tratados previamente con TAR.	115
IV. DISCUSIÓN	131
1. Distribución numérica y características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+.	136

2. Efecto del TAR sobre la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+.	142
3. Expresión de CD38 en linfocitos T y monocitos de SP de pacientes VIH-1+	151
V. CONCLUSIONES	157
VI. BIBLIOGRAFÍA	161
VII. ANEXO 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA LOS DIFERENTES GRUPOS DE INDIVIDUOS ANALIZADOS	193

I. Introducción

1. PATOGENIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

Desde su descubrimiento en 1983^{1,2}, el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) se ha identificado como el principal causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). En una minoría de casos la enfermedad es consecuencia de la infección por el VIH tipo 2 (VIH-2), filogenéticamente relacionado con el VIH-1, pero que proviene del virus de la inmunodeficiencia simio (SIV) de *Cercocebus atys*, mientras que el VIH-1 se originó a partir de *Pan troglodytes*³. Desde la descripción de los primeros casos de SIDA, la enfermedad se ha incrementado en proporciones epidémicas por todo el mundo, de modo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en la actualidad el número total de pacientes afectados por la epidemia del VIH-1/SIDA ronda los 33 millones de casos, la mayoría de los cuales vive en zonas en vías de desarrollo de África subsahariana, Asia y América del Sur⁴. Esta rápida expansión de la enfermedad (unos 2,5 millones de casos nuevos en el año 2007), junto a la altísima mortalidad en ausencia de tratamiento, el desconocimiento de gran parte de los mecanismos que intervienen en la infección y la falta de un tratamiento que erradique el virus, hacen del SIDA una de las enfermedades más importantes de finales del siglo XX y principios del siglo XXI, en la que se están invirtiendo gran cantidad de recursos económicos en su prevención, tratamiento e investigación, especialmente en los países desarrollados. Esta inversión en investigación ha dado sus frutos en los últimos años, no solo en relación con el conocimiento de la patogenia de la enfermedad, sino también con su control terapéutico. Así, la inclusión a partir del año 1996 de inhibidores de la proteasa (IP) y de inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósidos (ITINN) del virus en los protocolos de tratamiento antirretroviral, marcó el comienzo de la era del TARGA (tratamiento antirretroviral de gran actividad), condicionando una reducción notable de los índices de morbi-mortalidad en pacientes infectados por el VIH-1⁵⁻⁷, reflejado a su vez también en una disminución de la incidencia de infecciones oportunistas, tumores y muerte⁸. Desde entonces se ha producido un cambio de paradigma en el planteamiento terapéutico de la infección por el VIH-1, de forma que en la actualidad no cabe hablar de TARGA, sino simplemente de tratamiento antirretroviral

(TAR). Sin embargo, pese a las ventajas terapéuticas incuestionables logradas con la administración del TARGA, en la actualidad no se ha conseguido la erradicación del VIH-1 del organismo una vez adquirida la infección⁹⁻¹¹. Por otro lado, con la utilización del TARGA han surgido problemas adicionales, como la toxicidad provocada por los tratamientos a corto y a largo plazo, y la aparición de cepas resistentes al tratamiento antirretroviral, en el caso de no suprimirse la replicación del virus¹²⁻¹⁶.

1.1. CARACTERÍSTICAS DEL VIH-1

El VIH-1 es un retrovirus perteneciente a la familia de los lentivirus¹⁷, cuya estructura básica se ilustra de forma esquemática en la figura 1; tiene capacidad de infectar tanto células humanas de estirpe macrófaga como linfocitos T CD4+, afectando así de forma directa al sistema inmune del individuo infectado¹⁸. Desde el punto de vista estructural, el VIH-1 está formado por una partícula esférica de 100 nanómetros (nm), en la que se distinguen tres capas¹⁷: 1) capa interna o nucleocápside, que contiene el genoma viral, compuesto por una única cadena de ácido ribonucleico (ARN), junto con las enzimas necesarias para el ciclo intracelular del virus; 2) cápside icosaédrica; y 3) membrana lipoproteica, proveniente de la membrana de la célula infectada, en la que se insertan 72 complejos glicoproteicos, compuestos por trímeros de una glicoproteína (gp) externa llamada gp-120, y una proteína transmembrana, la gp-41, además de proteínas celulares (p. ej.: moléculas HLA-II –antígeno leucocitario humano de clase II, del inglés “*Human leukocyte antigen*”–). Una de las características del VIH-1 es la riqueza que posee de genes y proteínas reguladoras, lo que va a condicionar la interacción virus-célula huésped y por consiguiente, la patogenia de la enfermedad^{19,20}.

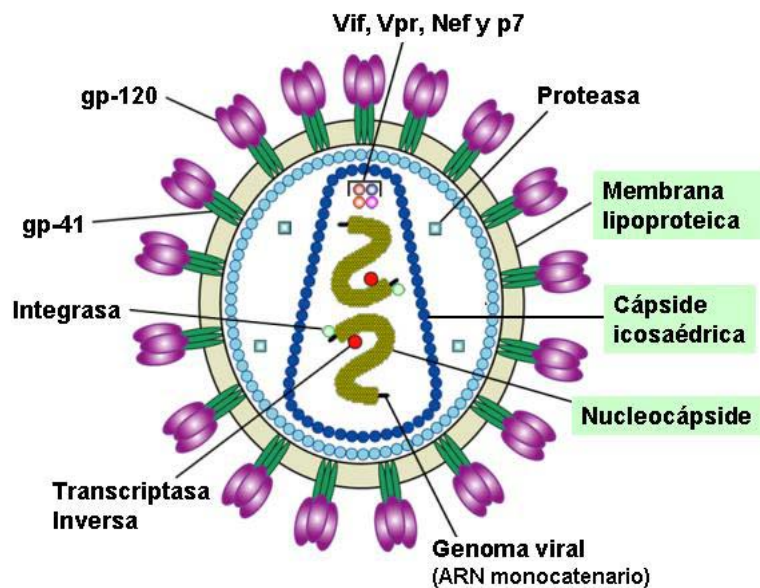


Figura 1. Representación esquemática de la estructura del VIH-1

1.1.1. Transmisión de la infección

A nivel mundial, la vía más común de transmisión del VIH-1 es la vía sexual; las otras formas de transmisión de la infección incluyen la materno-fetal, que puede producirse durante el embarazo, nacimiento o lactancia, y la transmisión parenteral (mediante la inyección o transfusión de sangre o productos sanguíneos contaminados, incluyendo el uso compartido de material de inyección contaminado entre usuarios de drogas por vía parenteral)²¹. Durante el proceso de transmisión, las células dendríticas inmaduras presentes en las mucosas constituyen una de las primeras barreras de defensa frente a la infección por el VIH-1²². Desafortunadamente, el papel que desempeñan las células dendríticas en las fases más tempranas de la infección es complejo y no siempre resulta beneficioso para el individuo infectado. Esto es debido a que las células dendríticas expresan en su superficie lectinas como DC-SIGN –del inglés “*Dendritic cell specific intercellular adhesion molecule (ICAM)-grabbing non-integrin*”– y L-SIGN –del inglés “*Liver/lymph node-specific ICAM-grabbing non-integrin*”–, a las que se adhieren numerosos virus con alta afinidad, entre los que se encuentra el VIH-1^{23,24}; por tanto, las células dendríticas que han captado el virus en su superficie, lo internalizan y migran a los ganglios linfáticos, donde promueven la generación de respuestas inmunitarias

específicas frente al VIH-1, tras la presentación de los antígenos virales a los linfocitos T CD4⁺²⁵. Sin embargo, dicho proceso resulta en la concentración de antígenos virales en la membrana plasmática de la célula dendrítica, y dado que la interacción entre las células dendríticas portadoras del virus y los linfocitos T CD4⁺ lleva frecuentemente a la infección de estos últimos, es muy probable que las células dendríticas desempeñen un papel muy importante en la transmisión y propagación del VIH-1, durante las fases más tempranas de la infección^{26,27}.

El conocimiento preciso de los mecanismos que involucran a las células dendríticas en estas fases tempranas de la enfermedad resulta fundamental, ya que podría reflejarse en el diseño de nuevas medidas terapéuticas y preventivas más eficaces.

1.1.2. Entrada del VIH-1 en la célula diana

La entrada del VIH-1 en la célula diana es un proceso secuencial en el que se produce la interacción con dos tipos de receptores: un receptor específico y común a todas las variantes del virus –la molécula CD4^{28,29}– y un correceptor. Los principales correceptores del VIH-1 son CXCR4 y CCR5³⁰⁻³³, pertenecientes a la familia de los receptores de quimiocinas; la utilización de un correceptor u otro depende de la secuencia de la gp de la envoltura viral, que condiciona su capacidad para unirse a uno o ambos correceptores^{34,35}. El virus que se transmite en la infección aguda por lo general corresponde al que presenta tropismo por los macrófagos, y que requiere de la presencia del correceptor CCR5; por ello, estas cepas se denominan cepas R5, caracterizadas por no producir sincitios linfocitarios cuando se cultivan *in vitro*. Por el contrario, las cepas que aparecen en estadios avanzados de la infección –cepas X4– requieren de la expresión del correceptor CXCR4, siendo cepas linfotrópicas y formadoras de sincitio³⁶. Tras la interacción con el receptor CD4, la gp-120 de la envoltura viral experimenta un cambio conformacional que le permite unirse a los correceptores virales CCR5 y/o CXCR4³⁷. Además de los linfocitos T CD4⁺, existen otras poblaciones celulares dentro del sistema inmunitario que expresan el receptor CD4 y los principales correceptores del VIH-1 –CXCR4 y CCR5–, como las células dendríticas de sangre periférica (SP)³⁸⁻⁴¹, lo que en principio las hace susceptibles a la infección por el virus^{39,42,43}. Es más, debido a su amplia localización en superficies mucosas,

las células dendríticas son consideradas por algunos autores como la primera célula diana del VIH-1 en las fases más tempranas de la infección^{44,45}, de acuerdo con los resultados de diferentes estudios realizados tanto *in vivo* como *ex vivo*^{39,42,46,47}.

La existencia de determinadas mutaciones y polimorfismos en la estructura de los genes que codifican los receptores de quimiocinas o sus ligandos naturales se ha asociado con un pronóstico favorable de la enfermedad; así, es sabido que la existencia de una delección de 32 pares de bases en el gen que codifica para el receptor de quimiocinas CCR5, se asocia con una evolución menos agresiva de la infección: los individuos homocigotos para dicha mutación son resistentes a la infección por cepas macrofagotrópicas, ya que sus células no expresan CCR5⁴⁸⁻⁵¹, mientras que los individuos heterocigotos muestran una expresión disminuida de CCR5 y presentan una progresión retardada de la enfermedad^{52,53}. Estos últimos suelen pertenecer a cohortes de pacientes VIH-1+ en los que la enfermedad no progresa a largo plazo (NPLP), caracterizados por mantener viremias bajas y estabilidad clínica durante muchos años, en ausencia de tratamiento⁵⁴. De manera similar, se ha asociado la presencia de mutaciones en los genes que codifican para RANTES –del inglés “*Regulated on activation, normally T cell expressed and secreted*”– y SDF-1 –del inglés “*Stromal derived factor 1*”– (los ligandos naturales de CCR5 y CXCR4, respectivamente) con una progresión más lenta de la infección^{55,56}, ya que la presencia de dichas mutaciones supone un aumento en la producción de RANTES y SDF-1, que compiten con el VIH-1 por unirse a los receptores CCR5 y CXCR4, respectivamente⁵⁷.

1.1.3. Ciclo biológico del VIH-1

Una vez tiene lugar la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática de la célula diana se produce la internalización de la cápside viral y su desensamblaje parcial en el citoplasma de la célula huésped¹⁷ (Figura 2). A partir de ese momento la transcriptasa inversa (TI) convierte el genoma viral, consistente en ARN monocatenario, en ácido desoxirribonucleico (ADN) bicatenario, el cual se acopla a una serie de factores celulares y virales constituyendo el complejo de pre-integración; dicho complejo es transportado al núcleo celular, donde tiene lugar la integración del ADN proviral en el genoma de la célula huésped¹⁷. El inicio de la

transcripción del genoma viral depende de diferentes factores celulares, entre los que destaca el factor de transcripción NF- κ B⁵⁸; dicho factor no existe en su forma activa en los linfocitos T CD4+ en reposo, sino que es inducido en procesos de activación celular; así, la replicación del VIH-1 va a depender del estado de activación de la célula huésped⁵⁹. En el caso de infectar células T CD4+ en estado de reposo, el ADN proviral puede permanecer en estado latente hasta que la célula infectada se active y entre en fase de división; dicha población de células T CD4+ en reposo infectada de manera latente representa el reservorio más importante del virus en el organismo, y supone la principal barrera para la erradicación del VIH-1 en pacientes sometidos a TAR⁶⁰⁻⁶². Una vez iniciado el proceso de transcripción del genoma viral tras la activación de la célula infectada, se induce la síntesis de proteínas reguladoras del VIH-1, como *tat* y *rev*. *Tat* aumenta la tasa de transcripción del VIH-1 y, junto con otros factores celulares, permite la elongación completa del ARN mensajero (ARNm) del virus⁶³. *Rev* se encarga fundamentalmente del transporte del ARNm viral al citosol y de su procesamiento en ARN de distintos tamaños, mediante la activación de la expresión de genes estructurales y enzimáticos⁶⁴. Las proteínas del VIH-1 son procesadas por la proteasa viral en cooperación con otras proteasas celulares antes de ensamblarse para formar partículas virales maduras⁶⁵ que, una vez sintetizadas, se liberan al exterior de la célula⁶⁶.

A lo largo del ciclo celular del VIH-1, las proteínas reguladoras del virus le permiten evitar las restricciones intracelulares innatas. Así, se ha demostrado que el VIH-1 es resistente a la actividad de la TRIM5 α ⁶⁷ –del inglés “*tripartite motif 5-alpha protein*”–, proteína que modifica la decapsidación vírica de forma especie-específica⁶⁸. Asimismo, los lentivirus de primates (entre los que se encuentra el VIH-1) producen la proteína *vif*, que inhibe una citidin-deaminasa llamada APOBEC3G, que pertenece a la familia de enzimas que participan en la edición del ADN. En ausencia de *vif*, APOBEC3G se incorporaría en el virión e interferiría el proceso de retrotranscripción en la siguiente célula infectada, al producir mutaciones en el ADN sintetizado por la TI, lo cual originaría virus no viables y frenaría el proceso de propagación del VIH-1⁶⁹. Otra proteína viral, *vpu*, inhibe la actividad de la molécula CD317 –también llamada BST2, HM1.24 o “*tetherin*”–, cuya función es atar la partícula vírica en gemación e internalizarla en un proteosoma que la destruiría⁷⁰. Por último, muy recientemente se han definido más de

250 factores celulares que el VIH-1 utiliza para el éxito de su infección a lo largo del ciclo celular⁷¹, que han recibido la denominación de “*HIV-dependency factors*” (HDF), mucho más allá, por lo tanto, de los conocidos receptores de quimiocinas y CD4⁷². El ciclo biológico completo del VIH-1 desde la penetración del virus en la célula diana hasta la formación y salida de las partículas virales se muestra de forma esquemática en la figura 2.

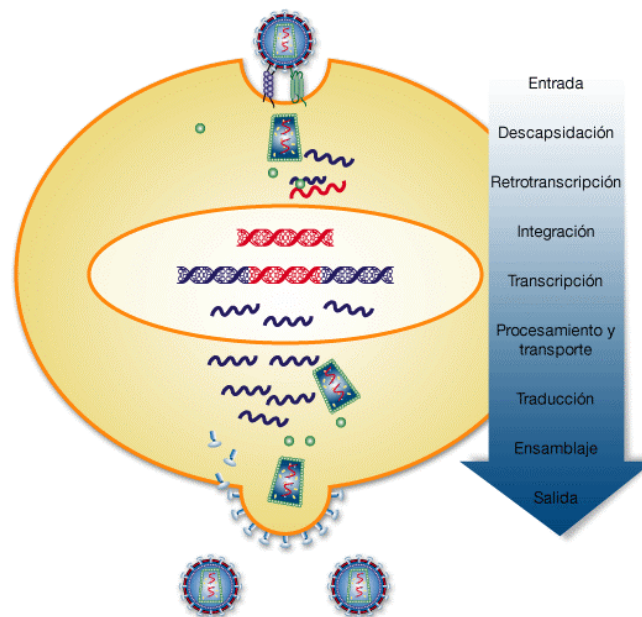


Figura 2. Representación esquemática de las distintas etapas del ciclo biológico del VIH-1
(modificado de Alcamí y cols. 2004)

1.2. PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

1.2.1 Aspectos generales

El conocimiento de la patogenia de la infección por el VIH-1 constituye un requisito indispensable a la hora de mejorar los tratamientos antirretrovirales actuales, y de diseñar nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas. Desgraciadamente, a pesar del esfuerzo realizado en las dos últimas décadas, existen muchos aspectos de la patogenia de la infección que siguen sin conocerse. En un principio, el curso que seguía la infección por el VIH-1 se consideraba como un proceso de degradación del sistema inmune lento y progresivo que desembocaba de forma inexorable en un estado de inmunodeficiencia general, con la aparición

del estadio de SIDA⁷³⁻⁷⁵. En la actualidad, si bien está demostrado que la inmunodeficiencia progresiva a la que conduce la infección por el VIH-1 es la característica principal del SIDA, el modelo de patogenia que asocia la replicación viral como causa directa de la inmunodeficiencia ha generado ciertas discrepancias^{76,77}. En un principio se descubrió que el VIH-1 infecta y destruye a los linfocitos T CD4+, su principal célula diana^{78,79}, lo que sugirió que la destrucción directa de las células T CD4+ por el virus resultaba en la pérdida de funciones efectoras y/o reguladoras críticas, conduciendo finalmente al estado de inmunodeficiencia característico de la enfermedad^{80,81}. Sin embargo, observaciones posteriores, como el hecho de que únicamente una pequeña proporción de linfocitos T CD4+ está infectada en la fase crónica de la infección⁸², o que la pérdida de células T CD4+ se produce muy lentamente, y que además transcurre un largo período de tiempo entre el contagio de la infección y el estadio de SIDA⁸³ –todo ello en presencia de una elevada tasa de replicación viral–, apoyan otro modelo de patogenia. De esta manera, se ha sugerido que otros mecanismos patogénicos indirectos, como la apoptosis de células adyacentes, la activación crónica del sistema inmune y la pérdida gradual de la capacidad de regeneración de células T, también serían responsables de la progresión de la enfermedad⁸⁴⁻⁸⁶.

Así, hace unos años se descubrió que en macacos infectados por el SIV –hasta la fecha el modelo animal que mejor se adapta a lo que ocurre en la infección por el VIH-1 en el hombre– se producía la pérdida prácticamente total de células T CD4+ de la lámina propia de la mucosa intestinal⁸⁷. Posteriormente otros estudios demostraron que el mismo fenómeno se producía en pacientes infectados por el VIH-1^{88,89}. Más recientemente, en el año 2005, los estudios realizados por Li y *co/s.* y Mattapallil y *co/s.* en macacos SIV+^{90,91} supusieron un giro radical del concepto clásico de patogenia de la infección por el VIH-1. Estos estudios sugieren que la patogenia de la infección comprende dos fases: la infección aguda y la infección crónica. La fase de infección aguda se caracteriza por una depleción rápida y masiva de linfocitos T CD4+ con fenotipo de memoria (tanto la población CD45RA⁻/CCR5⁺ como las células CD45RA⁺/CD95⁺/CCR5⁺), que tiene lugar fundamentalmente en el tejido linfoide asociado a mucosas^{90,91}; dicha depleción conduce a un deterioro importante de la funcionalidad del sistema inmune en general, provocando un daño potencialmente irreversible, particularmente

en la respuesta inmunitaria mediada por células T CD4⁺^{92,93}. La generación de una respuesta inmunitaria de tipo celular y humoral potente, pero finalmente ineficaz, lleva a la aparición de la segunda fase de infección crónica. En este período son característicos el control parcial de la replicación viral, la activación crónica del sistema inmune, la disminución progresiva de células T vírgenes y de memoria, y la depleción de linfocitos T CD4⁺ de la circulación sanguínea^{90,91,94}.

1.2.2. Infección por el VIH-1 *in vivo*

En la infección por el VIH-1 habitualmente se distinguen tres etapas secuenciales: la infección aguda, la infección crónica y el estadio de inmunodeficiencia acelerada.

1.2.2.1. Fase aguda de la infección

El VIH-1 y la mayoría de las cepas del SIV utilizan CCR5 como principal correceptor en las fases más tempranas de la infección, y por lo tanto, su principal diana es la célula T CD4⁺ CCR5⁺⁹⁵. El tejido linfoide asociado a mucosas –que incluye las mucosas del tracto genital y gastrointestinal, donde ocurre la transmisión del VIH-1 por vía sexual– alberga la mayoría de linfocitos T CD4⁺ del organismo, gran parte de los cuales expresa CCR5 y presenta un fenotipo de célula de memoria activada⁹⁶. Estudios recientes han demostrado que una de las principales características de las fases iniciales de la infección por el VIH-1 y el SIV es la infección y depleción masiva de linfocitos T CD4⁺ CCR5⁺ efectores de memoria (T_{EM}) del tejido linfoide asociado a mucosas⁸⁸⁻⁹¹. Dichos estudios demuestran que a los diez días de la infección, la mayoría de las células T_{EM} CD4⁺ del tejido linfoide asociado a mucosas están infectadas de manera productiva o bien mueren por apoptosis tras su interacción con el virus^{90,91}. La replicación viral intensa y descontrolada que tiene lugar en esta etapa de la infección, se refleja en unos niveles muy elevados de carga viral en plasma (entre 10⁷ y 10⁸ millones de copias/ml), y tiene como consecuencia la depleción masiva (en ocasiones casi completa) de células T_{EM} CD4⁺ del tejido linfoide asociado a mucosas entre las 2 y 3 primeras semanas desde el inicio de la infección^{88-91,96}. Merece destacar que en macacos SIV+, el marcador que mejor predice la progresión de la infección no es la depleción de células T CD4⁺ CCR5⁺, sino la capacidad del

organismo para regenerar el compartimiento de células T_{EM} CD4⁺⁹⁶. Los linfocitos T_{EM} CD4⁺ constituyen un componente fundamental de las barreras mucosas en la defensa frente a microorganismos patógenos, por lo que es muy probable que su depleción altere de manera significativa el correcto funcionamiento de esta barrera defensiva⁹⁴. Esta situación puede dar lugar a la aparición de infecciones por microorganismos que actúan como patógenos oportunistas, que no se manifiestan clínicamente, y que a su vez contribuyen a la destrucción progresiva de este microambiente y a la activación crónica del sistema inmune⁹⁴. La disminución de células T CD4⁺ que se produce en esta fase de la infección no afecta de manera tan espectacular a los compartimientos de SP y órganos linfoides secundarios, ya que en estos tejidos las células T_{EM} CD4⁺ representan una pequeña proporción de todos los linfocitos, predominando en ellos las células T vírgenes y de memoria central, que no expresan el correceptor CCR5^{88,89,96}.

La depleción masiva de células T_{EM} CD4⁺ que se observa a las pocas semanas de la infección por el VIH-1 y el SIV plantea diversas cuestiones, que siguen sin aclararse completamente: en estas circunstancias, ¿cómo es posible que sobrevivan los individuos infectados hasta la fase crónica de la infección?; por otro lado, ¿cómo se mantiene la replicación viral en la fase crónica?. Ambas cuestiones podrían explicarse gracias al hecho de que las células T_{EM} CD4⁺ se regeneran continuamente a partir de la proliferación y diferenciación de células T CD4⁺ de memoria central y/o de linfocitos T vírgenes^{96,97}, y a que, en la infección aguda por cepas macrofagotrópicas del SIV los compartimientos de células T, tanto de memoria central como de células vírgenes, permanecen intactos⁹⁶. Por tanto, la regeneración de células T_{EM} CD4⁺ permite por un lado, contrarrestar –aunque no de manera absoluta– la depleción de estas células en el tejido linfoide asociado a mucosas, y por otra parte, proporciona una fuente continua de células diana para el VIH-1, manteniendo la replicación viral⁹⁸.

1.2.2.2. Fase crónica de la infección

La incapacidad de la respuesta inmunológica generada por el huésped para contener la replicación del VIH-1 conduce a la fase crónica de la infección, caracterizada por una activación

generalizada del sistema inmune en presencia de una replicación continua del virus⁹⁴. La fase crónica de la infección por el VIH-1 tiene una duración aproximada de 10 años, y se caracteriza esencialmente por el descenso lento pero progresivo del número de linfocitos T CD4+ en SP, la persistencia en ella de una pequeña fracción de células CD4+ infectadas, y la elevada tasa de muerte de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+⁹⁴. Este último hallazgo se ha asociado con la activación crónica del sistema inmune, que en la actualidad se ha reconocido como una de las principales causas de la depleción de linfocitos T CD4+ y de la progresión de la infección^{77,85,99,100}.

Durante esta fase, los órganos linfoides secundarios constituyen el principal reservorio de replicación del VIH-1¹⁰¹⁻¹⁰³, existiendo una gran cantidad de viriones extracelulares en los ganglios linfáticos, donde se disponen en los espacios interdigitantes de las células dendríticas, células que a su vez favorecen la propagación de la infección al estar en estrecho contacto con los linfocitos T a través de la molécula DC-SIGN (CD209)¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. La población de linfocitos T CD4+ activados constituye la principal fuente de viriones¹⁰⁷, que a su vez infectarán a otros linfocitos activados; tal es el caso de los linfocitos en fase de expansión, cuya misión es reponer los compartimentos destruidos, o bien de los linfocitos que se han activado al reconocer los antígenos virales (anti-VIH-1 específicos), lo que les hace más susceptibles a la infección⁸². La profunda inmunosupresión provocada por el VIH-1 conduce finalmente a una incapacidad progresiva del sistema inmunitario para contener la replicación viral⁸⁶.

Además de ser el lugar donde ocurre la depleción inicial de linfocitos T_{EM} CD4+, el intestino constituye también el origen de la activación generalizada del sistema inmune, que es la base patogénica de la inmunodeficiencia a la que conduce la infección por el VIH-1⁹². Esta activación inespecífica del sistema inmune se desencadena y mantiene gracias a la traslocación bacteriana que sucede en el intestino¹⁰⁸. Así, los pacientes VIH-1+ en fase crónica presentan unos niveles elevados de lipopolisacárido (LPS) y de ADN bacteriano 16S, que disminuyen tras el inicio del TAR¹⁰⁹. Además, recientemente se ha demostrado que los productos bacterianos inducen la activación del sistema inmune a través de receptores de membrana de tipo Toll –TLR, del inglés “*Toll-like receptor*”– lo que contribuye por una parte, a la entrada en ciclo celular de los linfocitos T CD4+ y su muerte, y por otro lado, a aumentar la

expresión de CD69 y la capacidad de adhesión de los linfocitos T CD8+, facilitando que dichas células se mantengan en los órganos linfoides^{110,111}.

1.2.2.3. Estadio de inmunodeficiencia acelerada

Los estadios finales de la infección se caracterizan por la aparición de infecciones producidas por gérmenes oportunistas, por el descenso marcado del número absoluto de linfocitos T CD4+ y por el incremento de la carga viral. Además, se produce la destrucción de la arquitectura de los ganglios linfáticos, con la desaparición de los centros germinales. La replicación viral masiva, producida como consecuencia de la pérdida del control de la infección por parte del sistema inmunitario, pone de manifiesto el agotamiento del mismo¹¹², concomitante con el predominio de variantes virales linfotrópicas más agresivas, con afinidad por el correceptor CXCR4^{113,114}.

1.2.3. Mecanismos de depleción de linfocitos T CD4+

El descenso inexorable de linfocitos T CD4+ representa la característica principal de la infección por el VIH-1⁷⁷. Como se ha descrito anteriormente, en un principio se postuló que la depleción de linfocitos T CD4+ era una consecuencia directa de la replicación del VIH-1 y del consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada¹¹⁵. Sin embargo, la destrucción de los linfocitos T CD4+ por efecto citopático directo no puede ser la única causa de su depleción, ya que en la fase crónica de la infección, solamente una pequeña proporción de las células T CD4+ se encuentra infectada por el VIH-1⁸⁴; así, hoy se conoce la existencia de otros mecanismos de destrucción indirecta o bloqueo linfocitario, implicados también en el descenso del número de linfocitos T CD4+.

1.2.3.1. Destrucción de linfocitos T CD4+ por efecto citopático directo

La destrucción directa de linfocitos T CD4+ por el virus constituye una de las causas de destrucción linfocitaria en la infección por el VIH-1¹¹⁵. Las cepas linfotrópicas del VIH-1, que

requieren de la presencia del correceptor CXCR4 en la membrana de la célula diana para poder infectarla, aparecen típicamente en los estadios más avanzados de la enfermedad, infectando preferentemente a linfocitos T³⁶. Dichas cepas inducen la fusión entre membranas de células adyacentes, tanto infectadas como no infectadas, formando una gran célula multinucleada denominada “*sincitio*” y acelerando el proceso de destrucción celular en las fases más avanzadas de la infección¹¹⁶, aunque *in vivo* no se ha demostrado la presencia de sincitios en órganos linfoides.

Por otra parte, la liberación de partículas víricas maduras al exterior de la célula infectada altera la permeabilidad de la membrana celular, provocando su destrucción¹¹⁷. Existen determinadas proteínas del VIH-1, como *vpu*, que aumentan la permeabilidad de la membrana de la célula, promoviendo la liberación de viriones al exterior, e incrementando la tasa de destrucción celular⁶⁶.

1.2.3.2. Destrucción de linfocitos T CD4+ por mecanismos indirectos

La apoptosis representa un proceso fisiológico que el organismo dispone para eliminar células defectuosas o que se acumulan en exceso¹¹⁸. En la infección por el VIH-1, el virus utiliza esta función celular para destruir tanto células infectadas como no infectadas; de hecho, se ha demostrado que en los ganglios linfáticos de pacientes VIH-1+, la mayor parte de las células apoptóticas no están infectadas por el virus¹¹⁹. Así, diferentes estudios han demostrado que un nivel elevado de apoptosis se correlaciona directamente con la progresión de la infección, e inversamente con el recuento de linfocitos T CD4+^{120,121}. El VIH-1 puede inducir apoptosis a través de diferentes mecanismos. Por un lado, la interacción de la gp-120 de la envoltura viral con el receptor CD4 de la membrana de los linfocitos T no infectados induce apoptosis de los mismos, al activar una serie de rutas metabólicas que llevan a la activación de las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis^{122,123}. Otras proteínas víricas implicadas también en la inducción de apoptosis de células T CD4+ por el VIH-1 son *tat*, *vpr* y *nef*. *Tat* activa las vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis¹²⁴, mientras que *vpr* activa la apoptosis de células infectadas a través de la vía endógena¹²⁵. *Nef* desencadena apoptosis al aumentar en las células infectadas la expresión de ligandos de muerte (como el ligando de Fas, también

llamado CD95L o CD178), que al interactuar con su receptor correspondiente en los linfocitos T CD8+ provocan la destrucción de estos últimos¹²⁶.

Un mecanismo indirecto adicional es el mediado por linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del VIH-1, que reconocen linfocitos T CD4+ infectados por el VIH-1 que expresan péptidos virales acoplados a sus moléculas HLA-I –antígeno leucocitario humano de clase I–, provocando su lisis o destrucción¹²⁷.

1.2.3.3. Alteraciones en la homeostasis linfocitaria

El deterioro progresivo del sistema inmunitario se ve amplificado, además de por los mecanismos inductores de muerte celular antes referidos, por alteraciones en la redistribución linfocitaria, el bloqueo de la regeneración de células T y la “hiperactivación” del sistema inmunitario.

- Alteraciones en la redistribución linfocitaria: Se ha demostrado que la acumulación de partículas víricas en los órganos linfoides, especialmente en los ganglios linfáticos, origina un fenómeno de reclutamiento de linfocitos T CD4+ procedentes de la circulación, en torno a las células dendríticas foliculares recubiertas de viriones^{77,104}. De hecho, diferentes estudios sostienen que el incremento del número absoluto de linfocitos T CD4+ circulantes que se observa en las primeras semanas tras el inicio del TAR, se debe a una redistribución de linfocitos secuestrados en los órganos linfoides como consecuencia de la replicación viral, y no a un aumento neto de los mismos¹²⁸⁻¹³¹.

- Bloqueo en la regeneración linfocitaria: Durante la fase crónica de la infección por el VIH-1 existe un bloqueo de la activación y proliferación de los linfocitos T CD4+⁷⁷; dicho bloqueo puede producirse tanto a nivel central (timo o médula ósea) como periférico (órganos linfoides periféricos)¹³².

- Hiperactivación y agotamiento del sistema inmune: La activación crónica del sistema inmune característica de la infección por el VIH-1, implicaría un aumento del número de ciclos de división de los linfocitos, particularmente de los linfocitos T CD8+¹³³; con ello provocaría alteraciones en la homeostasis de los linfocitos activados, cuya destrucción por apoptosis se induciría al cabo de un número determinado de divisiones, disminuyendo a su vez la

generación de un compartimiento de linfocitos de memoria; todo esto lleva a una pérdida paulatina del repertorio inmunológico¹³⁴.

1.3. ASPECTOS INMUNOLÓGICOS DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

1.3.1. Respuesta del sistema inmunitario frente a la infección por el VIH-1

1.3.1.1. Respuesta inmunitaria innata o inespecífica

La respuesta inmunitaria innata desempeña un papel relevante en la contención inicial de la infección, y por lo tanto, puede ser crucial en la fase aguda de la misma. Como componentes de la respuesta inmunitaria inespecífica, destacamos la acción de diferentes factores solubles, así como la respuesta innata mediada por células.

- **Mediadores solubles:** Existen diferentes factores solubles que son activos frente al VIH-1, como las proteínas del sistema del complemento¹³⁵ y los interferones antivirales¹³⁶. Otros mediadores solubles que también participan en la defensa frente al VIH-1 se incluyen en el grupo de las defensinas, quimiocinas y otras citocinas^{57,137,138}. En 1986 se descubrió que los linfocitos T CD8+ eran capaces de inhibir la replicación viral en pacientes seropositivos, a través de mecanismos no citolíticos¹³⁹; dicha actividad anti-VIH-1 depende de factores solubles secretados por los linfocitos T CD8+, entre los que se encuentran quimiocinas de tipo CC (p. ej.: RANTES –CCL5–, MIP-1 α –CCL3–, y MIP-1 β –CCL4–, que al unirse a su receptor CCR5 provocan la internalización del mismo en la célula¹⁴⁰, inhibiendo así la infección por cepas macrofagotrópicas del VIH-1¹⁴¹), y de tipo CXC (p. ej.: SDF-1 o CXCL12, que de manera similar¹⁴², al unirse a su receptor CXCR4 inhibe la infección por cepas linfotrópicas del VIH-1^{143,144}). Existen otros factores antivirales también secretados por los linfocitos T CD8+, cuyo mecanismo de acción aún no se ha caracterizado completamente; dichos factores se han denominado genéricamente CAF (factores producidos por CTL activados)^{139,145} y bloquean la replicación del VIH-1 inhibiendo el proceso de transcripción del virus¹⁴⁶.

Además de los linfocitos T CD8+, existen otras células como las de los epitelios vaginal, endocervical y rectal, que también producen grandes cantidades de SDF-1, que actuaría bloqueando la propagación de variantes linfotrópicas¹⁴⁷.

La hiperactivación del sistema inmunitario característica de la infección por el VIH-1 se manifiesta además por un exceso en la producción de citocinas inflamatorias, como la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)^{148,149}. Merece destacar que la secreción incrementada de citocinas inflamatorias se ha asociado, por un lado, a un aumento de la replicación viral en linfocitos T CD4+^{150,151}, y por otra parte, a un mayor reclutamiento de células T CD4+ a los tejidos inflamados, contribuyendo a la propagación de la infección¹⁵²⁻¹⁵⁴.

- **Inmunidad innata mediada por células:** Existen dos poblaciones celulares que desempeñan un papel fundamental en la respuesta inmunitaria innata frente al VIH-1, que son las células asesinas naturales (células NK, del inglés *natural killer*) y las células dendríticas plasmocitoides.

Las células NK constituyen un componente esencial de la respuesta inmunitaria inespecífica y tienen la capacidad natural de destruir células infectadas sin necesidad de reconocer específicamente los antígenos virales presentados en las moléculas del sistema HLA¹⁵⁵. Las células NK destruyen la célula diana por contacto directo en ausencia de anticuerpos (gracias a que poseen un complejo sistema de receptores activadores e inhibidores)¹⁵⁶, o bien mediante mecanismos de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC)¹⁵⁷. Recientemente se ha asociado un aumento de la actividad funcional de las células NK, traducido en una producción incrementada de citocinas –TNF- α e interferón-gamma (IFN- γ)– y de beta-quimiocinas –CCL3, CCL4, CCL5– por dichas células, con una mayor protección frente a la infección por el VIH-1^{158,159}. Por lo general, las células NK de pacientes VIH-1+ muestran una capacidad citolítica inferior a la de las células NK de individuos sanos; algunos autores han sugerido que la disminución de la expresión de receptores naturales de citotoxicidad (NCR) y de los niveles de perforinas en las células NK de pacientes infectados por el VIH-1 podrían ser la causa de las alteraciones observadas en su capacidad citolítica¹⁶⁰. A pesar de que existen numerosos estudios sobre el papel que desempeñan las células NK en la infección por el VIH-1, en la actualidad éste sigue sin conocerse en detalle y necesita ser estudiado con mayor profundidad.

Las células dendríticas plasmocitoides constituyen otro componente celular de la inmunidad innata esencial en la lucha frente a infecciones víricas, siendo la principal fuente celular de interferones de tipo I (IFN- α , - β , - ω)¹⁶¹⁻¹⁶³, cuya actividad antiviral se ha demostrado ampliamente¹⁶⁴⁻¹⁶⁶. Tras su estimulación a través de los receptores de membrana TLR-7 y TLR-9, las células dendríticas plasmocitoides producen IFN de tipo I en respuesta a diferentes virus, entre los que se encuentra el VIH-1¹⁶⁷. Como se describe de forma más detallada en el apartado final de esta Introducción, centrada más específicamente en el papel de las células dendríticas en la infección por el VIH-1, recientemente se ha demostrado que el número absoluto de células dendríticas plasmocitoides circulantes se encuentra significativamente reducido en estos pacientes¹⁶⁸⁻¹⁷², lo que podría deberse a su posible infección tras contactar con el virus, ya que al expresar CD4 y los principales correceptores del VIH-1, CXCR4 y CCR5, podrían constituir, junto a los linfocitos T CD4+, una célula diana del virus. De hecho, diversos estudios realizados tanto *in vitro*¹⁷³⁻¹⁷⁵ como *ex vivo*^{47,176} han demostrado que estas células resultan infectadas tras su contacto con el VIH-1. Como consecuencia de la depleción de células dendríticas plasmocitoides observada en pacientes VIH-1+, la producción de IFN- α a partir de dichas células en respuesta a la infección se encuentra considerablemente reducida en estos individuos; este descenso en la producción de IFN- α se ha asociado con niveles de ARN viral más elevados y con una progresión más rápida de la enfermedad^{168,171,172}. Tras la administración de TAR a pacientes VIH-1+, se ha observado un incremento de los niveles de células dendríticas plasmocitoides en la circulación, lo que a su vez se ha relacionado con la capacidad de estos individuos para controlar espontáneamente la replicación viral, tras la interrupción del tratamiento^{177,178}. En conjunto, estos hallazgos reafirman el papel relevante de las células dendríticas plasmocitoides en la lucha frente al VIH-1. Por otra parte, merece destacar que esta población celular no solamente participa en la respuesta inmunitaria frente a la infección por el VIH-1 a través de la producción de IFN de tipo I, sino que, al convertirse en células dendríticas maduras, también participan en la respuesta inmunitaria adaptativa, a través de la presentación de los antígenos del virus a las células T¹⁷⁹.

1.3.1.2. Respuesta inmunitaria adaptativa o específica

Prácticamente todos los individuos VIH-1+ desarrollan una respuesta inmunitaria específica frente al virus, aunque únicamente una minoría de ellos es capaz de controlar la viremia durante un tiempo prolongado. Dentro de la respuesta inmunitaria adaptativa frente al VIH-1, comentaremos en distintas secciones el papel de los anticuerpos neutralizantes específicos del VIH-1, el de los CTL CD8+ y el de los linfocitos T colaboradores CD4+.

- **Respuesta humoral específica frente al VIH-1:** Aunque la infección por el VIH-1 desencadena una intensa respuesta humoral frente a prácticamente todas las proteínas reguladoras y estructurales del virus¹⁸⁰, el poder neutralizante de dicha respuesta en la lucha contra el VIH-1 ha sido cuestionada por diversos autores¹⁸¹⁻¹⁸³. Los anticuerpos que tienen capacidad para neutralizar el VIH-1 son fundamentalmente aquellos dirigidos frente a gp-41 y frente a los dominios variable 3 (V3) y de interacción con CD4 de la proteína gp-120¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Por desgracia, se ha demostrado que la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante es escasa, y rápidamente se observa un escape viral a los mismos¹⁸⁷. Este escape probablemente se debe a que las regiones de la envoltura viral más expuestas e inmunógenas son altamente variables, e inducen la síntesis de anticuerpos frente a los que se produce el escape del VIH-1 mediante la mutación de los epítomos reconocidos¹³⁴. Por el contrario, los epítomos inducidos por la unión a CD4 son mucho más estables y capaces por tanto, de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro, aunque únicamente se exponen cuando la gp-120 de la envoltura se despliega para unirse a dicho receptor^{187,188}. Por otra parte, en los ensayos de inmunización realizados hasta la fecha no se ha logrado obtener niveles adecuados de anticuerpos neutralizantes, ni se ha demostrado que éstos confieran una protección adecuada de manera sistemática¹⁸⁹⁻¹⁹¹.

- **Respuesta T citotóxica:** Al igual que en otras infecciones víricas, en los pacientes infectados por el VIH-1 existen expansiones oligoclonales de linfocitos T CD8+ con actividad citotóxica (CTL), fundamental para el control de la infección, y restringida por el reconocimiento de los antígenos del virus a través del sistema HLA-I^{192,193}. Este tipo de respuesta es más precoz e intensa que la respuesta humoral en el control de la replicación viral¹⁹⁴. El complejo formado por el péptido antigénico y la molécula HLA-I es reconocido a través del receptor específico para antígeno de la célula T CD8+, desencadenándose la respuesta CTL específica

frente al VIH-1^{195,196}. La respuesta CTL es particularmente intensa en pacientes en la fase de primoinfección y su intensidad se correlaciona con el control de la replicación viral¹⁹⁷. Experimentalmente, los datos más concluyentes sobre el papel de los CTL en el control de la replicación viral provienen de estudios en los que la depleción de linfocitos T CD8+ en macacos infectados por el SIV origina un gran aumento de la viremia y acelera la progresión de la infección en el animal¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

Hasta la fecha se han implicado diferentes mecanismos en la actividad antiviral de los CTL. Por una parte, los CTL provocan la lisis directa de células infectadas por el VIH-1 mediante la liberación de perforinas y otras enzimas citolíticas, bloqueando la propagación de la infección¹³⁹. Aunque la actividad citolítica de los CTL se produce fundamentalmente a través de esta vía, las células T CD8+ que expresan Fas-L (CD95-L o CD178) pueden unirse a su receptor –Fas (CD95)– en la superficie de la célula infectada, induciendo su muerte por apoptosis²⁰¹. Además, como se ha comentado anteriormente, los CTL producen factores solubles como quimiocinas y CAF, que han demostrado poseer actividad antiviral^{139,202-204}.

El control parcial de la replicación viral que se observa a los pocos días de la infección se ha relacionado con la aparición de una respuesta CTL específica frente al VIH-1²⁰⁵. De manera similar, en la fase aguda de la infección, la aparición de poblaciones efectoras que lisan células infectadas por el VIH-1 se ha asociado con una disminución de la carga viral en plasma²⁰⁶⁻²⁰⁹. De acuerdo con estas observaciones, se ha demostrado la existencia de una expansión oligoclonal de poblaciones linfocitarias T en SP, coincidiendo con el “*set point*” virológico o fase de equilibrio, que se produce a las pocas semanas de la infección por el VIH-1²¹⁰. Por el contrario, otros autores no han encontrado una asociación clara entre los niveles de carga viral y la magnitud de la respuesta de los CTL²¹¹⁻²¹³. Entre otros factores, la incapacidad de los CTL específicos del VIH-1 para controlar la replicación del virus se ha relacionado con: 1) la depleción de los linfocitos T CD4+ colaboradores provocada por el VIH-1, que puede actuar como causa importante de la pérdida progresiva de la capacidad funcional de los CTL, ya que las células T CD4+ son críticas en la generación de la respuesta específica de los CTL frente al VIH-1²¹⁴⁻²¹⁷; 2) los defectos funcionales de los CTL que los hacen incapaces de controlar la infección por el VIH-1, como una capacidad de producción de citocinas y perforinas

notablemente reducida²¹⁸⁻²²², o alteraciones en su diferenciación y maduración^{221,223}, y; 3) el escape viral debido a la generación de variantes del virus que no son reconocidas por el repertorio de CTL previamente establecido, observado en pacientes con infección avanzada y deterioro inmunológico²⁰⁸.

Debido a la importancia de los CTL en el control de la replicación del VIH-1, el haplotipo del complejo HLA-I que presentan los individuos infectados va a tener mucha importancia en la progresión de la infección, ya que el péptido antigénico que es reconocido por los CTL y la magnitud de la respuesta de los CTL específica frente al VIH-1 vienen en parte determinados por las moléculas HLA-I que expresa el individuo. Así, la expresión de ciertas moléculas del complejo HLA-I, como HLA-B14, B27, B51, B57 y Cw8, se ha asociado a una progresión más lenta de la infección en pacientes VIH-1+^{194,224-226}, mientras que la expresión de HLA-A23, B35, B37 y B49 se ha asociado a un pronóstico más adverso²²⁷. Más recientemente, estudios de asociación basados en análisis de genoma completo –WGAS, del inglés “*genome-wide association studies*”–, han demostrado que el HLA-B*5701 es uno de los parámetros predictivos más potentes de carga vírica en la fase de equilibrio, y de progresión a la inmunodeficiencia, siendo bien conocido que con este alelo se genera una respuesta citotóxica especialmente potente²²⁸.

- Respuesta de los linfocitos T CD4+ colaboradores: La respuesta celular específica frente al VIH-1 no se limita a los linfocitos T CD8+, sino que requiere de una respuesta CD4 específica²²⁹. La existencia de poblaciones de linfocitos T CD4+ que responden de manera específica frente al VIH-1 se ha demostrado mediante estudios que miden la producción de citocinas por estas células, tras su estimulación con antígenos víricos derivados del VIH-1^{216,217}. Es más, la magnitud de la capacidad de los linfocitos T CD4+ para proliferar y producir citocinas en respuesta al virus se relaciona con el estadio clínico, tanto en pacientes infectados por el VIH-1, como en macacos SIV+^{229,230}. Pese a estos hallazgos, hoy se sabe que la capacidad de los linfocitos T colaboradores para responder frente a la infección por el VIH-1 se encuentra profundamente alterada²³¹⁻²³³. Aunque incluso en estadios avanzados de la infección se observa producción de IFN- γ en respuesta a antígenos víricos²¹⁶, los linfocitos T CD4+ proliferan muy raramente en pacientes no tratados, a excepción de los sujetos VIH-1+ NPLP²²⁹.

Merece destacar que la capacidad de proliferación de las células T CD4+ frente a antígenos del VIH-1 se puede conservar o restaurar en pacientes que reciben tratamiento inmediatamente después de la adquisición de la infección¹⁹⁷, y en una proporción de individuos infectados en los que la administración de TAR provoca la supresión de la replicación viral^{217,234}. Por el contrario, el restablecimiento de este tipo de respuesta es menos habitual en pacientes VIH-1+ que comienzan el tratamiento antirretroviral en estadios más avanzados de la infección^{130,231}.

La activación crónica del sistema inmune constituye un componente crítico en la patogenia de la infección por el VIH-1, ya que: 1) por un lado, la activación de los linfocitos T CD4+ proporciona nuevas células diana para el VIH-1^{85,235}, contribuyendo al mantenimiento de la infección; 2) por otra parte, el incremento de la producción de nuevos linfocitos provocado por la activación excesiva, hace que se acabe consumiendo el repertorio de células T vírgenes y de memoria, con una expansión concomitante de células CD4+ efectoras^{100,236}; 3) además, la activación crónica y la proliferación excesiva de linfocitos T puede inducir alteraciones en el control del ciclo celular y un incremento de la apoptosis^{84,237}; 4) es posible que la activación inmune provocada por el VIH-1 sea responsable, al menos en parte, de los cambios que se producen en la estructura de los ganglios linfáticos y en la función del timo, lo que a su vez limita una reconstitución adecuada del repertorio de linfocitos T CD4+^{238,239}; y; 5) finalmente, la presencia de estímulos externos que inducen activación del sistema inmunitario, como infecciones oportunistas o inmunizaciones, conduce a un aumento de la replicación viral *in vivo*, lo que resulta no solamente en un incremento de la carga viral en la circulación sistémica, tejidos linfoides y otros órganos, sino que incrementa también la posibilidad de que ocurran cambios en el genotipo y fenotipo del virus⁸⁵.

1.3.2. Mecanismos de evasión del VIH-1 a la respuesta inmunitaria

Una de las cuestiones más discutidas en relación con la patogenia de la infección por el VIH-1, es la relacionada con la incapacidad del organismo para contener la replicación viral, a pesar de desarrollar una respuesta inmunitaria humoral y celular potente tras la infección, y que inevitablemente conduce a un estado de inmunodeficiencia profunda o SIDA. Aunque, como se

detalla a continuación, se han propuesto varias explicaciones para este fenómeno, la más documentada es la del escape viral a través de mutaciones en diferentes epítomos del virus²⁰⁸.

1.3.2.1. Variabilidad genética

El VIH-1 dispone de un mecanismo de evasión al sistema inmune común a otros virus ARN, relacionado con su elevado índice de variabilidad. Éste se debe a la elevada tasa de error de la TI (una sustitución por 10^3 - 10^4 nucleótidos y ronda de copia)¹³⁴, a lo que se añade la recombinación genética durante la retrotranscripción, que genera una alta proporción de virus deficitarios, asociada a una elevada diversidad en las proteínas víricas, permitiendo al VIH-1 escapar al control de la respuesta inmunitaria específica.

1.3.2.2. Escape inmunológico a la respuesta de los CTL

El escape del virus a la respuesta CTL constituye uno de los mecanismos de escape inmunológico más documentados, y se ha descrito tanto en la fase de infección aguda^{208,209,240}, como en la de infección crónica^{241,242} por el VIH-1. El escape a la respuesta CTL se debe a mutaciones puntuales en los epítomos de péptidos víricos que interaccionan con las moléculas HLA-I del individuo²⁴³. La mutación de un solo aminoácido en un epítomo del virus en puntos esenciales para su unión a moléculas HLA o para su reconocimiento por el receptor de la célula T (TCR), conlleva un incremento de la posibilidad de escape viral, pérdida de respuesta de los CTL y aumento de la viremia^{134,194}. Además, el escape viral a la respuesta inmunológica puede producirse también por la ocurrencia de mutaciones en regiones flanqueantes que afectan al procesamiento antigénico¹⁹⁴. El escape del VIH-1 a la acción de los CTL también se ha descrito en estudios de transmisión de madre a hijo²⁴⁴ y de inmunización activa y posterior infección en animales²⁴⁵.

Otro mecanismo de escape viral a la acción de los CTL es la disminución de expresión de moléculas HLA-I^{226,246}, relacionado con la proteína viral *nef*, una de las principales proteínas reconocidas por los CTL²⁴⁷.

1.3.2.3. Escape a la acción de los anticuerpos neutralizantes

La estructura de la envoltura del VIH-1 en su forma nativa oculta los dominios de interacción con sus correceptores correspondientes mediante dos fenómenos: exclusión oligomérica (debida a su estructura en forma de trímero) y enmascaramiento entrópico (debido al plegamiento de la proteína)³⁷. Estos epítomos más conservados del virus son reconocidos por los anticuerpos neutralizantes en el momento en que se produce la interacción entre la membrana del VIH-1 y la membrana celular, contexto en el que sin embargo, la eficacia de los anticuerpos es menor debido a su baja accesibilidad¹⁸⁷. Otro mecanismo de escape viral a la acción de los anticuerpos neutralizantes es la mutación de los epítomos de las regiones hipervariables que se encuentran en el dominio externo de la envoltura viral²⁴⁸; el escape viral a estos anticuerpos no siempre requiere la mutación de los epítomos antigénicos, sino que puede producirse por la formación de estructuras denominadas *escudos glicano*, que resultan de la glicosilación de residuos de aminoácidos y la formación de estructuras de hidratos de carbono sobre la gp-120 de la envoltura viral, constituyendo auténticas barreras que impiden el acceso de los anticuerpos neutralizantes a sus epítomos¹⁸⁸.

1.3.2.4. Reservorios virales

La latencia celular (provirus integrado en el genoma de la célula huésped en ausencia de replicación activa) es una característica general de todos los retrovirus²⁴⁹, y uno de los mecanismos de escape inmunológico que impide la erradicación del VIH-1 en individuos en los que el tratamiento ha suprimido la replicación viral⁶². Al infectar a la célula diana de forma latente, el VIH-1 escapa a la vigilancia inmunológica, ya que la célula no expresa productos virales en su membrana²⁵⁰. Los linfocitos T CD4+ de memoria en estado de reposo, junto con los macrófagos, células dendríticas foliculares y células de otros tejidos ("*santuarios*" del organismo) constituyen el *reservorio viral*, que es el principal obstáculo para la erradicación del VIH-1 en individuos sometidos a TAR^{62,251-256}. Por otro lado, los procesos de reactivación-reinfección son muy rápidos⁵⁹, y tienen lugar en los centros germinales de los órganos linfoides secundarios, que constituyen un ambiente idóneo para la infección de los linfocitos T CD4+

circundantes en estado de activación celular²⁵⁷. De acuerdo con estos hallazgos, se ha demostrado que los clones de linfocitos T CD4+ específicos frente al VIH-1 que se encuentran en estado de activación se infectan en una proporción elevada, lo que conduce a una supresión de las respuestas específicas frente al virus⁸². Merece destacar que el compartimiento latente no es estático, ya que continuamente se están infectando nuevas células de manera latente, a través de las cuales se pueden observar los cambios que va experimentando el virus a lo largo de la infección, incluyendo las mutaciones asociadas a resistencia al tratamiento y las variantes de escape inmunitario¹³⁴. Por tanto, el VIH-1 almacena su “historia” en el compartimiento latente, lo que constituye un mecanismo de escape, tanto frente a tratamiento con TAR como frente a futuras vacunas²⁵⁴.

1.3.3. Infección por el VIH-1 y marcadores fenotípicos de activación del sistema inmunitario

Como hemos comentado anteriormente, la activación crónica del sistema inmunitario constituye una de las principales características de la infección por el VIH-1⁸⁵, y uno de los factores críticos implicados en el desarrollo del estado de inmunodeficiencia típico de la enfermedad^{258,259}. Este estado de hiperactivación crónica se manifiesta, entre otras características, a través de la expresión incrementada de marcadores fenotípicos de activación en las células del sistema inmunitario, como CD38 y HLA-DR²⁶⁰⁻²⁶⁵, y del incremento en la producción de citocinas²⁶⁶⁻²⁶⁸.

En 1989, Giorgi y *cols.* describieron un aumento en la expresión del antígeno CD38 en la superficie de los linfocitos T CD8+ en pacientes VIH-1+²⁶⁰. A partir de entonces, diferentes autores han demostrado que la expresión incrementada de CD38 en los linfocitos T CD8+ constituye un marcador de mal pronóstico en pacientes infectados por el VIH-1^{261,262,265}, cuyo poder de predicción es independiente de la carga viral y del número de linfocitos T CD4+ circulantes^{261-263,265}. El inicio del TAR conlleva una reducción importante del número absoluto y relativo de células T CD8+/CD38+ en pacientes VIH-1+²⁶⁹⁻²⁷¹. Además, la persistencia de niveles elevados de linfocitos T CD8+/CD38+ se ha asociado a un fracaso del tratamiento^{272,273},

lo que podría reflejar la posible existencia de replicación viral residual en aquellos pacientes con carga viral indetectable en plasma^{274,275}. Todos estos hallazgos sugieren que la medida de la expresión de CD38 en los linfocitos T CD8+ puede ser de gran utilidad en la monitorización de pacientes VIH-1+ sometidos a TAR.

La expresión aumentada de CD38+ en los linfocitos T CD4+ también se ha descrito como marcador de mal pronóstico en pacientes infectados por el VIH-1^{276,277}; sin embargo, los estudios sobre los cambios que se producen en la expresión de CD38 en células T CD4+ en pacientes sometidos a TAR han generado resultados contradictorios^{128,278,279}.

Además de CD38 y HLA-DR, existen otros marcadores fenotípicos de activación, como CD25 y CD71, cuya expresión incrementada en diferentes subpoblaciones linfoides de pacientes infectados por el VIH-1 se ha asociado a mal pronóstico²⁸⁰⁻²⁸². Sin embargo, mientras que el porcentaje de linfocitos B CD25+ se ha descrito como marcador que predice el riesgo de progresión a SIDA, independientemente del recuento de linfocitos T CD4+²⁸¹, esto no ha podido demostrarse en el caso de la expresión aumentada de HLA-DR y CD71 en linfocitos T CD4+ en pacientes infectados por el VIH-1²⁸². Además, otros fenotipos que también se han descrito como indicadores de progresión de la enfermedad en pacientes VIH-1+, incluyen las subpoblaciones de linfocitos T CD8+/CD28- y CD8+/CD45RO+²⁶². Sin embargo, existen ciertas discrepancias a la hora de considerar el potencial de ambas poblaciones linfoides como marcadores de mal pronóstico en individuos infectados por el VIH-1^{283,284}. Por todo ello, el antígeno CD38 constituye el marcador de activación que más se ha empleado como indicador de mal pronóstico, en estudios destinados a la monitorización de los efectos del TAR en individuos VIH-1+.

2. CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

2.1. RECUERDO HISTÓRICO

Las células dendríticas constituyen una población minoritaria de leucocitos, altamente especializada en la captación y presentación de antígenos a los linfocitos T, desempeñando un

papel fundamental en el inicio y control de las respuestas inmunitarias^{285,286}. Se describieron por primera vez en el año 1868, cuando Paul Langerhans indentificó la presencia de una población celular en la región suprabasal de la epidermis, con características morfológicas muy peculiares, consistentes en la presencia de prolongaciones citoplasmáticas²⁸⁷. Esta población se corresponde con las hoy ampliamente caracterizadas células de Langerhans de la piel. Posteriormente, en 1973 Ralph Steinman y Zanvil Cohn describieron en el bazo del ratón una población de células de apariencia similar a las descritas previamente por Langerhans²⁸⁸, que, al igual que otros leucocitos mononucleares, contenían gran cantidad de orgánulos en su citoplasma, como mitocondrias y endosomas de diferente estructura y densidad, y un núcleo irregular con la heterocromatina organizada a lo largo de la membrana nuclear²⁸⁸. Sin embargo, éstas se diferenciaban de otras células localizadas en tejidos linfoides por la presencia de amplias proyecciones citoplasmáticas o “dendritas” de diferente forma y longitud. Como consecuencia de su morfología característica, esta nueva población celular recibió el nombre de *célula dendrítica*. En los años posteriores, sobre todo en la última década del siglo pasado, se descubrió el extraordinario potencial de las células dendríticas para desencadenar respuestas inmunes primarias²⁸⁹⁻²⁹⁹, siendo consideradas en la actualidad las células más potentes del sistema inmune en la estimulación de linfocitos T vírgenes^{294,300,301}.

2.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS

Todas las poblaciones de células dendríticas descritas hasta la fecha (excepto las llamadas *células dendríticas foliculares*) tienen su origen en la médula ósea²⁹⁰, tejido desde el que migran sus precursores hacia el torrente circulatorio³⁰², para posteriormente distribuirse a lo largo de los diferentes tejidos no linfoides del organismo, dando lugar a las denominadas células dendríticas *intersticiales*^{285,286}. En la actualidad se sabe que las células dendríticas están ampliamente distribuidas por todo el organismo, de manera que están presentes en el tejido conectivo de la mayoría de los órganos sólidos no linfoides, como hígado, corazón, tiroides, páncreas, vejiga, riñón, uréter y piel^{286,303,304}. Las células dendríticas también están presentes en los órganos linfoides primarios^{305,306} y secundarios, siendo su localización primordial en el organismo las áreas ricas en células T de los órganos linfoides secundarios³⁰⁷⁻

³⁰⁹. Característicamente, las células dendríticas expresan niveles elevados de moléculas involucradas en la presentación de antígenos (moléculas HLA de clase I y II)³⁰⁷ y moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86^{309,310}, necesarias para activar de forma óptima a los linfocitos T. Desde el punto de vista funcional, las células dendríticas inmaduras presentes en los tejidos periféricos, a modo de “centinelas” del sistema inmune, detectan la presencia de antígenos extraños gracias a la expresión de un amplio abanico de receptores en su membrana, entre los que se incluyen receptores para fragmentos Fc de las inmunoglobulinas (Ig)³¹¹, receptores de complemento³¹² y otros receptores que reconocen patrones moleculares altamente conservados y comunes a muchos patógenos distintos, de los que merece destacar los receptores de lectina tipo C³¹³ (*C-type lectin R*) –entre los que se encuentran los receptores de manosa^{314,315}, langerina (CD207), BDCA-2 (CD303), DEC-205 (CD205) o DC-SIGN (CD209), entre otros–, los receptores de la familia NOD (del inglés “*nucleotide-binding oligomerization domain*”) y los receptores “carroñeros” (“*scavenger*”), como CD36, LOX-1 y CD91³¹⁶⁻³¹⁸. Tras el reconocimiento del patógeno, éste es internalizado mediante procesos de fagocitosis, pinocitosis y/o endocitosis; a partir de este momento las células dendríticas van a migrar de la periferia a los órganos linfoides secundarios, a la vez que experimentan un proceso de maduración^{319,320}, transformándose en células dendríticas diferenciadas, también llamadas *interdigitantes*, *maduras* o *co-estimuladoras* (Figura 3).

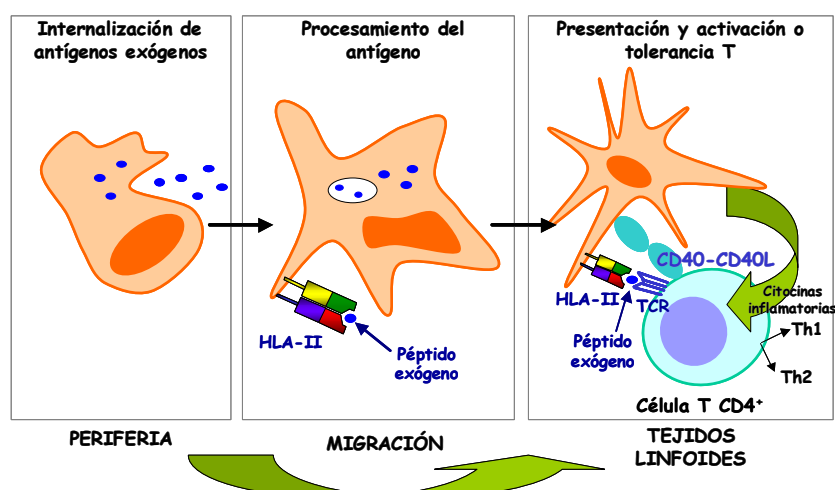


Figura 3. Esquema representativo de los procesos de captación y procesamiento de antígenos, maduración de las células dendríticas y presentación de antígenos a los linfocitos T

Las señales que inducen la maduración de las células dendríticas pueden proceder del propio sistema inmune, –de las que merece destacar las mediadas por el ligando de CD40 (CD40L o CD154) y por citocinas inflamatorias, como TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ –, o bien de productos microbianos y otras moléculas liberadas por tejidos dañados, capaces de estimular distintas variantes de TLR³²¹, presentes en la membrana de las células dendríticas. En la actualidad, sabemos que existe una especialización de los distintos TLR respecto a los ligandos capaces de unirse a ellos. A modo de ejemplo, el receptor TLR2 reconoce sobre todo el peptidoglicano y la lipoproteína de las bacterias Gram positivas; el LPS de las bacterias Gram negativas se une a un complejo integrado, entre otros componentes, por TLR4, y; TLR9 reconoce secuencias no metiladas citidina-guanidina denominadas nucleótidos CpG, muy frecuentes en el ADN de microorganismos. El reconocimiento de estos productos microbianos por parte de los TLR induce la activación de una gran variedad de vías de transducción de señales en las células dendríticas, que, junto con las señales procedentes de la interacción con otros componentes del sistema inmune, ponen en marcha su maduración.

La maduración de las células dendríticas se asocia a una pérdida progresiva de su capacidad para capturar antígenos y a la adquisición gradual de un potencial cada vez mayor para desencadenar respuestas inmunes por parte de los linfocitos T²⁹⁹. Para ello, las células dendríticas van procesando los antígenos capturados, los reducen a péptidos que se ensamblan en moléculas HLA y finalmente, los complejos péptido-HLA son transportados a la superficie celular³²². Además, ello va unido a una serie de cambios fenotípicos, que en gran medida reflejan los cambios funcionales que sufren las células dendríticas a lo largo de su migración y maduración. Así, las células dendríticas activadas o maduras expresan marcadores que las distinguen de las no activadas o inmaduras; de entre éstos, merece destacar: i) CD83, una de las proteínas más características de las células dendríticas maduras, ausente en células inmaduras, y que desempeña un papel fundamental en la inducción de respuestas T inmunogénicas, y; ii) DC-LAMP, una proteína lisosomal, específica también de células dendríticas ya maduras. Además, a medida que maduran las células dendríticas, se produce, entre otros cambios fenotípicos, un aumento significativo de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, y de moléculas HLA^{285,323,324}.

Cuando las células dendríticas alcanzan los órganos linfoides secundarios, están en condiciones óptimas de activación y maduración para presentar los antígenos a los linfocitos T vírgenes y de memoria^{309,310,325,326}, e inducirles a que desencadenen una respuesta inmune antígeno-específica²⁹⁴⁻²⁹⁸. Además, las células dendríticas son capaces de modular la respuesta inmune, tanto a través de señales mediadas por contactos célula-célula, como mediante la secreción de citocinas³²⁷⁻³²⁹. En este sentido, hoy se sabe que las células dendríticas no sólo procesan antígenos extraños o alterados para inducir inmunidad^{308,309}, sino que, en determinadas circunstancias, actúan induciendo tolerancia³³⁰⁻³³². Así, en ausencia de inflamación, las células dendríticas capturan y presentan antígenos del propio individuo a los linfocitos T, pero se mantienen en un estado inactivado o de inmadurez, que resulta en la inhibición de la proliferación e inducción de anergia de células T reactivas, mecanismo responsable en parte de la inducción de autotolerancia inmunológica^{309,331,333,334}.

Debido a la capacidad de las células dendríticas para iniciar o modular la respuesta inmune, en los últimos años se ha incrementado considerablemente el interés en su utilización terapéutica como herramienta potencialmente moduladora de la respuesta inmune en campos tan diversos como en el trasplante de órganos y tejidos, enfermedades autoinmunes, alergia, enfermedades infecciosas, o como células estimuladoras de la inmunidad antitumoral^{286,335-337}. No obstante, pese al interés que suscita su potencial utilidad terapéutica, el avance en nuestro conocimiento acerca de estas células no sólo ha sido relativamente lento, sino también difícil, ya que se trata de una célula poco representada en los distintos órganos y tejidos del organismo, para cuya identificación carecemos de marcadores fenotípicos específicos; además, constituye una población celular heterogénea, en la cual se incluyen distintas subpoblaciones celulares, con características morfológicas, fenotípicas y funcionales diferentes, y en gran medida desconocidas, como también lo es la relación ontogénica y funcional existente entre ellas.

2.3. ORIGEN, PRODUCCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DE SANGRE PERIFÉRICA

2.3.1. Precursores de células dendríticas

La práctica totalidad de las poblaciones de células dendríticas descritas hasta la fecha se origina a partir de un precursor totipotencial o célula *stem* hematopoyética^{338,339}. La excepción la constituiría la célula dendrítica folicular, cuya ontogenia sigue siendo un enigma y para la que algunos autores han sugerido un origen en un precursor extramedular^{340,341}. Dentro de las células dendríticas de origen hematopoyético reconocido, se han podido identificar al menos dos vías de diferenciación distintas desde la célula *stem* hematopoyética hasta la célula dendrítica localizada en tejidos linfoides y no linfoides^{306,310,342}. De acuerdo con ello, actualmente se reconoce la existencia de al menos dos subpoblaciones diferentes de células dendríticas: las células dendríticas *linfoplasmocitoides* (o simplemente *plasmocitoides*) y las células dendríticas *mieloides*^{306,339,343-345}. Además, se ha reconocido la existencia de un tercer subtipo de células dendríticas derivadas de monocitos³⁴⁶.

El modelo tradicional de ontogenia de las células dendríticas, más acorde con la idea clásica de la hematopoyesis, postula la existencia de diferentes líneas hematopoyéticas de diferenciación a células dendríticas funcionalmente distintas. En este sentido, tradicionalmente se ha considerado que las células dendríticas mieloides derivarían de una línea celular originada a partir de un precursor mieloide, mientras que las células dendríticas plasmocitoides se originarían a partir de un progenitor linfoide³⁴⁷. De hecho, una serie de estudios recientes apoyan el origen linfoide de las células dendríticas plasmocitoides y la ontogenia mieloide en el caso de las células dendríticas mieloides; así, entre otras evidencias^{348,349}, en estos estudios se demuestra que el gen que codifica para CIITA (un factor de transcripción esencial para la activación de genes asociados a la presentación de antígenos a través de moléculas HLA de clase II) se activa a partir de su promotor mieloide (pI) en las células dendríticas mieloides, mientras que lo hace a partir del promotor linfoide (pIII) en el caso de las células dendríticas plasmocitoides³⁴⁸. Asimismo, también se ha referido que las células dendríticas plasmocitoides proceden de un precursor linfoide de médula ósea que coexpresa CD34⁺ y CD10⁺ en ausencia de otros marcadores de línea^{339,350,351}, diferente al precursor de las células dendríticas mieloides. Dichos estudios se basan en que las células dendríticas plasmocitoides de SP humana carecen de marcadores mieloides, y a diferencia de las células dendríticas mieloides,

para su diferenciación requieren de la presencia de IL-3 pero no del factor estimulante de colonias granulo-monocíticas (GM-CSF)³⁵¹. En contraposición con esta hipótesis que sugiere que ambas subpoblaciones de células dendríticas tendrían su origen en líneas celulares claramente diferenciadas, más recientemente se ha propuesto la existencia de un ancestro común, con gran plasticidad funcional, a partir del cual se generarían las diferentes subpoblaciones de células dendríticas. Varios trabajos defienden este modelo de ontogenia de las células dendríticas en el ratón³⁵²⁻³⁵⁴. Así, Traver y cols. han demostrado en un modelo murino que un precursor común CD11c⁺ puede diferenciarse tanto a células dendríticas mieloides como plasmocitoides (subpoblaciones CD8 α ⁺ y CD8 α ⁻)³⁵²; a su vez, otros autores han constatado que las células dendríticas mieloides y plasmocitoides murinas pueden generarse a partir de progenitores comunes³⁵³. En esta misma línea, algunos estudios aportan la existencia de interconexiones entre las dos líneas celulares; a modo de ejemplo, se ha sugerido que ambos tipos de células dendríticas se originarían a partir de progenitores mieloides y linfoides que expresan Flt-3^{355,356}, y se ha observado diferenciación de células dendríticas plasmocitoides a células dendríticas mieloides tras procesos de infección vírica³⁵⁷. De forma similar a lo observado en el ratón, un estudio reciente sobre la ontogenia de las células dendríticas humanas aporta evidencias que sugieren que en el hombre las células dendríticas mieloides y plasmocitoides también podrían originarse a partir de un precursor común, con características de célula progenitora mieloides/linfoides³⁵⁸. No obstante, dado que existen evidencias que apoyarían ambos modelos ontogénicos, se requieren estudios adicionales que confirmen si realmente existe una contribución dual de ambas vías de diferenciación, –mieloide y linfoides–, en la generación tanto de células dendríticas mieloides como plasmocitoides^{359,360}.

Merece destacar que la escasa frecuencia con la que se detectan los precursores de células dendríticas, tanto en médula ósea como en SP, unido a la gran heterogeneidad fenotípica y funcional de su equivalente tisular, han dificultado enormemente el estudio de la diferenciación de las células dendríticas en las etapas más tempranas de su ontogenia, limitaciones que siguen aún hoy sin resolverse de manera completamente satisfactoria.

2.3.2. Células dendríticas de sangre periférica

La SP humana ha sido ampliamente utilizada como fuente de material para la realización de estudios sobre células dendríticas, tanto a través del aislamiento y diferenciación de células dendríticas *in vitro* a partir de monocitos³⁶¹, como mediante la purificación de poblaciones poco representadas de células que expresan marcadores de célula dendrítica³⁶². Las células dendríticas de SP humana se identifican por su expresión intensa de moléculas HLA de clase II (p. ej.: HLA-DR), en ausencia de marcadores de línea T (TCR⁻/CD3⁻), B (CD19⁻), NK (CD56⁻) y monocitarios (CD14⁻). Clásicamente se han diferenciado dos poblaciones de células dendríticas en SP humana: una de ellas expresa de manera intensa en su membrana el receptor de la IL-3 (CD123), en ausencia del marcador CD11c (CD11c⁻/CD123⁺⁺⁺), y corresponde a las células dendríticas *plasmocitoides*; la otra población expresa en su membrana CD11c y el marcador mielomonocítico CD33 (CD11c⁺⁺/CD123⁺/CD33⁺⁺⁺), y se corresponde con las células dendríticas *mieloides*³⁶³. Hasta hace poco tiempo, se consideraba que las células dendríticas mieloides circulantes estaban constituidas fundamentalmente por precursores de células dendríticas; en la actualidad, y gracias al reciente descubrimiento de nuevos marcadores específicos, es sabido que dentro de las células dendríticas mieloides coexisten al menos dos poblaciones, que expresan de manera específica los marcadores BDCA-1 (CD1c) y BDCA-3 (CD141), respectivamente³⁶⁴, con la posible existencia de una tercera población de células que expresan el antígeno CD16^{365,366}. Estas observaciones implican que la población de células dendríticas de origen mieloides es más compleja de lo que en principio se pensaba, y sugiere que no todas las poblaciones de células dendríticas comparten la misma ontogenia y propiedades migratorias; por ejemplo, las células dendríticas de SP que expresan en su membrana los marcadores BDCA-1 y BDCA-3 tienen un perfil transcripcional más parecido al de las células dendríticas presentes en los órganos linfoides secundarios que a otras poblaciones de células dendríticas de SP³⁶⁷, lo que sugiere que dichas poblaciones podrían ser precursores de células dendríticas tisulares o proceder de estas células. Por lo tanto, al menos tres explicaciones no mutuamente excluyentes contribuirían a aclarar el hecho de que existan en SP distintas poblaciones de células dendríticas fenotípicamente diferentes: a) las células dendríticas de SP que expresan en su membrana

CD11c podrían constituir los precursores de células dendríticas más inmediatos generados en la médula ósea, y que a su vez darían lugar a las células dendríticas de los tejidos periféricos y de los órganos linfoides secundarios³⁶⁸; b) las células dendríticas terminalmente diferenciadas presentes en los tejidos periféricos podrían recircular a través de la sangre, y; c) los precursores de células dendríticas de SP podrían diferenciarse a células fenotípicamente diferentes sin la necesidad de abandonar el torrente circulatorio³⁶⁸.

2.3.2.1. Células dendríticas mieloides

Como hemos comentado anteriormente en esta introducción, las células dendríticas mieloides de SP tienen su origen en precursores localizados en la médula ósea^{289,290,369-371}, que dan lugar a células que carecen de reordenamiento de los genes de las Ig y del TCR³⁷². A lo largo de su diferenciación mantienen la expresión de CD11c y del antígeno asociado a línea mieloides CD33, en ausencia de positividad para mieloperoxidasa y esterasas³⁷³. Los precursores de células dendríticas mieloides generados en la médula ósea van a migrar a través del torrente sanguíneo hacia los órganos y tejidos no linfoides –células dendríticas intersticiales-, incluida la piel, donde se les conoce como células dendríticas dérmicas y células de Langerhans. Los únicos tejidos a los que no tendrían acceso las células dendríticas mieloides serían la córnea, el testículo y el sistema nervioso central³⁷⁴. Ante un estímulo inflamatorio, daño tisular o la presencia de un patógeno, estas células, tras captar antígenos del entorno, abandonarán los tejidos no linfoides para dirigirse a los órganos linfoides secundarios, que alcanzan a través de los vasos linfáticos aferentes o, menos frecuentemente, por vía sanguínea³⁷⁵⁻³⁷⁷.

De acuerdo a sus características fenotípicas, las células dendríticas mieloides de SP se han identificado tradicionalmente por su expresión fuerte de HLA-DR en ausencia de marcadores específicos de línea (CD3⁻, CD14⁻, CD19⁻, CD56⁻), diferenciándose de la población de células dendríticas plasmocitoides por expresar en su membrana el antígeno CD11c^{306,363}, los marcadores asociados a línea mieloides CD33 y CD13, las moléculas de adhesión CD29 y CD58, moléculas co-estimuladoras como CD2, CD5 y CD86, y receptores para IgG (como CD32), entre otros marcadores fenotípicos^{378,379}.

Además de esta población específica de células dendríticas mieloides, en los últimos años se ha identificado y caracterizado otra subpoblación de células dendríticas en SP humana^{365,379-381} que, de manera similar a las células dendríticas mieloides tradicionales, también tendrían su origen en un progenitor mieloides³⁸². Esta tercera subpoblación celular se caracteriza por ser el único subtipo de células dendríticas que expresa el receptor de baja afinidad para el fragmento Fc de la IgG (Fc γ -R tipo III o CD16) y que presenta positividad débil para CD14. Además, esta subpoblación de células HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil} expresa DC-SIGN (CD209), -una lectina de tipo C presente exclusivamente en células dendríticas¹⁵²-, y tiene una elevada capacidad para estimular linfocitos T vírgenes en cultivos alogénicos mixtos³⁸³. A pesar de todos estos hallazgos que sugieren que se trata de una subpoblación de células dendríticas, en la actualidad se sigue cuestionando el verdadero origen y naturaleza de esta población celular -célula de línea monocítica *versus* célula dendrítica-, ya que algunos autores la consideran como una subpoblación minoritaria de monocitos con algunas peculiaridades funcionales³⁸⁴⁻³⁸⁶. Sin embargo, se ha demostrado que estas células presentan características diferenciales claras con respecto a los monocitos de SP. Así, desde el punto de vista morfológico, las células HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil} presentan un aspecto claramente diferente al de los monocitos CD14⁺⁺ de SP, especialmente a nivel ultraestructural, al presentar proyecciones citoplasmáticas evidentes y vesículas de pinocitosis en ausencia de gránulos densos azurófilos en el citoplasma³⁷⁹. Desde el punto de vista citoquímico, también se han encontrado diferencias significativas entre las células HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil} y los monocitos. Así, las enzimas α -naftil acetato esterasa, mieloperoxidasa y lisozima, presentes desde los estadios más tempranos de la diferenciación a línea monocítica y que no se pierden a lo largo de la maduración del monocito a macrófago, son indetectables en el citoplasma de las células HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil}³⁷⁹. Además, fenotípicamente ambas poblaciones celulares se pueden distinguir claramente por mostrar un patrón diferente de expresión de CD64, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, proteínas reguladoras del sistema del complemento, receptores de proteínas del complemento, moléculas de adhesión, receptores de quimiocinas y moléculas co-estimuladoras^{379,381} (Tabla 1).

Tabla 1. Análisis comparativo de las características fenotípicas y funcionales de los monocitos y de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas (CDs) de sangre periférica humana

	Células dendríticas (CDs) mieloides				CDs plasmocitoides
	Monocitos	CD16 ⁺	CD1c ⁺	BDCA-3 ⁺	
CD14	+++	-/+	-	-	-
CD4	+	+	+	+	++
HLA-DR	+	++	+++	+++	++
CD11a	+	++	++	++	+
CD29	+	+	+	+	-/+
CD54	-/+	+	+	+	+
CD58	-	-	-	-	-
CD62L	-/+	-	+	+	+
CD2	-	-	++	-	+
CD5	-	-	-	+	-
CD40	+	+	+	++	-/+
CD86	+	++	+	+	-
CD16	-	++	-	-	-
CD32	++	+	+	-	-
CD64	-/+	-	-	-	-
CD11b	+++	-	-	-	-
CD11c	+++	+++	+++	++	-
CD35	+	-	-	-	-
CD55	++	+	+	+	+
CD13	++	++	++	++	-
CD33	+++	+	+++	+++	-
cMPO	+++	-	-	-	-
cLisozima	+	-	-	-	-
CD22	-	-	+	+	+
CD45RA	-	+	-	-	+
CD45RO	+	-	+	+	-
CD116	-/+	-	-/+	-/+	-
CD123	+	+	+	-	+++
CD38	++	-	+++	+++	++
CLA	+	-	++	++	+
CD205	++	+	++	+++	++

CyMPO: mieloperoxidasa citoplasmática; CyLisozima: lisozima citoplasmática; CLA: antígeno linfocitario cutáneo.

Finalmente, ambas subpoblaciones celulares –monocitos y células dendríticas HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil}–, difieren en sus características funcionales, al menos en lo que respecta a su capacidad de producción de citocinas inflamatorias y en su actividad fagocítica y bactericida mediada por receptores de anticuerpos y proteínas del complemento^{379,387}.

Actualmente se conoce que los monocitos –“células CD14⁺”– de SP constituyen una fuente importante de células dendríticas al cultivarlos *in vitro* en presencia de GM-CSF e IL-

4^{361,388}. Estos hallazgos apoyarían la hipótesis de que las células HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil} podrían constituir una subpoblación de células dendríticas derivadas de monocitos y que, de la misma manera que con una combinación adecuada de citocinas los monocitos se diferencian *in vitro* a células dendríticas, *in vivo* exista una subpoblación de células dendríticas que proceda de monocitos. Una explicación alternativa es que al identificar los monocitos de SP por su expresión de CD14 se incluyan dentro de los mismos a las células dendríticas HLA-DR⁺/CD16⁺, –ya que también expresan CD14 de forma débil– y que tras cultivo en las condiciones idóneas, se expandan las denominadas células dendríticas derivadas de monocitos.

A modo de resumen, podríamos decir que a la luz de los conocimientos actuales, la población de células dendríticas mieloides de SP (CD11c⁺) está constituida por un grupo celular heterogéneo, en el que se distinguen al menos dos subpoblaciones diferentes, cada una de las cuales se puede identificar por la expresión en su membrana de distintas moléculas: CD16 (células dendríticas CD16⁺) y CD1c (BDCA-1; células dendríticas CD1c⁺). Esta última subpoblación a su vez incluye células dendríticas CD141⁻ y CD141⁺ (células dendríticas BDCA-3⁺)³⁶⁵⁻³⁶⁷. De estas poblaciones celulares, la más representada es la de células dendríticas CD16⁺, constituyendo un 65-75% del total de las células dendríticas mieloides de SP humana, seguida de la población CD1c⁺/CD141⁻ (10-20%). En contraposición, la menos frecuente es la subpoblación BDCA-3⁺, que representa entre 3-5% del total de las células dendríticas mieloides³⁶⁶. Las tres subpoblaciones expresan, además de CD11c, los marcadores CD86 y CD13³⁶⁶. Con respecto a las diferencias encontradas desde el punto de vista fenotípico, las células CD16⁺ constituyen la única subpoblación de células dendríticas que carece de CLA (antígeno linfocitario cutáneo, del inglés, *Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*) –un receptor de tipo “homing” ampliamente expresado en células dendríticas^{342,389}–, tienen una expresión de débil a moderada de CD14 y CD33 y muestran positividad para HLA-DR menos intensa que el resto de las células dendríticas de SP³⁶⁵; además, éstas células expresan niveles más elevados de la molécula coestimuladora CD86, respecto a las otras poblaciones de células dendríticas. En relación con las células CD1c⁺, MacDonald y cols.³⁶⁵ las describen como la subpoblación de células dendríticas mieloides de SP que expresa niveles más elevados de CD11c; además, carece de CD14 en su membrana y expresa de manera intensa

CD33 y HLA-DR³⁶⁵. Finalmente, la subpoblación minoritaria de células dendríticas mieloides BDCA-3⁺ es también CD14⁻, y muestra positividad intensa para CD33⁺⁺⁺; en comparación con las células dendríticas mieloides CD1c⁺, estas células tienen menor expresión de HLA-DR y CD86, y niveles más elevados de CD40 y CD205³⁶⁵. Desde el punto de vista funcional, Piccioli y cols. han demostrado la capacidad de las células dendríticas mieloides CD1c⁺ y CD16⁺ de producir diferentes tipos de citocinas inflamatorias tras estimulación específica de receptores TLR presentes en su membrana³⁶⁶. Entre los hallazgos más importantes descritos por estos autores, destacan las diferencias entre ambas subpoblaciones en cuanto a su capacidad para producir CXCL-8 (IL-8) y TNF- α ; así, las células dendríticas mieloides CD1c⁺ parecen estar altamente especializadas en la producción de IL-8 -citocina que desempeña un papel crucial en la respuesta inmune innata, ya que constituye el principal estímulo para atraer granulocitos, monocitos y linfocitos³⁹⁰-, secretando cantidades significativamente superiores de dicha citocina respecto a la producida por las células dendríticas mieloides CD16⁺; por el contrario, las células CD16⁺ tienen una mayor capacidad para secretar TNF- α . Basándose en estos hallazgos, Piccioli y cols. sugieren que las células dendríticas mieloides CD16⁺ desempeñarían preferentemente una actividad pro-inflamatoria, mientras que las células CD1c⁺ podrían tener un papel más relacionado con la inducción de quimiotaxis³⁶⁶. El hecho de que se haya descrito la existencia de un incremento significativo de los niveles circulantes de células dendríticas CD16⁺ en numerosas situaciones patológicas que tienen en común el hecho de estar asociadas a respuestas inflamatorias³⁸⁶, corroboraría la afirmación de Piccioli y cols. respecto al papel funcional pro-inflamatorio de esta subpoblación celular.

2.3.2.2. Células dendríticas plasmocitoides

Las células dendríticas plasmocitoides constituyen una población celular escasamente representada, aunque de gran importancia dentro del sistema hematopoyético³⁹¹. Desde el punto de vista funcional, las células dendríticas plasmocitoides han sido ampliamente caracterizadas por el papel que desempeñan en la respuesta inmune innata y adaptativa, siendo consideradas como un nexo fundamental entre ambos tipos de inmunidad^{162,392,393}; es más, en la actualidad se conoce que las células dendríticas plasmocitoides constituyen la

población celular más potente del sistema inmune a la hora de producir IFN de tipo I (IFN- α) en respuesta a infecciones víricas y bacterianas¹⁶¹⁻¹⁶³.

Inicialmente, las células dendríticas plasmocitoides se identificaron en muestras procedentes de ganglios linfáticos neoplásicos, en estrecha asociación con las vénulas de endotelio alto (HEV)³⁹⁴. Por este motivo y por la similitud morfológica con los linfoplasmocitos, estas células se denominaron *linfoplasmocitoides* o *plasmocitoides*³⁹⁵. Posteriormente se observó que estas células expresaban en su membrana la molécula CD4 de forma más intensa que las otras poblaciones de células dendríticas, en ausencia de otros marcadores de línea T, como el TCR y CD3, y de marcadores de línea B (CD19, CD21)^{373,396,397}. Además, no expresan CD11c ni marcadores característicos de línea mieloide como CD13, CD14 o CD33, lo que contribuye a diferenciarlas de las células dendríticas mieloides convencionales CD11c⁺³⁵¹. Gracias a su capacidad para producir grandes cantidades de IFN- α en respuesta a infecciones víricas y bacterianas³⁹⁸, se consideró que las células dendríticas plasmocitoides eran las células “productoras naturales de IFN de tipo I de SP”^{163,399,400}. El conocimiento detallado de estas células permitió finalmente demostrar, de forma fehaciente, que pertenecen a la familia de las células dendríticas⁴⁰¹. A diferencia de las células dendríticas mieloides, que son heterogéneas e incluyen diferentes poblaciones celulares de acuerdo a lo mencionado en el apartado anterior de esta introducción, hasta la fecha no se han identificado distintas subpoblaciones celulares dentro de las células dendríticas plasmocitoides de SP humana.

Respecto a la función que desempeñan estas células en la respuesta inmune, parece claro que es diferente a la de las células dendríticas mieloides. En este sentido, actúan como células dendríticas especializadas en la respuesta inmune anti-viral, debido a su capacidad de secreción de niveles elevados de IFN- α desde las fases más precoces de una infección vírica^{179,393,402}. Por otra parte, hace unos años se consideró que las células dendríticas plasmocitoides eran la población de células dendríticas candidata a generar tolerancia inmune periférica^{309,403}. Así, se vio que las células dendríticas plasmocitoides murinas CD8 α ⁺ podían inducir apoptosis sobre linfocitos T CD4⁺, como consecuencia de la interacción entre el receptor de muerte celular Fas y su ligando FasL³³⁴, expresado en la membrana de las células dendríticas CD8 α ⁺. Además, a diferencia de las células dendríticas CD8 α ⁻, las células CD8 α ⁺

eran capaces de estimular la proliferación de células T sin inducir secreción de citocinas^{403,404}. Sin embargo, en la actualidad no está claro el papel que desempeñan las células dendríticas plasmocitoides en la inducción de tolerancia. Esto es debido a la dificultad que seguimos teniendo para distinguir entre una célula dendrítica plasmocitoide inductora de tolerancia, de una célula dendrítica estimuladora, al no poder fundamentarse esta diferenciación en conceptos tan simples como el estadio de maduración de la célula, y el amplio abanico de efectos indirectos que inducen sobre otros elementos reguladores de la respuesta inmune. En este sentido, se sabe que las células dendríticas plasmocitoides que han madurado tras estimulación con IL-3 y CD40L (CD154) inducen una respuesta colaboradora de tipo Th₂ sobre células T CD4+, además de estimular células T reguladoras^{405,406}. Por otro lado, se ha demostrado que, además de las células dendríticas plasmocitoides, las células dendríticas mieloides son capaces también de inducir tolerancia inmune^{407,408}. Por todo ello, en la actualidad se cree que la respuesta desencadenada por las células dendríticas (inmunogénica vs tolerante) dependería, más que del tipo concreto de célula dendrítica que participa en ella, de su estado de maduración, entre otros factores no bien conocidos⁴⁰⁷⁻⁴⁰⁹. Finalmente, merece destacar que algunos autores han constatado que la inyección de células dendríticas plasmocitoides inmaduras *in vivo* no induce tolerancia antígeno-específica, como en principio podría esperarse⁴¹⁰. Por lo tanto, se requieren estudios adicionales dirigidos a la identificación de aquellos factores relacionados con la inducción de tolerancia por parte de las células dendríticas en general, y por la subpoblación de células dendríticas plasmocitoides en particular, que permitan contribuir a aclarar el papel real de estas células en la inducción de tolerancia inmune.

3. LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 (VIH-1)

3.1. CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO EN LA INFECCIÓN POR EL VIH-1: ASPECTOS GENERALES

Las células presentadoras de antígeno (CPA) desempeñan una función crucial en la generación de respuestas inmunitarias eficientes frente a infecciones víricas⁴¹¹⁻⁴¹⁴. Dentro de las CPA, los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas, representan los principales compartimientos celulares implicados en la función presentadora en la infección por el VIH-1 *in vivo*, desempeñando un papel clave en diversos aspectos relacionados con la patogenia de la enfermedad⁴¹⁵⁻⁴¹⁹. La infección por el VIH-1 puede desencadenar una alteración funcional de las CPA, lo que podría contribuir al defecto de la capacidad de respuesta de los linfocitos T CD4+ al virus, que se observa en las etapas más tempranas de la infección, cuando el número absoluto de células T CD4+ aún no se encuentra significativamente reducido⁴²⁰.

Los primeros trabajos acerca del papel que desempeñan las CPA en la patogenia de la infección por el VIH-1 se han centrado en el estudio de los monocitos y los macrófagos. En ellos ya se reconocía la importancia de estas células, al actuar como dianas del virus en el organismo y constituir un importante reservorio viral, especialmente en el caso de los macrófagos⁴²¹⁻⁴²³. Aunque el número absoluto de macrófagos infectados es relativamente bajo en comparación con el de linfocitos T CD4+, y en términos generales, no se encuentra sustancialmente reducido en la infección por el VIH-1, la peculiar dinámica de replicación viral en estas células, su larga supervivencia tras la infección y su capacidad de transmitir el virus a las células T CD4+ adyacentes, hacen que los macrófagos tengan una importante contribución a la patogenia de la infección por el VIH-1⁴²⁴. Además, a lo largo de los últimos años se ha demostrado la existencia de alteraciones significativas en su función, incluyendo anomalías en su capacidad fagocítica y de destrucción de patógenos intracelulares^{425,426}. Finalmente, la capacidad de presentación antigénica de los macrófagos se encuentra gravemente dañada en individuos VIH-1+⁴²⁷, lo que podría estar relacionado con su expresión alterada de moléculas

HLA de clase II, proteínas de adhesión y moléculas co-estimuladoras⁴²⁸⁻⁴³¹, así como con la existencia de anomalías en su capacidad de producción de citocinas y quimiocinas⁴³¹⁻⁴³³.

Más recientemente, se ha intensificado el estudio del papel que desempeña otro tipo de CPA, las células dendríticas, en la patogenia de la infección por el VIH-1. Como se ha comentado con anterioridad, su amplia localización en superficies mucosas, asociada a la expresión de los principales receptores y correceptores del VIH-1, hace que las células dendríticas sean consideradas por algunos autores como la primera célula diana del virus en las fases más tempranas de la infección^{44,45}. Todo esto, unido al papel crucial que desempeñan estas células en el inicio y regulación de la respuesta inmune, apoya la hipótesis de que esta población celular tenga una gran relevancia en la patogenia de la infección por el VIH-1, tanto en el establecimiento inicial y propagación de la infección, como en el desarrollo de la respuesta inmune frente a la misma^{412,434,435}.

En los siguientes apartados de esta introducción se analizan en detalle los conocimientos actuales de mayor relevancia en relación con el papel de las células dendríticas en la infección por el VIH-1, y que incluyen su depleción, infección y alteraciones funcionales.

3.1.1. Depleción de células dendríticas de sangre periférica en la infección por el VIH-1

A pesar de las discrepancias recogidas en la literatura⁴³⁶⁻⁴³⁸, numerosos estudios han demostrado la existencia de una profunda depleción de las dos subpoblaciones principales de células dendríticas de SP –células dendríticas mieloides y plasmocitoides– en pacientes infectados por el VIH-1^{169,439-441}, o al menos de una de ellas –células dendríticas mieloides⁴⁴² o plasmocitoides^{168,170}–. La disminución del número absoluto de células dendríticas circulantes se ha observado tanto en la fase aguda⁴⁴⁰ como en la fase crónica de la infección^{168,170,442}. Además de las células dendríticas del compartimento de SP, en la infección por el VIH-1 también se encuentran significativamente reducidas otras subpoblaciones de células dendríticas, como es el caso de las células de Langerhans de la piel^{443,444}.

Teniendo en cuenta el papel fundamental que desempeñan las células dendríticas en la defensa frente a infecciones víricas –constituyen las células más potentes del sistema inmunitario en la estimulación de los linfocitos T vírgenes–, su depleción en pacientes VIH-1+ podría contribuir tanto a la alteración funcional de los linfocitos T CD4+ específicos del virus, como al déficit en la producción de IFN de tipo I que se observa en estos individuos⁴⁴⁰. De hecho, diferentes estudios han demostrado la existencia de una relación directa entre la disminución del número absoluto de células dendríticas mieloides y plasmocitoides circulantes y el de los linfocitos T CD4+^{169,171,441}, o el aumento de la carga viral en el plasma de pacientes VIH-1+ en diferentes estadios de la infección^{168,169}. De manera similar, otros trabajos han demostrado que el número absoluto de células dendríticas plasmocitoides se correlaciona positivamente con los niveles de IFN de tipo I producido en respuesta a la infección y de forma negativa con el riesgo de aparición de infecciones oportunistas, sugiriendo por tanto, que las células dendríticas plasmocitoides podrían desempeñar un papel relevante en el control de la replicación viral en individuos infectados por el VIH-1¹⁶⁸. Merece destacar que los autores de este último estudio han observado un aumento significativo del número absoluto de células dendríticas plasmocitoides en pacientes VIH-1+ NPLP respecto al de individuos sanos, lo que vendría a corroborar la importancia de esta subpoblación celular en el control de la infección¹⁶⁸. A pesar de apoyar la existencia de una profunda depleción de células dendríticas plasmocitoides en pacientes VIH-1+, otros trabajos sugieren que las células dendríticas mieloides podrían tener un papel más relevante en el control de la infección, al no poder demostrar la existencia de una correlación significativa entre los niveles de células dendríticas plasmocitoides y la carga viral plasmática o el número de absoluto de linfocitos T CD4+¹⁷⁰.

En la actualidad siguen sin conocerse con precisión las causas que provocan la depleción de células dendríticas circulantes en pacientes VIH-1+. Algunos autores sugieren que ésta podría tener su origen, tanto a nivel periférico como central⁴⁴⁰. En la periferia, la pérdida de células dendríticas de la circulación podría deberse a un aumento de su capacidad de migración hacia los ganglios linfáticos; de acuerdo con esta posibilidad, en diferentes estudios se demuestra la existencia de un incremento de los niveles de células dendríticas en general en ganglios linfáticos⁴⁴⁵, o de poblaciones específicas de células dendríticas en particular, (p.

ej.: células dendríticas plasmocitoides¹⁶³, y células CD1a⁺ –que pueden proceder tanto de células de Langerhans como de precursores de células dendríticas de SP³⁸⁹– en amígdalas⁴⁴⁶). Sin embargo, el incremento de la migración de células dendríticas de SP hacia los ganglios linfáticos no puede ser la única causa de su depleción de la circulación, ya que los pacientes en estadio de SIDA presentan además una reducción significativa del nivel de células dendríticas en los ganglios linfáticos⁴⁴⁵. Una posible explicación alternativa, aunque no excluyente, es que la depleción de células dendríticas de SP podría deberse a su destrucción en la periferia -ya sea como consecuencia directa de su infección y posterior destrucción por el propio VIH-1⁴⁴⁷ o por los CTL⁴⁴⁸- o bien a una disminución de su supervivencia, a su vez relacionada con las alteraciones funcionales de los linfocitos T CD4+ colaboradores que se observan en los individuos infectados por el VIH-1²². Por otra parte, la depleción de células dendríticas de SP en pacientes VIH-1+ podría además tener su origen a nivel central, como consecuencia de una producción disminuida de precursores de células dendríticas en la médula ósea, como se ha demostrado en el caso de los precursores de células T en macacos infectados por el SIV^{449,450}.

En cualquier caso, la depleción de células dendríticas de SP en pacientes VIH-1+ constituye un aspecto especialmente importante a tener en cuenta en la patogenia de la infección, sobre todo al asociarse a alteraciones funcionales, que, como veremos más adelante, pueden producir una grave alteración de su capacidad para estimular tanto linfocitos T vírgenes como linfocitos T específicos del VIH-1.

3.1.2. Infección de células dendríticas de sangre periférica por el VIH-1

El estudio de la capacidad del VIH-1 para infectar células dendríticas *in vivo* ha sido objeto de una intensa actividad investigadora en los últimos años. La profunda depleción de células dendríticas de SP que se observa en pacientes VIH-1+ podría ser una consecuencia de su posible infección y posterior destrucción por el VIH-1 o los CTL, como se ha comentado en el apartado anterior de esta sección. De acuerdo con esta hipótesis que sugiere que las células dendríticas podrían constituir una diana del VIH-1, estas células expresan en su membrana el receptor CD4 y los principales correceptores del VIH-1, CXCR4 y CCR5^{38-41,173,176}, haciéndolas por tanto susceptibles a la infección por el virus^{39,42,43}. Es más, debido a su amplia localización

en superficies mucosas, las células dendríticas son consideradas por algunos autores como la primera célula diana del VIH-1 en las fases más tempranas de la infección^{44,45}.

No obstante lo anterior, en la actualidad sigue existiendo una importante controversia en relación con la infección de células dendríticas por el VIH-1. Así, aunque algunos autores han demostrado la existencia de replicación viral en las células de Langerhans de la piel^{451,452}, la detección de replicación viral en las células dendríticas ha sido difícil de monitorizar en el curso natural de la infección por el VIH-1. Por otra parte, si bien se ha descrito la presencia de partículas virales atrapadas en la superficie de las células dendríticas foliculares de los ganglios linfáticos^{453,454}, la posible infección de las células dendríticas interdigitantes por el VIH-1 ha sido difícil de monitorizar *in situ*. Por todo ello, la mayoría de los estudios referidos en la literatura se han centrado en el estudio de la replicación viral en células dendríticas *in vitro*. Pese a la existencia de algunos trabajos que defienden que el VIH-1 no infecta a las células dendríticas⁴³⁶⁻⁴³⁸, la mayoría de los autores que han centrado sus investigaciones en este tema han demostrado, tanto *in vitro*^{39,42,46,173,176,455} como *ex vivo*^{47,175}, que el VIH-1 es capaz de infectar a las células dendríticas. Así, la mayoría de estos estudios han demostrado que las células dendríticas de SP –tanto las células dendríticas aisladas de SP como las obtenidas a partir de monocitos y diferenciadas *in vitro* a células dendríticas– son susceptibles de ser infectadas por los dos tipos principales de cepas del VIH-1: cepas macrofagotrópicas (R5 o “*no productoras de sincitio*”) y cepas linfotrópicas (X4 o “*productoras de sincitio*”), mediante la entrada del virus a través de los correceptores CCR5 y CXCR4, respectivamente^{46,173,176,455}. Por el contrario, otros autores defienden la infección selectiva de células dendríticas inmaduras de SP por cepas macrofagotrópicas del VIH-1, no siendo éstas susceptibles a la infección por cepas linfotrópicas⁴². A pesar de las discrepancias referidas³⁹, la gran mayoría de estos estudios coincide en que, además de ser susceptibles a la infección por el VIH-1, en las células dendríticas infectadas existiría replicación activa del virus^{42,46,173,176,455}, al demostrarse la existencia de ADN proviral en las células infectadas y de la proteína viral *p24* en el sobrenadante del cultivo de dichas células, así como a través de la evaluación de la actividad antirretroviral.

Trabajos más recientes corroboran los hallazgos de los estudios realizados *in vitro*, confirmando *ex vivo* que las células dendríticas de SP son susceptibles a la infección por el VIH-1^{47,175}, reflejo de lo que ocurriría *in vivo* en estos pacientes. Así, Donaghy y cols.⁴⁷ han demostrado que células dendríticas –mieloides y plasmocitoides– purificadas a partir de muestras de SP de individuos VIH-1+ están infectadas por el virus, al detectarse mediante técnicas de biología molecular –reacción en cadena de la polimerasa (PCR)– ADN proviral en su interior. En este sentido, estos autores han detectado incluso la presencia de ADN proviral integrado en el genoma de las células dendríticas mieloides en 4 de 14 casos analizados⁴⁷. Más recientemente, Smed-Sørensen y cols.¹⁷⁵ han demostrado también que las células dendríticas mieloides y plasmocitoides aisladas *ex vivo* a partir de muestras de SP de individuos VIH-1+, son susceptibles de ser infectadas por cepas macrofagotrópicas o linfotrópicas del virus, al detectar, mediante citometría de flujo, la presencia de la proteína *p24* del VIH-1 a nivel intracelular. Cabe destacar que estos autores han encontrado notables diferencias entre las dos subpoblaciones de células dendríticas, en cuanto a su susceptibilidad a la infección, siendo esta última superior en el caso de las células dendríticas mieloides¹⁷⁵. Además, la infección de las células dendríticas mieloides es más eficiente a partir de cepas que utilizan CCR5 como correceptor –cepas macrofagotrópicas– que a partir de las cepas linfotrópicas que emplean CXCR4 como vía de entrada en la célula, no existiendo tales diferencias entre los dos tipos de cepas en el caso de las células dendríticas plasmocitoides. Estos autores sugieren además, que las diferencias observadas en la susceptibilidad a la infección entre ambas subpoblaciones, podrían implicar una capacidad de transmisión del VIH-1 a los linfocitos T CD4⁺ a partir de las células dendríticas, distinta para cada una de ellas¹⁷⁵.

3.1.3. Alteraciones funcionales de las células dendríticas de sangre periférica en la infección por el VIH-1

Al igual que existen discrepancias entre diferentes autores en cuanto a la existencia de alteraciones en el número de células dendríticas circulantes en pacientes infectados por el VIH-1, y su posible infección por el virus, el estudio de la capacidad funcional de las células

dendríticas de SP en individuos VIH-1+ también ha generado resultados contradictorios. Así, Donaghy y cols.⁴⁷ han demostrado que la capacidad de las células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP de pacientes VIH-1+ para estimular linfocitos T alogénicos en cultivo, se encuentra seriamente alterada. Más recientemente, se ha observado una importante reducción de la capacidad de las células dendríticas infectadas por el VIH-1 para generar respuestas antígeno-específicas a partir de CTL⁴⁵⁶. Por el contrario, otros autores defienden que la capacidad de las células dendríticas de pacientes VIH-1+ tanto para estimular linfocitos T alogénicos⁴⁵⁵, como para inducir respuestas antígeno-específicas a partir de CTL⁴³⁸, no se encontraría alterada.

Otras alteraciones funcionales descritas en células dendríticas de pacientes VIH-1+ incluyen: i) una expresión alterada de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD86 y CD83, tras su estimulación con LPS o CD40L⁴⁵⁶, junto a ii) alteraciones importantes en la producción de citocinas inflamatorias, lo que contribuiría a explicar las anomalías de la inmunidad celular observadas en estos pacientes²⁶⁶⁻²⁶⁸. Pese a ello, estos hallazgos no han podido ser confirmados por otros autores^{175,455,457}. A modo de ejemplo, los estudios disponibles hasta la fecha en cuanto a la capacidad de las células dendríticas infectadas por el VIH-1 para producir citocinas inflamatorias, han proporcionado resultados discrepantes e incluso contradictorios. Mientras que algunos autores afirman que las células dendríticas diferenciadas a partir de monocitos (MDDC), infectadas *in vitro* por el VIH-1 y estimuladas con LPS o con CD40L, producen cantidades significativamente incrementadas de IL-12p70, IL-1 β y TNF- α ^{150,458}, otros no han detectado anomalías significativas en la producción de citocinas inflamatorias por células dendríticas infectadas por el VIH-1 o tras su exposición a la proteína viral Nef^{175,455,457}. Incluso, en algunos estudios se ha demostrado que en las MDDC expuestas a la gp-120 del VIH-1 tienen una capacidad de producción de citocinas notablemente reducida^{459,460}, mientras que en las MDDC infectadas *in vitro* por el VIH-1 se observa una inhibición selectiva de la producción de IL-12 asociada a un patrón normal de secreción de otras citocinas inflamatorias, como IL-6 e IL-1 β ⁴⁵⁶.

Aunque el estudio de la capacidad de las células dendríticas para estimular la proliferación de los linfocitos T o para producir citocinas inflamatorias en respuesta a un

estímulo es un buen indicador de su funcionalidad, en el caso de las células dendríticas plasmocitoides es importante evaluar además su capacidad para producir IFN- α en respuesta a la infección por el VIH-1⁴⁰⁰, al tratarse de la población celular más potente a la hora de producir esta citocina en respuesta a infecciones víricas y bacterianas¹⁶¹⁻¹⁶³. Como se ha descrito previamente, el número absoluto de células dendríticas plasmocitoides circulantes se encuentra significativamente reducido en pacientes VIH-1+¹⁶⁸⁻¹⁷², lo que conduce a una notable reducción de la producción de IFN- α a partir de dichas células, asociada a su vez con niveles de ARN viral más elevados y signos de un mayor grado de progresión de la enfermedad en estos pacientes^{168,171,172}. Pese a todo ello, algunos autores afirman que la capacidad de las células dendríticas plasmocitoides para producir IFN- α en respuesta a la infección por el VIH-1 no se encuentra alterada, independientemente de que dichas células se encuentren infectadas o no¹⁷⁵.

3.2. PAPEL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA PATOGENIA DE LA INFECCIÓN POR EL VIH-1

A lo largo de los apartados anteriores de esta sección de la introducción hemos revisado diversos aspectos relacionados con la depleción, infección y alteración de la capacidad funcional de las células dendríticas de SP en la infección por el VIH-1. No obstante, en la actualidad se considera que el papel más relevante de las células dendríticas en la patogenia de la infección por el VIH-1 se debe a su capacidad para migrar a los ganglios linfáticos, donde transmiten el virus que han capturado en las superficies mucosas a los linfocitos T CD4+, como se ha demostrado ampliamente a lo largo de estos últimos años^{39,42,176,461,462}. Una de las principales moléculas implicadas en este proceso es un receptor de lectina tipo C llamado DC-SIGN (CD209), que se expresa exclusivamente en células dendríticas y desempeña una doble función: 1) por un lado, actúa como receptor de moléculas de adhesión, facilitando la migración de las células dendríticas a través del endotelio mediante su unión al ligando vascular ICAM-2⁴⁶³, y favoreciendo la comunicación entre las células dendríticas y los linfocitos T CD4+ mediante su unión a ICAM-3⁴⁶⁴, y; 2) por otra parte, actúa

como receptor para moléculas extrañas, uniéndose a la gp-120 del VIH-1 y transportando el virus en la membrana de las células dendríticas, desde las superficies mucosas de entrada del mismo hacia los ganglios linfáticos²³⁻²⁵. Además de estas proteínas, en la actualidad se conoce que existen otras moléculas de adhesión implicadas en la transmisión del VIH-1 a los linfocitos T. Así, se ha observado una correlación directa entre los niveles de expresión de ICAM-1 (CD54) en células dendríticas y su capacidad de transmisión de la infección⁴⁶¹. Aunque se ha demostrado que las células dendríticas tienen la capacidad de transmitir el virus a los linfocitos T sin resultar infectadas^{23,465}, estudios más recientes han sugerido que la transmisión de la infección *in vivo* podría producirse preferentemente a partir de células dendríticas infectadas⁴⁶².

A nivel tisular, DC-SIGN se expresa en diferentes tipos de células dendríticas, incluidas las MDDC, las células dendríticas de tejidos periféricos –entre los que se encuentran las superficies mucosas de entrada del VIH-1 en el organismo– y las células dendríticas de los ganglios linfáticos⁴⁶⁴. Aunque las células de Langerhans de la piel no expresan DC-SIGN⁴⁶⁴, estas células expresan langerina, otro receptor de lectina tipo C que, al igual que DC-SIGN, presenta capacidad de unión al VIH-1, lo que sugiere que este tipo de receptores podrían estar implicados también en la patogenia de la infección por el VIH-1⁴⁶⁶. En SP, la única población de células dendríticas que expresa DC-SIGN en su membrana y tiene capacidad para infectar a los linfocitos T CD4+ es la que expresa los marcadores CD14, CD16 y CD33 –por tanto de origen mieloide–, sugiriendo que dicha subpoblación podría estar involucrada en la transmisión de la infección a través del torrente circulatorio¹⁵². Más recientemente, los estudios de Groot y cols.⁴⁶⁷ han supuesto un giro importante en el concepto del papel que desempeñan las células dendríticas en la transmisión de la infección por el VIH-1 a los linfocitos T. Estos autores han demostrado que las dos subpoblaciones principales de células dendríticas –mieloide y plasmocitoide– podrían desempeñar papeles opuestos en la patogenia de la infección. Así, las células dendríticas mieloides, cuya capacidad de transmisión de la infección depende de su estadio madurativo, favorecerían la propagación de la infección mediante la captura del VIH-1 y su transmisión a las células T CD4+, lo que no se ha podido relacionar con el tipo de factores solubles secretados por estas células, con la capacidad de captación de las partículas virales, o con el nivel de expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 o LFA-1⁴⁶⁷.

Por el contrario, las células dendríticas plasmocitoides inhibirían la replicación del VIH-1 en los linfocitos T mediante la secreción del factor antiviral IFN- α y de una molécula adicional de pequeño tamaño y sensible al calor aún no identificada⁴⁶⁷. Las diferencias observadas entre los estudios de Groot y cols. y aquellos que defienden la implicación de las células dendríticas plasmocitoides en la transmisión del VIH-1 a los linfocitos T⁴⁶⁸, podrían deberse a que en el primer caso las células dendríticas se han mantenido en cultivo junto con los linfocitos T; por lo tanto, aquellos factores antivirales secretados por las células dendríticas plasmocitoides como el IFN- α se han mantenido presentes a lo largo de todos los experimentos, mientras que esto no ocurre en otros estudios^{176,468}. En cualquier caso, estos resultados sugieren que las células dendríticas mieloides y plasmocitoides podrían estar implicadas de diferente manera en la patogenia de la infección por el VIH-1, aspecto a tener en cuenta a la hora de emplearlas como herramienta terapéutica en el desarrollo de vacunas frente al SIDA.

3.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL (TAR) SOBRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES VIH-1+

La administración de TAR a pacientes infectados por el VIH-1 ha constituido un éxito a la hora de inhibir la replicación vírica y reducir la carga viral de estos individuos, permitiendo así la reconstitución parcial de los niveles de linfocitos T CD4+ y la disminución de los índices de mortalidad y morbilidad asociados a la enfermedad⁵⁻⁸. Sin embargo, las estrategias terapéuticas empleadas hasta la fecha no han sido capaces de erradicar el virus del organismo, ni de restaurar completamente la capacidad funcional del sistema inmune de los individuos infectados por el VIH-1⁹⁻¹¹.

Diferentes investigadores han centrado sus estudios en el conocimiento de los efectos del TAR sobre la recuperación del número de células dendríticas circulantes en pacientes infectados por el VIH-1, aunque los resultados obtenidos son contradictorios. Tras la administración de TAR, Pacanowski y cols.⁴⁴⁰ han observado una recuperación parcial del número absoluto de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP, junto a una

recuperación del número de células T CD4+ y una reducción de la carga viral en pacientes VIH-1+ en la fase aguda de la infección; sin embargo, tras 12 meses de TAR, los niveles de células dendríticas circulantes se mantenían significativamente reducidos respecto a los de individuos sanos. De manera similar, otros autores han descrito un ligero incremento en el número absoluto de ambas subpoblaciones celulares, más pronunciado en el caso de las células dendríticas plasmocitoides, aunque no se conseguía una recuperación total tras el tratamiento^{441,469}. Por el contrario, Zhang y cols.⁴⁷⁰ han observado una recuperación selectiva del número de células dendríticas mieloides hasta alcanzar niveles normales en niños VIH-1+, mientras que el número de células dendríticas plasmocitoides permanecía significativamente reducido tras 12 meses de TAR; en este estudio se demuestra además, la existencia de una correlación directa entre el número de células dendríticas mieloides y la frecuencia de CTL específicos frente al VIH-1⁴⁷⁰. En otros casos no se han encontrado diferencias entre el número absoluto de células dendríticas mieloides de SP de pacientes VIH-1+ y el de individuos sanos, ni antes ni después de la administración de TAR, siendo la recuperación de células dendríticas plasmocitoides incompleta¹⁷⁰. De acuerdo con estos hallazgos, recientemente se ha sugerido que la recuperación del número de células dendríticas plasmocitoides de SP tras TAR, podría utilizarse como marcador de predicción de la aparición de “rebotes” de replicación viral, en aquellos pacientes en los que se lleva a cabo la interrupción del tratamiento¹⁷⁷.

En cuanto al grado de recuperación de la capacidad funcional de las células dendríticas de SP en pacientes VIH-1+ sometidos a TAR, se ha observado una recuperación de la producción de IFN- α por las células dendríticas plasmocitoides –relacionada con los niveles de carga viral y la protección frente a infecciones oportunistas recurrentes– que precedería al restablecimiento de los niveles de linfocitos T CD4+. Por todo ello, se ha sugerido que dicha recuperación podría constituir un marcador de reconstitución inmunológica precoz y más informativo que el recuento de células T CD4+, en la monitorización de pacientes VIH-1+ sometidos a TAR^{171,471}. En este sentido, Kamga y cols. han descrito una recuperación total de la función de las células dendríticas plasmocitoides en términos de producción de IFN- α tras 1 año de TAR⁴⁷². Por el contrario, otros estudios han demostrado que, a pesar de que el TAR induce una recuperación de la capacidad funcional de las células dendríticas mieloides en

cuanto a su capacidad para producir IL-12 tras estimulación, las células dendríticas plasmocitoides continúan siendo deficitarias en la producción de IFN- α tras 12 meses de tratamiento⁴⁷⁰.

En conjunto, estos hallazgos muestran que, a pesar del papel relevante que desempeñan las células dendríticas en la patogenia de la infección por el VIH-1, y de la existencia de importantes anomalías en su número y función, son todavía escasos, y con frecuencia contradictorios, los estudios en los que se han evaluado los efectos del TAR sobre las células dendríticas de pacientes infectados por el VIH-1, siendo especialmente importante demostrar si las alteraciones causadas por el virus son irreversibles o bien pueden llegar a restaurarse tras la administración del tratamiento.

II. Hipótesis de trabajo y objetivos

El descenso inexorable del número de linfocitos T CD4+, junto a la existencia de alteraciones en su capacidad funcional y a la activación global inespecífica del sistema inmune, constituyen las principales características de la infección por el VIH-1, que contribuyen a la elevada incidencia de infecciones oportunistas en individuos infectados por este virus, no sometidos a tratamiento antirretroviral. Además de los linfocitos T CD4+, en la patogenia de la infección por el VIH-1 se han implicado otras poblaciones del sistema inmunitario, como es el caso de las CPA, entre las que se encuentran los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas. Las células dendríticas constituyen una población heterogénea de leucocitos que desempeña un papel central en el control de la respuesta inmunitaria, ya que son las células más potentes en la estimulación de linfocitos T vírgenes. Debido precisamente a la importancia de las células dendríticas en la regulación de la inmunidad celular, en los últimos años ha cobrado gran interés el estudio del papel que desempeñan estas células en la patogenia de la infección por el VIH-1, habiéndose descrito alteraciones significativas en su distribución numérica, fenotipo y función^{47,150,168,170,440,442,456,458,460}. A pesar de ello, en la actualidad sigue sin estar claro el efecto que provoca la infección por el VIH-1 sobre las células dendríticas de SP, existiendo numerosas discrepancias en los resultados obtenidos en los últimos años en este campo, requiriéndose de estudios adicionales que ayuden a comprender mejor el efecto del virus sobre estas células, y su implicación en la patogenia de la infección por el VIH-1. Un análisis más detallado de estas discrepancias muestra que éstas probablemente se deben, al menos en parte, a la dificultad que entraña el estudio de las células dendríticas, ya que se trata de un grupo de células muy poco representado en los diferentes órganos y tejidos en los que se encuentra (p. ej: órganos linfoides secundarios, incluido el tejido linfoide de la mucosa intestinal). Por otra parte, en la actualidad es de sobra conocida la heterogeneidad que caracteriza a las células dendríticas, habiéndose demostrado la existencia de diferentes subpoblaciones de células dendríticas *in vivo*, que pueden tener distinto comportamiento. Además, las diferencias en los resultados obtenidos a partir de estos estudios podrían depender también del estado de madurez y/o del grado de pureza de las subpoblaciones de células dendríticas analizadas, o del nivel de infección celular alcanzado tras la exposición de

las células dendríticas al VIH-1. Debido a las dificultades referidas, en la mayoría de los trabajos centrados en el estudio de las células dendríticas en la infección por el VIH-1 se han empleado MDDC, obtenidas tras cultivar *in vitro* monocitos de SP en presencia de GM-CSF e IL-4. Las MDDC son similares a las células dendríticas mieloides de SP en cuanto a la expresión de marcadores de membrana y a su respuesta frente a diversos estímulos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que ambas poblaciones celulares no se comportan de idéntica manera desde el punto de vista fenotípico y funcional, diferenciándose entre ellas por sus propiedades migratorias, y su capacidad para producir citocinas inflamatorias –como la IL-12–, así como por su función estimuladora de la producción de citocinas por los linfocitos T, entre otras características. Por otra parte, en la actualidad no se dispone de un modelo *in vitro* idóneo para el estudio de las células dendríticas plasmocitoides. Por todo ello, se hace imprescindible completar la información disponible sobre las células dendríticas en la infección por el VIH-1 con estudios *ex vivo*, que puedan constituir un mejor reflejo de lo que ocurriría *in vivo*, en pacientes infectados por el VIH-1.

Asimismo, las diferencias en las cohortes de pacientes VIH-1+ analizadas también pueden condicionar los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados *ex vivo*, ya que se trata de grupos de individuos complejos y heterogéneos; mientras algunos mantienen un sistema inmunitario casi normal, otros desarrollan una inmunodeficiencia grave. A esta heterogeneidad contribuyen también las frecuentes infecciones crónicas por otros virus que padecen los individuos VIH-1+, como la coinfección por los virus de la hepatitis C (VHC), muy común en los pacientes infectados por el VIH-1 por vía parenteral. De hecho, a pesar de ciertas discrepancias, diferentes trabajos que han demostrado la existencia de alteraciones graves en la maduración y la capacidad funcional de las células dendríticas en pacientes VHC+, sugieren que las alteraciones funcionales de las CPA podrían desempeñar un importante papel en la persistencia de la infección por el VHC. Pese a estas observaciones, en la actualidad sigue sin estar del todo claro cual es el efecto de la co-infección por el VHC en individuos infectados por el VIH-1, aspecto que requiere ser estudiado en mayor profundidad.

Otra variable adicional que contribuye a explicar la heterogeneidad de los resultados obtenidos viene dada por los tratamientos antirretrovirales, que al tener efecto sobre la

replicación del VIH-1, van a afectar a la capacidad funcional y el grado de activación de las diferentes poblaciones de células del sistema inmunitario. Sin embargo, a pesar de la implicación evidente de las células dendríticas en la patogenia de la infección por el VIH-1, así como de la existencia de importantes anomalías en su número y función –las cuales podrían ser responsables, al menos en parte, de la función alterada de los linfocitos T característica de estos pacientes–, la información disponible en la actualidad acerca del efecto del TAR sobre las células dendríticas de pacientes VIH-1+ es escasa e incluso contradictoria; por todo ello, se hace necesario también profundizar en el conocimiento de los efectos del TAR sobre las células dendríticas de individuos VIH-1+, con el objeto de comprobar si las anomalías causadas por el VIH-1 son irreversibles, o bien pueden llegar a restaurarse tras la administración de TAR.

La activación crónica del sistema inmunitario constituye otra de las características principales de la infección por el VIH-1, siendo uno de los factores críticos que conducen al estado de inmunodeficiencia típica de la enfermedad. El análisis de la expresión del marcador de activación CD38 en linfocitos T CD8+ de SP ha sido ampliamente utilizado para evaluar la capacidad del TAR para reducir la activación excesiva del sistema inmunitario en pacientes infectados por el VIH-1. Más recientemente, el estudio de la expresión de dicho antígeno se ha extendido a otras subpoblaciones linfoides, como es el caso de los linfocitos T CD4+. Así, la expresión incrementada de CD38 en células T CD4+ también se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes infectados por el VIH-1. Sin embargo, los estudios acerca de los cambios producidos en la expresión de CD38 en células T CD4+ de pacientes sometidos a TAR han generado resultados contradictorios, por lo que requieren ser estudiados en mayor profundidad. A su vez, a diferencia de lo que ocurre con las poblaciones linfoides, el análisis del estado de activación de los monocitos de SP de pacientes infectados por el VIH-1 ha recibido menor atención. De esta manera, aunque se ha demostrado que la expresión incrementada de HLA-DR en monocitos de SP se relaciona con el grado de depleción de linfocitos T CD4+ en pacientes VIH-1+, no se conoce prácticamente nada acerca de la expresión de CD38 en monocitos de SP de estos individuos, ni del efecto que provoca el TAR sobre la misma. Por lo tanto, se hace necesario profundizar en el estudio de la expresión del marcador de activación CD38 no solo en poblaciones linfoides, sino en otras poblaciones celulares que se ven también

implicadas en la activación crónica del sistema inmunitario en la infección por el VIH-1 –p.ej. los monocitos de SP–, con el objeto de evaluar si el TAR es capaz de revertir el estado de activación excesiva del sistema inmunitario, y determinar si las posibles modificaciones inducidas sobre la expresión de CD38 se relacionan con la respuesta al tratamiento.

Ante estos antecedentes, cabe plantearse la **hipótesis** de que en los pacientes infectados por el VIH-1 se produce una activación generalizada del sistema inmune que conlleva, entre otras consecuencias:

- Un aumento de la expresión de marcadores de activación y de la producción de citocinas por parte de subpoblaciones de linfocitos T, monocitos y células dendríticas de SP;
- Tal activación resulta en una alteración de la capacidad funcional de las diferentes subpoblaciones celulares activadas, que se manifiesta mediante una respuesta deficitaria al ser estimuladas para producir las citocinas que les son propias, y;
- El inicio del TAR, al modificar la cinética vírica y controlar la activación inmune, revierte, al menos en parte, esas alteraciones.

De acuerdo con esta hipótesis y los antecedentes antes referidos, en el presente trabajo de tesis doctoral nos hemos propuesto como **objetivo general**, profundizar en el conocimiento del papel que desempeñan diferentes poblaciones celulares del sistema inmunitario en la patogenia de la infección por el VIH-1, a través del análisis *ex vivo* y detallado de la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de diferentes subpoblaciones de células linfoides y de CPA de pacientes infectados por el VIH-1+, así como el efecto que el TAR induce sobre dichos parámetros, tanto a corto como a largo plazo. Para ello, hemos planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar la distribución numérica, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas y la capacidad para producir citocinas inflamatorias de forma espontánea y en

ausencia de estimulación, de monocitos y células dendríticas de SP de una cohorte de pacientes VIH-1+ asintomáticos, que no habían recibido TAR.

2. Evaluar el efecto del TAR sobre la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de los monocitos y diferentes subpoblaciones de células dendríticas de SP de pacientes VIH-1+ asintomáticos no tratados previamente con TAR, e identificar posibles factores implicados en la recuperación funcional de estas subpoblaciones celulares tras el tratamiento.

3. Analizar, en términos cuantitativos, la expresión del marcador de activación CD38 en linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+ y monocitos de SP de pacientes VIH-1+ y determinar la posible relación existente entre los cambios inducidos por el TAR sobre la cantidad de moléculas CD38 expresadas en estas subpoblaciones celulares de SP y la respuesta al tratamiento.

III. Material, Métodos y Resultados

En la presente sección del trabajo se describen los individuos incluidos en el estudio, así como los materiales y métodos empleados para su análisis y los resultados obtenidos de acuerdo a cada objetivo planteado, mediante la inclusión de los artículos originales publicados como fruto del trabajo realizado. Cada uno de los artículos referidos está precedido por un breve resumen en castellano, con el fin de facilitar una revisión rápida de la información contenida en el mismo. Además, en el anexo 1 de esta memoria, se recogen de forma específica y más detallada los criterios de inclusión y exclusión empleados en el reclutamiento de los distintos grupos de individuos estudiados.

Los artículos referidos son los siguientes:

- En relación con el primer objetivo, centrado en el análisis de la distribución numérica y la caracterización fenotípica y funcional de monocitos y células dendríticas de SP de pacientes infectados por el VIH-1:

Different Subsets of Peripheral Blood Dendritic Cells Show Distinct Phenotypic and Functional Abnormalities in HIV-1 Infection.

M. Almeida, M. Cordero, J. Almeida, A. Orfao.
AIDS. 2005; 19:261-271.

- En relación con el segundo objetivo, encaminado a evaluar el efecto del TAR sobre la distribución numérica, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas y la capacidad funcional de diferentes poblaciones de células del sistema inmunitario en individuos VIH-1+, e identificar posibles factores que influyan en la recuperación funcional de los monocitos y células dendríticas de SP, tras la administración del tratamiento:

Persistent Abnormalities in Peripheral Blood Dendritic Cells and Monocytes from HIV-1-Positive Patients After 1 Year of Antiretroviral Therapy.

M. Almeida, M. Cordero, J. Almeida, A. Orfao.

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2006; 41:405-415.

Abnormal Cytokine Production by Circulating Monocytes and Dendritic Cells of Myeloid Origin in ART-Treated HIV-1⁺ Patients Relates to CD4⁺ T-Cell Recovery and HCV Co-Infection.

M. Almeida, M. Cordero, J. Almeida, A. Orfao.

Current HIV Research. 2007; 5:325-336.

- En relación con el tercer objetivo, enfocado a investigar la posible asociación entre la respuesta al tratamiento y la expresión de CD38 en poblaciones linfocitarias y monocitos de SP de individuos VIH-1⁺:

Relationship Between CD38 Expression on Peripheral Blood T-Cells and Monocytes, and Response to Antiretroviral Therapy: A One-Year Longitudinal Study of a Cohort of Chronically Infected ART-Naive HIV-1⁺ Patients.

M. Almeida, M. Cordero, J. Almeida, A. Orfao.

Cytometry (Clinical Cytometry). 2007; 72B:22-33.

Las diferentes subpoblaciones de células dendríticas de sangre periférica de pacientes infectados por el VIH-1 presentan distintas alteraciones fenotípicas y funcionales.

INTRODUCCIÓN: Las células dendríticas constituyen una población heterogénea de leucocitos que desempeña un papel crucial en el control de la respuesta inmune, ya que constituye el subgrupo de células presentadoras de antígeno más potente a la hora de estimular linfocitos T vírgenes. Debido a su amplia localización en superficies mucosas, las células dendríticas podrían constituir la primera población celular que entra en contacto con el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), ya que además de expresar la molécula CD4, las células dendríticas expresan otros correceptores del virus, como CXCR4 y CCR5, lo que las hace en principio susceptibles a la infección. De hecho, numerosos estudios han demostrado que las células dendríticas pueden ser infectadas por el VIH-1 tanto *in vitro* como *in vivo*, lo que contribuiría a explicar las alteraciones que se han descrito recientemente en su número y función, en pacientes VIH-1⁺. En contraposición con dichos estudios, otros autores afirman que las células dendríticas no resultan infectadas tras contactar con el VIH-1, ni presentan alteraciones significativas en su número y/o capacidad funcional. En definitiva, en la actualidad existe controversia acerca del papel que pueden desempeñar las células dendríticas en la ontogenia y desarrollo de la infección por el VIH-1, y se requiere de estudios adicionales que permitan profundizar en el conocimiento del posible papel de las células dendríticas en la patogenia de la enfermedad.

OBJETIVO: El objetivo principal del presente trabajo se centró en analizar la distribución numérica, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas y la capacidad para producir citocinas inflamatorias de los monocitos y células dendríticas de sangre periférica (SP) de pacientes “progresores” infectados por el VIH-1 (VIH-1⁺P).

MATERIAL Y MÉTODOS: Para ello, se han analizado un total de 30 pacientes VIH-1⁺P asintomáticos que no habían recibido previamente tratamiento antirretroviral (TAR). Además, se incluyeron en el estudio tres grupos control constituidos por: 1) 10 adultos sanos (AS); 2) 7 pacientes VIH-1⁻ infectados por el virus de la hepatitis C (VHC⁺/VIH-1⁻) y; 3) 5 pacientes VIH-1⁺

en los que no se había observado progresión a largo plazo (NPLP). La identificación y recuento de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos se realizó a partir de muestras de SP lisada de hematíes mediante técnica de inmunofluorescencia directa evaluada por citometría de flujo, marcando las células con anticuerpos monoclonales (AcMo) en combinaciones cuádruples y utilizando microesferas fluorescentes a una concentración conocida, para lograr una mayor precisión en el recuento celular (método de plataforma única). Para el análisis del patrón de expresión de receptores de quimiocinas empleamos la misma metodología que para la identificación de las distintas subpoblaciones celulares estudiadas, utilizando tres anticuerpos para la identificación de las diferentes subpoblaciones de monocitos y células dendríticas, y un cuarto AcMo (en cada combinación) para determinar la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR1, CXCR2, CXCR4 y CCR5. Finalmente, el análisis de la producción de citocinas inflamatorias se realizó sobre células individuales, tras su incubación durante 6 horas a 37°C en presencia de brefeldina A y en ausencia de estimulantes exógenos, con el fin de analizar *ex vivo*, y mediante citometría de flujo, la producción espontánea de citocinas a nivel citoplasmático, en cada una de las subpoblaciones celulares referidas anteriormente.

RESULTADOS: En términos generales, observamos una reducción significativa del número absoluto de células dendríticas mieloides CD33⁺⁺⁺ (en adelante “*CD mieloides*”) y plasmocitoides de SP en pacientes VIH-1⁺P respecto a los tres grupos control [mediana (rango): 4 (2-6) *CD mieloides*/μl en sujetos VIH-1⁺P vs 8 (6-12), 15 (12-17), y 12 (6-20) *CD mieloides*/μl en AS, VHC⁺/VIH-1⁻ y VIH-1⁺NPLP, respectivamente, y; 3 (2-6) *CD plasmocitoides*/μl en individuos VIH-1⁺P vs 8 (6-12), 9 (7-11), y 8 (4-10) *CD plasmocitoides*/μl en AS, VHC⁺/VIH-1⁻ y VIH-1⁺NPLP, respectivamente (p<0.05)]. Sin embargo, el número absoluto de CD HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil} (en adelante “*CD CD16+*”) y de monocitos encontrado en los individuos VIH-1⁺P era similar al observado en AS, y estaba significativamente incrementado en individuos VHC⁺/VIH-1⁻ y en sujetos VIH-1⁺NPLP (p<0.05).

En cuanto al patrón de expresión de receptores de quimiocinas, comprobamos que el porcentaje de monocitos CXCR1⁺ y CXCR2⁺ estaba ligeramente reducido, aunque no de manera significativa, entre los pacientes VIH-1⁺P; por el contrario, el porcentaje de CD

mieloides CXCR2⁺ se encontraba significativamente disminuido en los pacientes VIH-1⁺P respecto a los demás grupos de individuos ($p < 0.05$). Con respecto a la expresión de los dos correceptores principales del VIH-1, observamos que la proporción de CD mieloides y de CD plasmocitoides que expresaba CXCR4 estaba reducida considerablemente en todos los grupos de pacientes respecto a AS ($p < 0.05$), mientras que el porcentaje de CD plasmocitoides CCR5⁺ estaba significativamente disminuido en individuos VIH-1⁺P con respecto tanto a AS como a pacientes VHC⁺/VIH-1⁻ ($p < 0.05$).

Desde el punto de vista funcional, los monocitos y CD CD16⁺ de SP de pacientes VIH-1⁺P y VHC⁺/VIH-1⁻ producían de manera espontánea cantidades significativas de IL-6 y TNF- α ($p < 0.05$), siendo el porcentaje de células productoras ligeramente inferior en los individuos VHC⁺/VIH-1⁻. Asimismo, las CD plasmocitoides de pacientes VIH-1⁺P y VHC⁺/VIH-1⁻ producían espontáneamente IL-12, asociándose ésta o no a la producción de IL-6, respectivamente; no obstante, las diferencias encontradas respecto a los demás grupos de individuos no eran estadísticamente significativas. Merece destacar que al clasificar a los individuos VIH-1⁺P en función del número absoluto de linfocitos T CD4⁺ presentes en SP (<200 vs >200 células CD4⁺/ μ l de SP), observamos que la producción espontánea de citocinas inflamatorias por las CD plasmocitoides se restringía al grupo menos inmunodeprimido (>200 células CD4⁺/ μ l de SP). Las CD de AS y pacientes VIH-1⁺NPLP no mostraron producción de citocinas inflamatorias *ex vivo*, en ausencia de estímulo ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES: En conjunto, nuestros resultados muestran la existencia de alteraciones significativas tanto en la distribución como en la expresión de receptores de quimiocinas en las CD mieloides y plasmocitoides de SP de pacientes VIH-1⁺P; además, los monocitos y las CD de estos pacientes producen citocinas inflamatorias de manera espontánea, lo que sugiere la existencia de una activación del sistema inmune *in vivo* en pacientes VIH-1⁺P. Estas alteraciones encontradas en pacientes VIH-1⁺P son diferentes a las observadas en individuos VIH-1⁺NPLP y VHC⁺/VIH-1⁻, lo que puede contribuir a explicar la patogenia de la infección por el VIH-1.

Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection

María Almeida^{a,b}, Miguel Cordero^{b,c}, Julia Almeida^{a,b} and Alberto Orfao^{a,b}

Objectives: To analyse the distribution, expression of chemokine receptors and *ex vivo* production of inflammatory cytokines by peripheral blood (PB) monocytes and DC in HIV-1+ individuals.

Design: Dendritic cells (DC) play an important role in the establishment and dissemination of HIV infection. DC interaction with HIV depends on expression of HIV receptors and co-receptors. Accumulating evidence supports the notion that DC functionality is impaired in HIV-1+ patients.

Methods: PB samples from 30 naive-treated HIV-1+ progressors were studied. Additionally, 10 adult healthy volunteers (AHV), seven Hepatitis C virus positive (HCV+)/HIV-1- patients and five long-term non-progressor HIV-1+ patients (HIV-1+LTNP) were included as controls. Flow cytometry immunophenotyping was used for the identification, enumeration and characterization of monocytes and DC.

Results: PB myeloid DC (mDC) and plasmacytoid DC (pDC) were significantly decreased in HIV-1+ progressors, while unaltered in HIV-1+LTNP. The expression of CXCR2 and CXCR4 and of CXCR4 and CCR5 were severely altered on PB mDC and pDC from HIV-1+ progressors, respectively. By contrast, both the expression of the chemokine receptors analysed and the numbers of CD16+ DC in HIV-1+ progressors were not different from AHV, while altered in HCV+/HIV-1- and HIV-1+LTNP. Furthermore, PB monocytes and DC from HIV-1+ progressors spontaneously produced inflammatory cytokines, in contrast with AHV.

Conclusions: These results support the existence of a selective interaction between HIV-1 and both mDC and pDC, associated with HCV co-infection-independent spontaneous production of inflammatory cytokines, reflecting the occurrence of *in vivo* activation of the immune system, which might further contribute to the impaired DC functionality.

© 2005 Lippincott Williams & Wilkins

AIDS 2005, **19**:261–271

Keywords: Dendritic cells, HIV-1 infection, phenotype, cytokine production, chemokine receptors, long-term non-progressors (LTNP)

Introduction

Progressive decline in the number and function of CD4+ T lymphocytes leads to recurrent opportunistic infections in HIV+ patients. Other cell subsets have also been linked

to the pathogenesis of the disease [1–4], an increasing number of reports focussing on the pathogenic relevance of dendritic cells (DC) [5–8]. Two major subsets of DC have been well characterized in peripheral blood (PB): myeloid (mDC) and plasmacytoid DC (pDC). Our group

From the ^aServicio General de Citometría and Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, the ^bDepartamento de Medicina, Universidad de Salamanca, the ^cSección de Medicina Interna-Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain.

Correspondence to A. Orfao, Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer, Avda. Universidad de Coimbra s/n, 37007 Salamanca, Spain.

E-mail: orfao@usal.es

Received: 16 June 2004; revised: 2 November 2004; accepted: 25 November 2004.

and others [9–12], have characterized a third subset of CD4+ DC in PB, identified by the M-DC8 monoclonal antibody (MAb) [11], which displays a high expression of FcγRIII (CD16) – a marker absent in the other DC subsets – and reactivity for DC-SIGN (CD209) – C-type lectin exclusively expressed by DC [13] – together with an important stimulatory capacity for naive T cells in mixed allogeneic cell cultures [14]. Interactions between HIV and DC play an important role in the initial establishment and spread of the infection, and on the development of antiviral immunity [15,16]. Fully differentiated DC able to capture antigens are present in the skin and mucosa, and therefore could be among the first cells contacting with HIV [17]. DC are able to capture and disseminate the virus through a process mediated by DC-SIGN [18,19] and express surface molecules such as CD4, CXCR4 and CCR5, known co-receptors required for HIV entry, further suggesting that they could be infected. Several studies have shown a marked depletion in mDC and pDC in HIV+ patients [20–23], which could be due to their infection by HIV, in addition to other immunological mechanisms [24,25]. Several studies have shown that monocyte-derived DC or purified blood DC can be productively infected *in vitro* both with macrophage-tropic (M-tropic) and T-cell line-tropic (T-tropic) HIV-1 strains through CCR5- and CXCR4-mediated entries, respectively [26–31]. Despite discrepant results [27], many groups have shown that the virus can replicate in DC [28–32]. Independently, the most important pathogenic role for DC that have captured HIV-1 is their ability to migrate to lymph nodes, where they can interact with CD4+ T lymphocytes, and productively infect them, as extensively demonstrated [27–29,33,34]. Recent data show that the ability of blood isolated DC to induce T-lymphocyte proliferative responses is severely impaired in HIV-1+ patients [32]. In contrast, other studies even imply that monocyte-derived DC do not become infected by HIV-1 [35,36], and act as competent antigen presenting cells [36]. Definitively, the role of antigen presenting cells and particularly DC in HIV infection remains controversial.

The aim of the present study was to compare the numerical distribution, the pattern of expression of chemokine receptors and the ability of PB monocytes and

DC to produce inflammatory cytokines in a cohort of HIV-1+ progressors, with that in a group of uninfected healthy volunteers. In parallel, we studied a group of patients infected with hepatitis C virus (HCV), not co-infected with HIV-1 (HCV+/HIV-1–), and a group of HIV-1+ clinical long-term non-progressors (HIV-1+LTNP), characterized by stable CD4 cell counts and low viral load levels, who remain healthy despite 10 or more years of HIV-1 infection [37,38].

Materials and methods

Patients, controls and samples

PB samples from 30 asymptomatic antiretroviral-naive HIV-1+ progressors – 21 males and nine females – were studied. The mean age was 41 ± 10 years (range, 26–64 years; median, 39 years). Fifteen cases (50%) were co-infected by HCV. Patients with concomitant acute diseases related to their immunodeficiency were excluded from the study.

Three control groups were also studied: (i) five non-treated clinical LTNP, infected with HIV-1 for more than 10 years, with stable CD4 cell counts $>300 \times 10^6/l$ and low, stable serum viral load; (ii) seven HCV+/HIV-1– patients; and (iii) 10 adult healthy volunteers (AHV). HIV-1+LTNP (three males and two females) had a mean age of 39 ± 7 years (range, 28–46 years; median, 40 years); the mean age of the HCV+/HIV-1– patients (six males and one female) was of 43 ± 8 years (range, 35–56 years; median, 40 years); AHV (eight males and two females) were aged 38 ± 11 years (range, 24–62 years; median, 36 years). Table 1 shows additional information on HIV-1+ progressors and HIV-1+LTNP patients.

Samples were collected in EDTA and heparin anti-coagulant according to the guidelines of the local ethical committee (University Hospital of Salamanca), after informed consent.

Enumeration of PB monocytes and DC

EDTA-anticoagulated PB samples were stained with four-colour combinations of MAb, using direct

Table 1. Clinical characteristics of the HIV-1+ progressors and HIV-1+ long-term non-progressor (HIV-1+LTNP) patients.

	HIV-1 load (copies/ml)	CD4 T-cell count ($\times 10^6$ cells/l)	Years followed with HIV-1 infection	Patients coinfected with HCV (%)	Clinical status (% of patients)
HIV-1+ progressors	106 945 \pm 158 803 (360–820 000)	158 \pm 170 (4–881)	4.3 \pm 5 (0–15)	50%	A2 (7.4%) A3 (18.5%) B2 (11.1%) B3 (25.9%) C3 (37.1%)
HIV-1+LTNP	7316 \pm 12750(50–30 000)	589 \pm 182 (338–851)	11 \pm 3 (7–14)	50%	A1 (20%) A2 (80%)

Viral load, CD4+ T-cell counts and years followed with HIV-1 infection are expressed as mean \pm SD (range).

immunofluorescence and a stain-and-lyse, non-wash single-platform flow cytometry technique, as previously described in detail [39]. The specificity and source of the MAb reagents used were as follows: Dendritic Cell Exclusion (DCE) Kit (which includes fluorescein isothiocyanate-conjugated CD3, CD14, CD19 and CD56 reagents; Cytognos, Salamanca, Spain), CD16-phycoerythrin (PE; clone 3G8, Immunotech, Marseille, France), anti-HLA-DR-peridin chlorophyll protein (PerCP; clone L243, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, California, USA) and CD33-allophycocyanine (APC; clone LeuM9, Becton Dickinson Biosciences). Immediately prior to data acquisition, Perfect-COUNT beads (Cytognos) were added following the manufacturer's recommendations, and the cell/bead mixture was acquired in two consecutive steps in a FACSCalibur flow cytometer using the CellQUEST software (Becton Dickinson Biosciences). In the first step, 10^5 events/test corresponding to the whole PB cellularity and the counting beads were collected. Secondly, information on a minimum of 3×10^5 HLA-DR+ cells was collected. For data analysis, the Paint-A-Gate PRO software (Becton Dickinson Biosciences) was used.

Immunophenotypic characterization of monocytes and DC

EDTA-anticoagulated PB samples were stained as described above with the DCE Kit, anti-HLA-DR-PerCP, CD33-APC, and the following PE-conjugated anti-chemokine receptor MAb: CDw128a-interleukin (IL)-8RA (CXCR1; clone 5A12; PharMingen, San Diego, California, USA), CDw128b (IL-8RB/CXCR2; clone 6C6; PharMingen), CD184 (CXCR4; clone 12G5; Becton Dickinson Biosciences) and CD195 (CCR5; clone 2D7/CCR5; Becton Dickinson Biosciences). In addition, a PE-conjugated isotype-matched negative MAb reagent was used as negative control. After the cells were stained, 2 ml of FACS lysing solution (Becton Dickinson Biosciences) diluted 1:10 were added, and the sample was incubated for 10 min at room temperature. After two washes with phosphate-buffered saline (pH 7.6) the sample was acquired on a FACS-Calibur instrument and analysed as described above. For each chemokine receptor analysed, the intensity of expression was quantitatively evaluated as the mean fluorescence intensity (MFI) obtained after subtracting the MFI of the corresponding isotype-matched negative control, expressed as arbitrary relative linear fluorescence units (scaled from 0 to 10^4).

Ex-vivo analysis of cytokine secretion by PB monocytes and DC

Cytokine secretion by PB monocytes and DC was analysed *ex vivo* at the single cell level, using a well-established technique that combines four-colour stainings for the specific identification of monocytes and DC with the measurement of intracellular cytokine production [40,41]. Briefly, 500 μ l of heparin-anticoagulated PB

diluted 1:1 in RPMI 1640 culture medium (Bio-Whittaker, Walkersville, Maryland, USA) supplemented with 2 mM L-glutamine were placed in a tube, together with 10 μ g/ml of Brefeldin A (Sigma, St Louis, Missouri, USA) to block cytokine secretion [40], in the absence of any exogenous stimuli. Then, cells were incubated for 6 h at 37 °C in a 5% CO₂ and 95% humidity, sterile environment, as previously described [41]. Afterwards, cells were stained with the DCE Kit, anti-HLA-DR-PerCP and CD33-APC reagents, as described above. In selected cases, staining with CD123-APC (clone 9F5; Becton Dickinson Biosciences) was performed, to specifically identify pDC. Then, cells were fixed, permeabilized and stained for different human inflammatory cytokines, using the Fix & Perm reagent (Caltag, San Francisco, California, USA), and the following MAb: anti-IL-6-PE (clone MQ2-6A3; PharMingen); anti-IL-12-PE (clone C11.5; PharMingen); tumour necrosis factor (TNF)- α -PE (clone Mab11; PharMingen); anti-IL-1 β -PE (clone AS10; Becton Dickinson Biosciences) and anti-IL-8 (anti-CXCL8)-PE (clone AS14; Becton Dickinson Biosciences). An isotype-matched PE-conjugated MAb was used as negative control. Data acquisition and analysis were performed in a FACS-Calibur flow cytometer, as described above. For the evaluation of cytokine secretion, both the percentage of positive cells within each cell subset and their MFI (after subtracting the MFI obtained for the corresponding isotype-matched negative control) were calculated according to well-described procedures [41].

Statistical analyses

Mean value, standard deviation, median, range, 25th and 75th percentiles and 95% confidence intervals were calculated for each variable using the SPSS software (SPSS 10.0, Chicago, Illinois, USA). For the evaluation of the statistical significance of the differences observed between groups, non-parametric tests (Mann-Whitney U test for unpaired samples and Wilcoxon signed rank test for paired samples) were used. *P* values ≤ 0.05 were considered to be associated statistically significant.

Results

Immunophenotypical identification and enumeration of PB monocytes and DC

In addition to monocytes, three different subsets of DC corresponding to mDC, pDC and CD16+ DC were found in PB of all individuals from both AHV [9,41] (Fig. 1), and all patient groups. Table 2 shows the distribution of these cell populations in PB. Overall HIV-1+ progressors showed normal numbers of monocytes and DC; both cell populations were significantly increased in HIV-1+LTNP (*P* = 0.04 and *P* = 0.01 respectively), while HCV+/HIV-1- individuals showed a significantly increased number of DC (*P* = 0.02), but

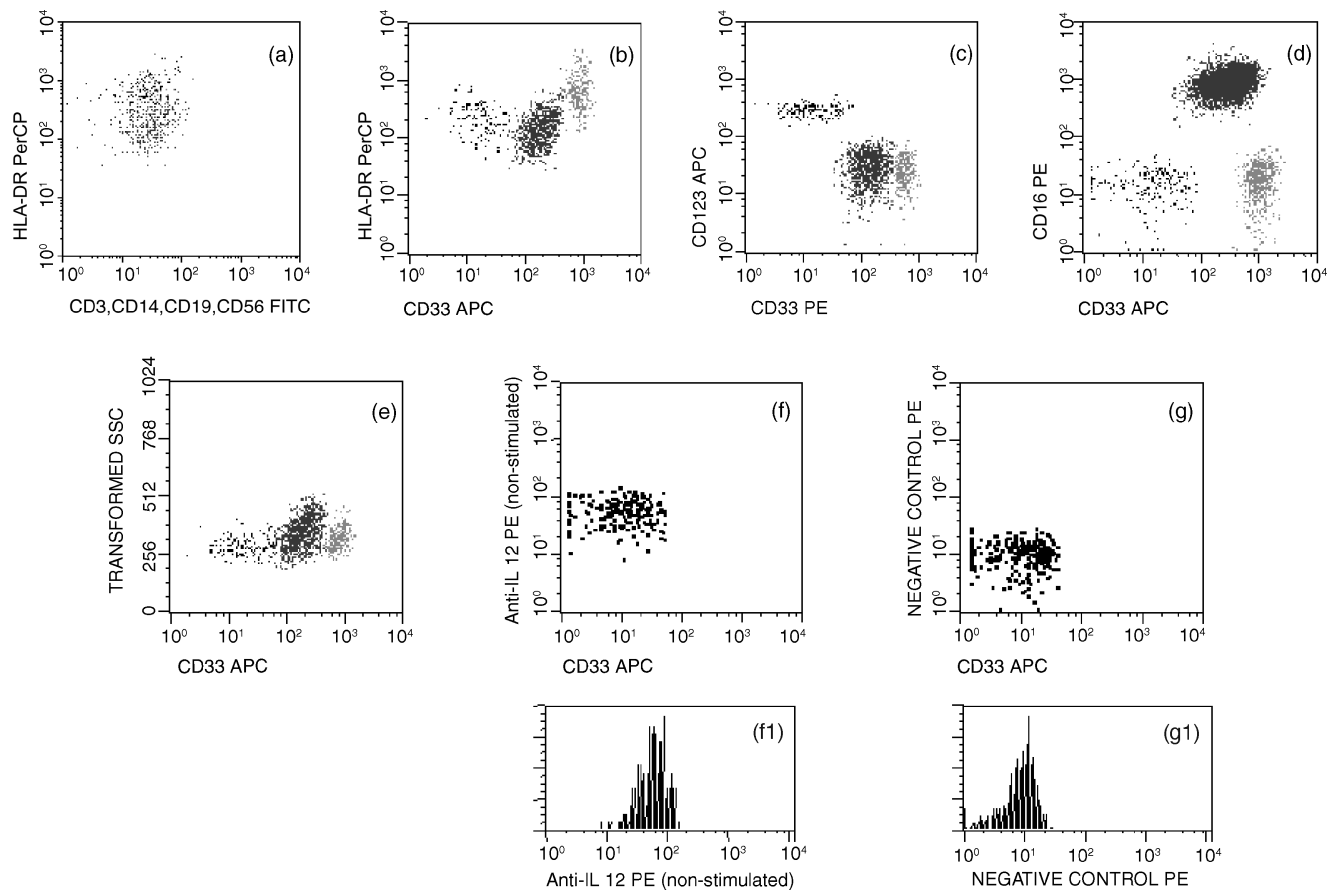


Fig. 1. Phenotypic identification of DC. (a) Total DC (HLA-DR+/Lin-/lo events). (b) The three subsets of DC present in human PB, based on their different reactivity for CD33 and HLA-DR: red dots, mDC; black dots, pDC; blue dots, CD16+ DC. (c, d and e) CD33-/lo/HLA-DR+/Lin- (c) and CD33int/HLA-DR+/Lin- (e) cells are pDC and CD16+ DC, as they correspond to CD123hi/HLA-DR+/CD16- cells and to CD123low/HLA-DR+/CD16+ cells, respectively (c and d). (f and g) Illustrative example of a case where pDC, identified as being CD33-/HLA-DR+, spontaneously secreted IL-12 after culture *in vitro* (dot plot f and histogram f1), in comparison to the isotype-matched negative control (dot plot g and histogram g1).

Table 2. Distribution of monocytes and dendritic cells (DC) in human adult peripheral blood (PB) samples from HIV-1+ progressors, hepatitis C virus positive (HCV+)/HIV-1- patients, HIV-1+ long-term non-progressor (HIV-1+LTNP) patients and adult healthy volunteers (AHV).

	HIV-1+ progressors (n = 30)	AHV (n = 10)	HCV+/HIV-1- (n = 7)	HIV-1+LTNP (n = 5)
Monocytes				
Cell count ($\times 10^6/l$)	317 (236–410)	375 (307–408)	435 (325–543)	528 (359–652)
Total DC				
Cell count ($\times 10^6/l$)	54 (28–89)	57 (47–67)	102 (79–117)*, **	114 (90–143)*, **
mDC				
DC (%)	9 (5–15)**	15 (11–19)	15 (8–25)	8 (6–16)
Cell count ($\times 10^6/l$)	4 (2–6)**	8 (6–12)	15 (12–17)*, **	12 (6–20)*
CD16+ DC				
DC (%)	85 (80–91)*	68 (64–76)	74 (64–86)	87 (75–90)**
Cell count ($\times 10^6/l$)	51 (23–84)	38 (33–50)	75 (51–88)*	92 (76–118)*, **
pDCs				
DC (%)	6 (4–8)*	14 (11–22)	11 (7–14)	6 (4–8)**
Cell count ($\times 10^6/l$)	3 (2–6)**	8 (6–12)	9 (7–11)*	8 (4–10)*

Results are expressed as median (25th and 75th percentiles). mDC, myeloid DC; pDC, plasmacytoid DC. *Statistically significantly different from the HIV+ progressors. **Statistically significantly different from the AHV group.

not of monocytes. Interestingly, when we analysed the distribution of the different subsets of PB DC, HIV-1+ progressors showed marked abnormalities consisting of a significantly decreased number of both mDC and pDC as compared to all other groups (Table 2). In contrast, the absolute count of CD16+ DC in HIV-1+ progressors was slightly greater than in AHV, but still lower than in HCV+/HIV-1- ($P = 0.13$) and in HIV-1+LTNP ($P = 0.03$) patients, whose overall increases were mainly due to the specific increase in CD16+ DC ($P = 0.02$ and $P = 0.003$, respectively). Interestingly, among HIV-1+ progressors the presence of HCV co-infection was not associated with a behaviour similar to HCV+/HIV-1 patients ($37 \times 10^6 \pm 23 \times 10^6$ cells/l versus $82 \times 10^6 \pm 49 \times 10^6$ cells/l, respectively; $P = 0.01$), and their absolute number of CD16+ DC was lower than that of the HIV-1+/HCV- progressors ($70 \times 10^6 \pm 38 \times 10^6$ cells/l; $P = 0.06$).

Expression of chemokine receptors on PB monocytes and DC

As shown in Fig. 2, CXCR1 and/or CXCR2 IL-8-chemokine receptors were exclusively expressed by monocytes and mDC. The percentage of CXCR1+ monocytes was similar in all groups, although the mean amount of chemokine-receptor per CXCR1+ mono-

cyte was lower in HIV-1+ progressors as compared to HCV+/HIV-1- patients ($P = 0.02$) and HIV-1+LTNP ($P = 0.05$).

Similarly, no significant differences were found between HIV-1+ progressors and AHV regarding the proportion of CXCR2+ monocytes (Fig. 2) although both HCV+/HIV-1- and HIV-1+LTNP patients showed increased expression of CXCR2 on all PB monocytes ($P = 0.006$ and $P = 0.03$ for HCV+/HIV-1-, and $P = 0.02$ and $P = 0.05$ for HIV-1+LTNP versus HIV-1+ progressors and AHV, respectively). Likewise, in monocytes from HCV+/HIV-1- and HIV-1+LTNP patients, the levels of CXCR2/cell were significantly higher than in HIV-1+ progressors ($P = 0.01$ and $P = 0.02$, respectively). Moreover, in HIV-1+ progressors both the proportion of CXCR2+ mDC and the amount of CXCR2/cell were significantly lower than in AHV ($P = 0.01$ for both comparisons), HCV+/HIV-1- ($P = 0.005$ and $P = 0.09$, respectively) and HIV-1+LTNP patients ($P = 0.01$ and $P = 0.05$, respectively).

As shown in Fig. 3, a variable percentage of monocytes and DC from all groups studied were CXCR4+. The percentage of mDC and pDC CXCR4+ was significantly reduced in HIV-1+ progressors when compared to

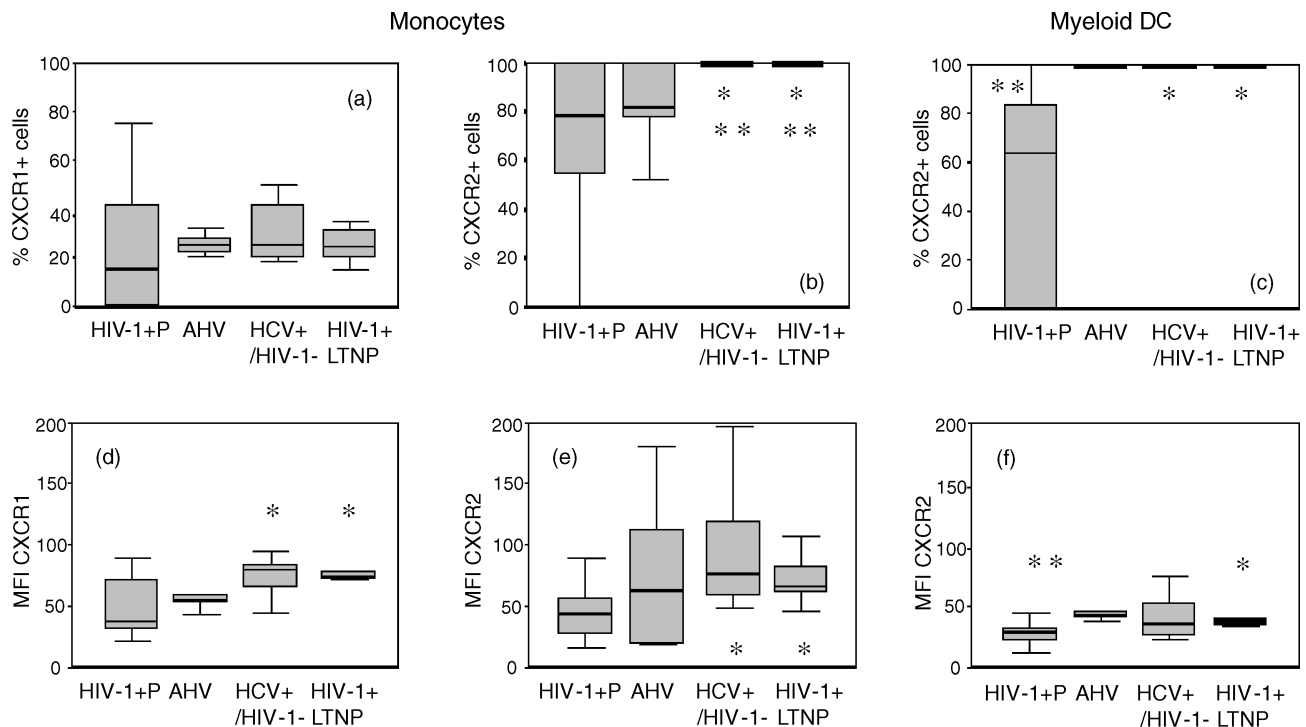


Fig. 2. Expression of the CXCR1 and CXCR2 chemokine receptors by PB monocytes and mDC from (HIV-1+ progressors), HCV+/HIV-1- subjects, HIV-1+LTNP and AHV. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. (a, b) Percentage of CXCR1+ and CXCR2+ monocytes. (c) Percentage of CXCR2+ mDC. (d–f) CXCR1 and CXCR2-associated MFI per cell (arbitrary relative linear units scaled from 0 to 10^4) observed for CXCR1+ monocytes, CXCR2+ monocytes and CXCR2+ mDC, respectively. CD16+ DC and pDC were constantly negative for both CXCR1 and CXCR2 in all groups of individuals studied. *Statistically significantly different ($P \leq 0.05$) from the HIV-1+ progressors. **Statistically significantly different ($P \leq 0.05$) from the AHV group.

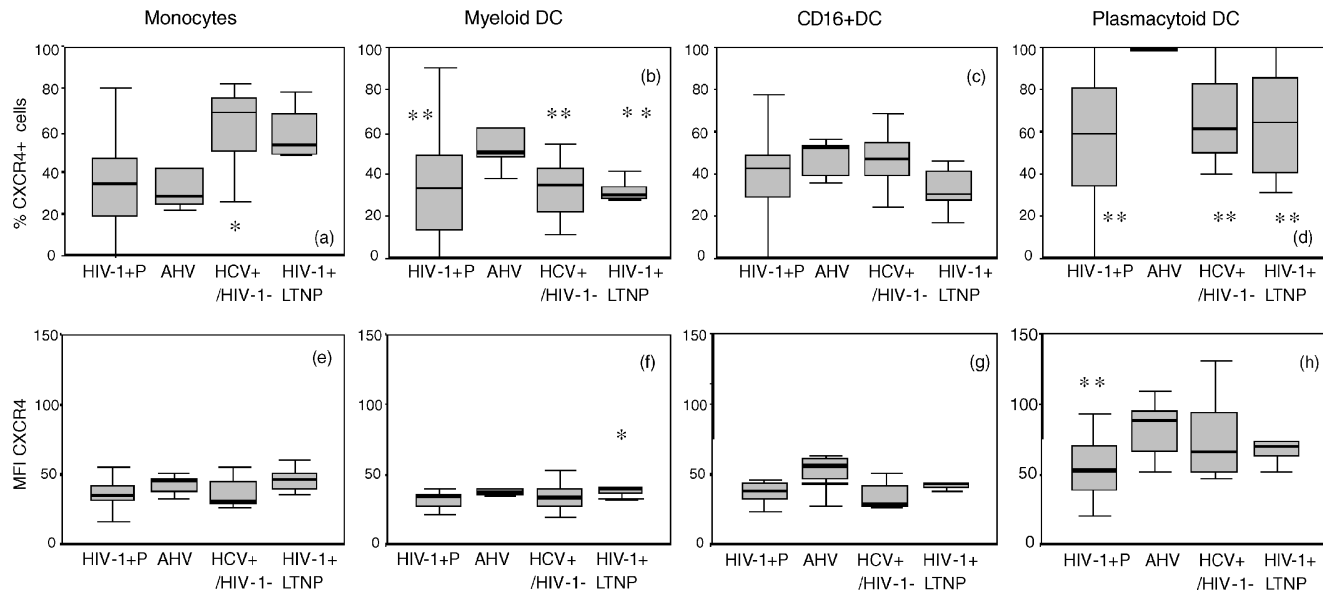


Fig. 3. Expression of the CXCR4 chemokine receptor on PB monocytes and DC from HIV-1+P, HCV+/HIV-1- subjects, HIV-1+LTNP and AHV. (a–d) Percentage of CXCR4 expressing cells. (e–h) Mean amount of CXCR4 expressed per cell (MFI). Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. *Statistically significantly different ($P \leq 0.05$) from the HIV-1+ progressors. **Statistically significantly different ($P \leq 0.05$) from the AHV group.

AHV ($P = 0.02$ and $P = 0.001$, respectively), HCV+/HIV-1- ($P = 0.04$ and $P = 0.02$, respectively) and HIV-1+LTNP ($P = 0.02$ and $P = 0.02$, respectively); however, the proportion of CXCR4+ CD16+ DC and CXCR4+ monocytes was similar in all groups studied, except for HCV+/HIV-1- patients, who showed increased CXCR4 expression on monocytes as compared to HIV-1+ progressors ($P = 0.01$) and AHV ($P = 0.08$). It should be noted that among HIV-1+ progressors the mean amount of CXCR4/cell was also decreased when compared to HIV-1+LTNP ($P = 0.04$) and AHV ($P = 0.02$) (Fig. 3).

CCR5 expression was restricted to PB mDC and pDC in all groups (Fig. 4); mDC from HIV-1+ progressors, HCV+/HIV-1- patients and AHV were constantly positive for CCR5, and identical amounts of this chemokine receptor per mDC were detected in all groups of individuals studied. In contrast, the percentage of CCR5+ pDC was significantly decreased in HIV-1+ progressors as compared with the AHV ($P = 0.04$) and HCV+/HIV-1- groups ($P = 0.02$), whose pDC were constantly CCR5+. In addition, the amount of CCR5/cell was also significantly reduced in pDC from HIV-1+ progressors ($P = 0.02$) and HIV-1+LTNP ($P = 0.03$), as compared to the AHV group.

No statistically significant differences were found among HIV-1+ progressors between HCV+ and HCV- cases regarding the expression of chemokine receptors (data not shown).

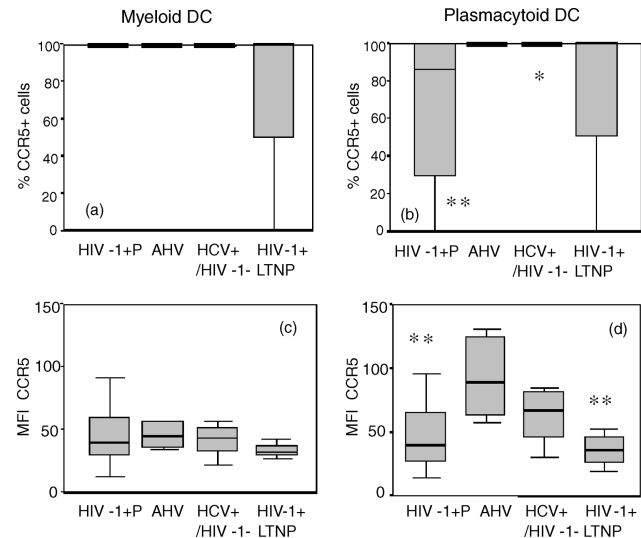


Fig. 4. Expression of the CCR5 chemokine receptor by PB mDC and pDC from (HIV-1+ progressors), HCV+/HIV-1- subjects, HIV-1+LTNP and AHV. (a, b) Percentage of CCR5+ mDC and pDC, respectively. (c, d) Mean amount of CCR5 expressed per mDC and pDC, respectively (MFI). Monocytes and CD16+ DC were constantly negative for CCR5 in all groups of individuals studied. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. *Statistically significantly different ($P \leq 0.05$) from the HIV-1+ progressors. **Statistically significantly different ($P \leq 0.05$) from the AHV group.

Spontaneous *ex vivo* production of inflammatory cytokines by monocytes and DC
PB monocytes and DC from AHV and HIV-1+LTNP individuals showed no spontaneous *ex vivo* production of inflammatory cytokines. By contrast, spontaneous *ex vivo* production of inflammatory cytokines was observed among PB monocytes and DC from HIV-1+ progressors, and to a lesser extent from HCV+/HIV-1- patients (Fig. 5). A more detailed analysis showed different patterns of cytokine secretion for the different cell subsets analysed (Fig. 5). Accordingly, among HIV-1+ progressors, monocytes and CD16+ DC showed a significantly increased spontaneous production of IL-6 ($P = 0.005$ and $P = 0.001$, respectively) and TNF- α ($P = 0.01$ and $P = 0.008$, respectively), while pDC showed increased secretion of IL-6 and IL-12 in the absence of TNF- α , these latter differences not reaching statistical significance ($P > 0.05$), once compared to the other groups of individuals. Interestingly, once HIV-1+ progressors were grouped

according to their PB CD4+ T-cell counts, we observed that secretion of IL-6, IL-12 and TNF- α by pDC was restricted to those patients who displayed $>200 \times 10^6$ CD4 T cells/l in PB (Fig. 6). Regarding HCV+/HIV-1- patients, CD16+ DC produced significantly increased amounts of IL-6 and TNF- α as compared to AHV ($P = 0.004$ and $P = 0.04$, respectively), while pDC from this group of individuals produced only IL-12 ($P > 0.05$). As compared to HIV-1+ progressors, HCV+/HIV-1- patients showed a significantly lower percentage of TNF- α secreting monocytes, no major additional differences being observed between either group of individuals. Of note, upon dividing the HIV-1+ progressors according to the existence or not of co-infection with HCV, no significant differences were observed between either group regarding spontaneous secretion of cytokines, except for a lower percentage of TNF- α secreting monocytes found for the HIV+/HCV+ progressors ($1.8 \pm 2.2\%$ versus $5.1 \pm 5.0\%$; $P = 0.02$).

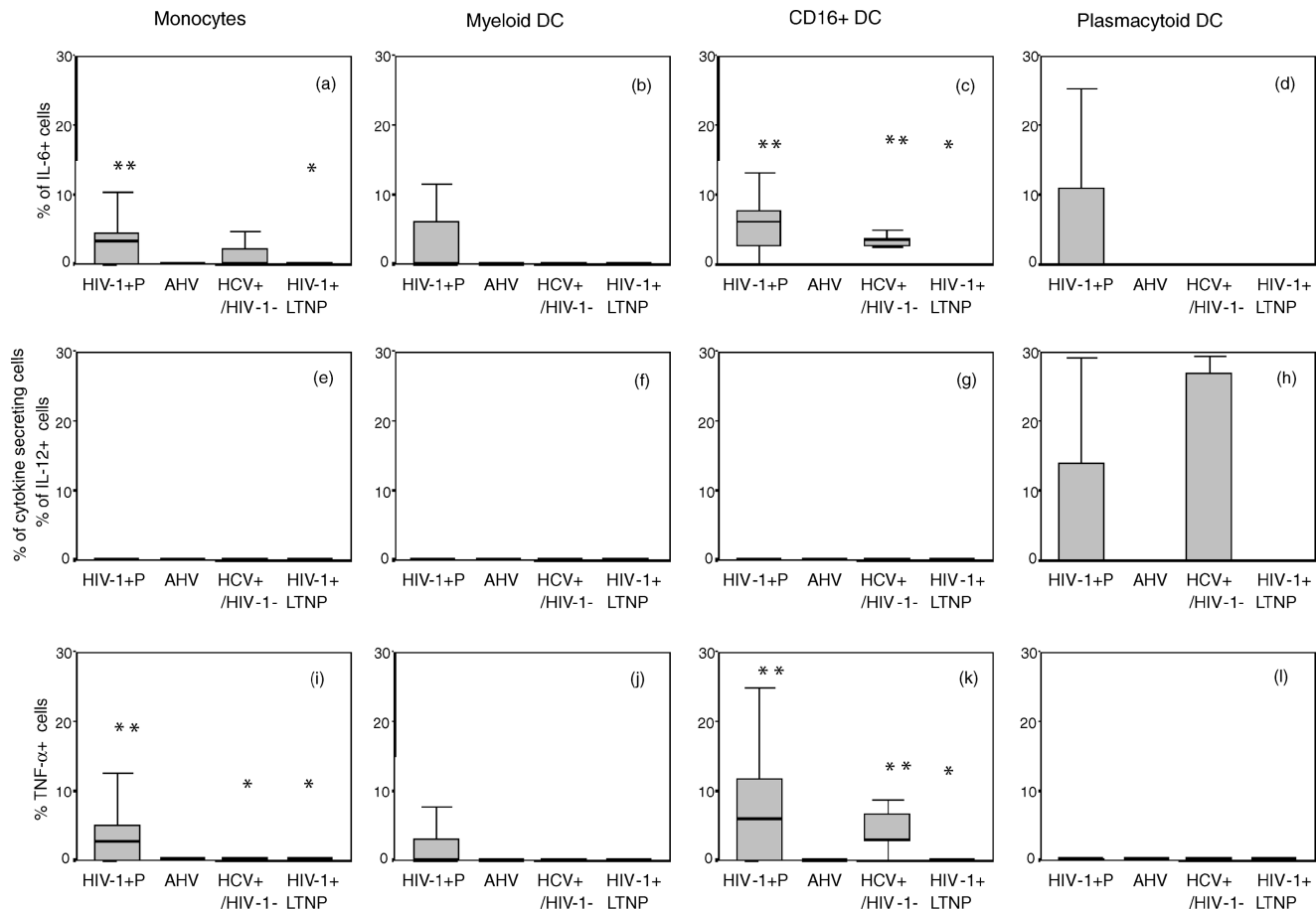


Fig. 5. Spontaneous *ex vivo* secretion of the IL-6 (a–d), IL-12 (e–h) and TNF- α (i–l) inflammatory cytokines by PB monocytes and DC from (HIV-1+ progressors), HCV+/HIV-1- subjects, HIV-1+LTNP and AHV. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. A small percentage (range, 1–4%) of all monocytes, mDC and CD16+ DC, but not pDC from HIV-1+ progressors spontaneously secreted IL-1 β and IL-8, (data not shown), while production of both cytokines was never detected among the other groups of individuals studied ($P > 0.05$). *Statistically significantly different ($P \leq 0.05$) from the HIV-1+ progressors. **Statistically significantly different ($P \leq 0.01$) from the AHV group.

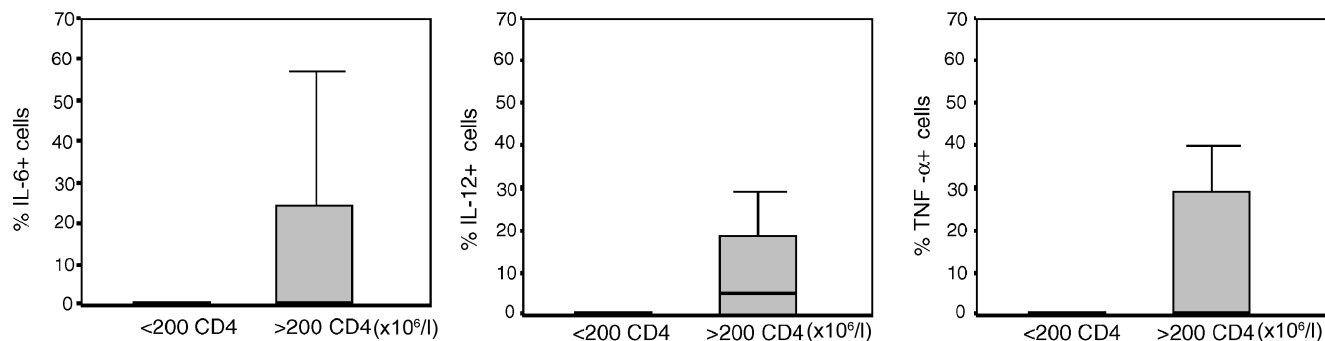


Fig. 6. Spontaneous *ex vivo* secretion of IL-6, IL-12 and TNF- α cytokines by PB pDC from HIV-1+ progressors according to the absolute number of CD4+T-cells/l. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively.

Although a small percentage (between 1% and 4%) of all monocytes, mDC and CD16+ DC, but not pDC, from HIV-1+ progressors also showed IL-8 and IL-1 β secretion *ex vivo*, no significant differences were found with respect to the other groups of individuals studied.

Discussion

Accumulating evidence indicates that DC may play an important role in HIV-1 infection either because they are infected by HIV-1 or due to their impaired ability to stimulate specific T cells. However, no study has so far systematically analysed *ex vivo* the specific phenotypic and functional characteristics of the different subsets of DC circulating in PB in a series of HIV-1+ anti-retroviral naive patients.

We have analysed the numerical distribution of the different subsets of PB DC and monocytes, as well as the pattern of expression of chemokine receptors, and spontaneous secretion of inflammatory cytokines in a cohort of anti-retroviral therapy naive HIV-1+ progressors. Co-infection of HIV-1 and HCV is very common and, despite discrepant results [42], impairment of maturation and functionality of DC from chronic HCV+ individuals has been observed [43,44]. Therefore, a control group of HCV+/HIV-1- patients was also studied, ruling out the possibility that those alterations found in HIV-1+ progressors could be due to co-infection by HCV. In addition to HCV+/HIV-1- subjects, we also analysed a group of HIV-1+LTNP patients, which could help to identify factors potentially associated with delayed progression of HIV-1 infection.

Our results clearly show that the number of both PB mDC and pDC from HIV-1+ progressors are severely decreased, remaining unaltered in HIV-1+LTNP, and mDC being even significantly increased in HCV+/HIV-1- subjects as compared to AHV. These findings support

the existence of a direct interaction between the two DC subsets and HIV-1, as previously suggested [20–23]. Accordingly, both cell subpopulations express the CXCR4 and CCR5 HIV-1 co-receptors, essential for virus entry. In contrast, PB CD16+ DC were slightly increased in HIV-1+ progressors as compared to AHV, and significantly increased in HCV+/HIV-1- and HIV-1+LTNP patients. Although PB CD16+ DC are constantly CCR5⁻, they expressed CXCR4 at variable levels, similar to those observed in AHV. CXCR4 is used by T-tropic HIV variants appearing during late infection and its presence could therefore lead to PB CD16+ DC infection. However, avidity of DC-SIGN for viral gp-120 is greater than that of CD4 [18], which may facilitate capture of HIV-1 particles by DC-SIGN molecules, preventing both gp-120-CD4-CXCR4 interaction and cell infection. Recently, it has been shown that CD16+ DC are the only fresh DC subpopulation in blood expressing DC-SIGN [13]. Since HIV-1 entry into target cells may be blocked by attachment to DC-SIGN – it does not allow viral infection but binds HIV-1, transports it and enhances T-cell infection [18] – CD16+ DC could remain uninfected and their numbers not reduced, while playing a key role in the dissemination of HIV-1 virions to T cells [13].

It is well established that CCR5-dependent M-tropic HIV-1 strains are involved in primary infection, whereas CXCR4-associated T-tropic strains usually arise later on and may be associated with progression to AIDS [45]. The expression of CCR5 found on the surface of both mDC and pDC, but not CD16+ DC, suggests that selective loss of mDC and pDC observed in HIV-1+ progressors, but not in HIV-1+LTNP, could be related to a direct interaction between these cells and HIV-1. Since both DC subsets participate in the initiation of innate and adaptive immune responses, and are the most potent antigen-presenting cells for priming naive T lymphocytes, the reduction in DC numbers could play an important role in the progressive impairment of T-cell function seen in HIV-1 disease [32,46], and potentially contribute to its characteristic immunosuppression.

Moreover, the pattern of expression of chemokine receptors on the different DC subsets from HIV-1+ progressors was severely altered in PB mDC and pDC, but not in CD16+ DC and monocytes: CXCR2 was decreased on mDC, CCR5 on pDC and CXCR4 on both. Ligand–receptor interaction has been shown to induce rapid internalization of chemokine receptors and to initiate signalling responses [47–49]. Accordingly, reduced CXCR2 expression found on mDC from HIV-1+ progressors could reflect down-modulation of the receptor as a consequence of its interaction with secreted IL-8. In turn, abnormally low CCR5 expression on pDC could be directly related to HIV-1 infection. Previous studies have shown that HIV-1 infection of CD4+ T lymphocytes leads to down-modulation of both CD4 cell and CCR5 expression on these cells [50]. While it is known that HIV-1 Nef induces internalization and degradation of CD4 [51], the exact mechanism involving CCR5 downregulation has not yet been identified. Decreased expression of CCR5 could reflect maturation of pDC as a consequence of their interaction with HIV-1, since maturation of DC is associated with down-modulation of cell surface CCR5 expression [52]. However, CCR5 expression on PB pDC was decreased not only in HIV-1+ progressors, but also in the HIV-1+LTNP group. In a similar way, CXCR4 expression was significantly decreased on both mDC and pDC from HIV-1+ progressors, HIV-1+LTNP and HCV+/HIV-1– patients. Although CXCR4 has been shown to be down-modulated after infection with a CXCR4-HIV-2 variant [53], this has not been confirmed for HIV-1 [50]. Interestingly, it has been shown that secretion of Th1 cytokines induces a decreased CXCR4 expression on mature DC in HIV-1 infection, and could account for CXCR4 down-regulation [54].

Inflammatory cytokines are important effector molecules for the initiation and amplification of immune responses, and for communication between antigen-presenting cells and T lymphocytes. Detectable amounts of inflammatory cytokines have been produced by DC obtained from HIV-1+ patients, or pulsed *in vitro* with high doses of HIV-1 or HIV-1 proteins, when exposed to different stimuli [15,55–57]. In our study, PB monocytes and DC from HIV-1+ progressors produced detectable amounts of inflammatory cytokines in the absence of exogenous stimulus after short-term *in vitro* culture. No such response was observed in HIV-1+LTNP or in AHV, supporting the existence of an *in vivo* activation of the immune system during HIV-1 infection among HIV-1+ progressors but not among HIV-1+LTNP. Therefore, reduced CXCR4 expression observed on mDC and pDC, as well as that of CCR5 found on pDC from HIV-1+LTNP patients could naturally occur and protect against T-tropic strains of HIV-1; in contrast, in HIV-1+ progressors it could be modulated either directly by the virus or through cytokine-mediated mechanisms. Interestingly, PB monocytes, pDC and CD16+ DC from

HCV+/HIV-1– patients were also able to spontaneously secrete IL-6, IL-12 and/or TNF- α , but at lower levels than those observed in HIV-1+ progressors; in this latter group, cytokine secretion was independent of the coexistence of HCV infection, being associated with both decreased numbers of mDC and pDC and lower expression of CCR5 in both cell subsets, features that were not detected in the HCV+/HIV-1– group. This represents a clearly different pattern of abnormalities in both groups, which could reflect different pathogenic mechanisms. Independently, it should be noted that secretion of specific inflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α has been shown to induce viral replication in CD4+ T lymphocytes from HIV-1+ patients [55,58,59], while immunosuppressive therapy can block HIV-1 replication through the inhibition of cytokine secretion [60]; moreover, the capacity of human DC to present antigens to T cells declines after exposure to TNF- α [61]. These results indicate that secretion of inflammatory cytokines *in vivo* might contribute to the impairment of DC functionality observed in HIV-1 progressors.

In summary, our results show the existence of significant abnormalities in the distribution and functionality of the different subsets of PB DC in HIV-1+ progressors, not found in HIV-1+LTNP, and could help to explain the establishment, dissemination and maintenance of HIV-1 infection.

Acknowledgments

We thank Prof. M Ángel del Pozo, Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínico de Valladolid and Universidad de Valladolid, Valladolid, Spain, for his kind collaboration with this study by sending samples from HIV-1 infected patients.

Sponsorship: Supported by MSD España S.A. and BMS S.L. M.A. is a recipient of a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid, Spain (Ref. AP2000-3818).

References

1. 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.
2. Siegal FP, Lopez C, Fitzgerald PA, *et al.* **Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity.** *J Clin Invest* 1986; **78**:115–123.
3. Howell DM, Feldman M, Siegal FP, Pettera L, Fitzgerald-Bocarsly P. **Peripheral blood of AIDS patients contains cells**

- capable of providing accessory function for the natural killer cell-mediated, lysis of herpes simplex virus-infected targets despite low interferon- α production. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; **6**:15–23.
4. Siegal FP, Fitzgerald-Bocarsly P, Holland BK, Shodell M. Interferon- α generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *AIDS* 2001; **15**:1603–1612.
 5. Lore K, Larsson M. The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection. *APMIS* 2003; **111**:776–788.
 6. Servet C, Zitvogel L, Hosmalin A. Dendritic cells in innate immune responses against HIV. *Curr Mol Med* 2002; **2**:739–756.
 7. Steinman RM, Granelli-Piperno A, Pope M, et al. The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2003; **276**:1–30.
 8. Donaghy H, Stebbing J, Patterson S. Antigen presentation and the role of dendritic cells in HIV. *Curr Opin Infect Dis* 2004; **17**:1–6.
 9. Almeida J, Bueno C, Algueró MC, et al. Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage⁻/CD16⁺/HLA-DR⁺/CD14^{-/lo} cells, CD14⁺ monocytes, and CD16⁻ dendritic cells. *Clin Immunol* 2001; **100**:325–338.
 10. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, et al. Characterization of human dendritic cell subsets. *Blood* 2002; **100**:4512–4520.
 11. Schäkel K, Mayer E, Federle C, et al. A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1998; **28**:4084–4093.
 12. Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, et al. Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64⁺/CD16⁺ blood monocytes. *Eur J Immunol* 2001; **31**:48–56.
 13. Engering A, van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, et al. Subset of DC-SIGN⁺ dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 2002; **100**:1780–1786.
 14. Rivas-Carvalho A, Meraz-Ríos MA, Santos-Argumedo L, et al. CD16⁺ human monocyte-derived dendritic cells matured with different and unrelated stimuli promote similar allogeic Th2 responses: regulation by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol* 2004; **16**:1251–1263.
 15. Pope M, Betjes MG, Romani N, et al. Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* 1994; **78**:389–398.
 16. Pope M, Gezelter S, Gallo N, Hoffman L, Steinman RM. Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1995; **182**:2045–2056.
 17. Hussain LA, Lehner T. Comparative investigation of Langerhans' cells and potential receptors for HIV in oral, genitourinary and rectal epithelia. *Immunology* 1995; **85**:475–484.
 18. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; **100**:587–597.
 19. Cambi A, de Lange F, van Maarseveen NM, et al. Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *J Cell Biol* 2004; **164**:145–155.
 20. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, et al. Reduced blood CD123⁺ (lymphoid) and CD11c⁺ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* 2001; **98**:3016–3021.
 21. Grassi FR, Hosmalin A, McIlroy D, Calvez V, Debre P, Autran B. CD11c-positive dendritic cells are depleted in the blood of HIV-infected patients. *AIDS* 1999; **13**:759–766.
 22. Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, et al. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2002; **168**:4796–4801.
 23. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 2001; **98**:906–912.
 24. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; **284**:1835–1837.
 25. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; **8**:919–923.
 26. Chougnnet C, Cohen S, Kawamura T, et al. Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy. *J Immunol* 1999; **163**:1666–1673.
 27. Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* 1996; **184**:2433–2438.
 28. Fong L, Mengozzi M, Abbey NW, Herndier BG, Engleman EG. Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol* 2002; **76**:11033–11041.
 29. Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. Immature dendritic cells selectively replicate Macrophage-tropic (M-Tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-Tropic virus to T cells. *J Virol* 1998; **72**:2733–2737.
 30. Patterson S, Rae A, Hockey N, Gilmour J, Gotch F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol* 2001; **75**:6710–6713.
 31. MacDougall TH, Shattock RJ, Madsen C, Chain BM, Katz DR. Regulation of primary HIV-1 isolate replication in dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2002; **127**:66–71.
 32. Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, Patterson S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* 2003; **101**:4505–4511.
 33. Sanders RW, de Jong EC, Baldwin CE, Schuitemaker JH, Kapsenberg ML, Berkhout B. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J Virol* 2002; **76**:7812–7821.
 34. Turville SG, Santos JJ, Frank I, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* 2004; **103**:2170–2179.
 35. McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, Hope TJ. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 2003; **300**:1295–1297.
 36. Sapp M, Engelmayer J, Larsson M, Granelli Piperno A, Steinman RM, Bhardwaj N. Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunol Lett* 1999; **66**:121–128.
 37. Barker E, Mackewicz CE, Reyes-Terán G, et al. Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Blood* 1998; **92**:3105–3114.
 38. Buchbinder SP, Katz MH, Hessol NA, O'Malley PM, Holmberg SD. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* 1994; **8**:1123–1128.
 39. Menéndez P, Prósper F, Bueno C, et al. Sequential analysis of CD34⁺ and CD34⁻ cell subsets in peripheral blood and leukapheresis products from breast cancer patients mobilized with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia* 2001; **15**:430–439.
 40. Bueno C, Almeida J, Algueró MC, et al. Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry* 2001; **46**:33–40.
 41. Almeida J, Bueno C, Algueró MC, et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II⁺/lineage⁻ cells. *Clin Exp Immunol* 1999; **118**:392–401.
 42. Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* 2004; **103**:1026–1029.
 43. Auffermann-Gretzinger S, Keeffe EB, Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood* 2001; **97**:3171–3176.
 44. Kanto T, Hayashi N, Tekehara T, et al. Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol* 1999; **162**:5584–5591.
 45. 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.
 46. Knight SC, Macatonia SE, Patterson S. HIV-1 infection of dendritic cells. *Int Rev Immunol* 1990; **6**:163–175.

47. Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. **HIV-1 Coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation.** *Virology* 1997; **234**:340–348.
48. Chuntharapai A, Kim KJ. **Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor.** *J Immunol* 1995; **155**:2587–2594.
49. Signorel N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, *et al.* **Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4.** *J Cell Biol* 1997; **139**:651–664.
50. Chenine AL, Sattentau Q, Moulard M. **Selective HIV-1-induced downmodulation of CD4 and coreceptors.** *Arch Virol* 2000; **145**:455–471.
51. Aiken C, Konner J, Landau NR, Lenburg ME, Trono D. **Nef induces CD4 endocytosis: Requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain.** *Cell* 1994; **76**:853–864.
52. Canque B, Bakri Y, Camus S, Yagello M, Benjouad A, Gluckman JC. **The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage.** *Blood* 1999; **93**:3866–3875.
53. Endres M, Clapham P, Marsh M, *et al.* **CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4.** *Cell* 1996; **87**:745–756.
54. Zoetewij JP, Golding H, Mostowski H, Blauvelt A. **Cytokines regulate expression and function of the HIV coreceptor CXCR4 on human mature dendritic cells.** *J Immunol* 1998; **161**:3219–3223.
55. Loré K, Sönnnerborg A, Olsson J, *et al.* **HIV-1 exposed dendritic cells show increased pro-inflammatory cytokine production but reduced IL-1ra following lipopolysaccharide stimulation.** *AIDS* 1999; **13**:2013–2021.
56. Ghanekar S, Zheng L, Logar A, *et al.* **Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and Herpes Simplex Virus.** *J Immunol* 1996; **157**:4028–4036.
57. Quaranta MG, Tritarelli E, Giordani L, Viora M. **HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4⁺ T cell activation.** *Exp Cell Res* 2002; **275**:243–254.
58. Chun TW, Engel D, Mizell SB, Ehler LA, Fauci AS. **Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4⁺ T cells using a combination of cytokines.** *J Exp Med* 1998; **188**:83–91.
59. Vizenci E, Poli G. **Regulation of HIV expression of by viral genes and cytokines.** *J Leukocyte Biol* 1994; **56**:328–334.
60. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. **Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids.** *J Leukocyte Biol* 1996; **60**:563–572.
61. Sallusto F, Lanzavecchia A. **Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.** *J Exp Med* 1994; **179**:1109–1118.

Las alteraciones de las células dendríticas y monocitos de sangre periférica de pacientes VIH-1⁺ persisten tras 1 año de tratamiento antirretroviral.

INTRODUCCIÓN: A pesar de sus efectos beneficiosos sobre los índices de morbi-mortalidad en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), el tratamiento antirretroviral (TAR) no erradica el virus, ni produce una recuperación completa de la funcionalidad de los linfocitos T en pacientes VIH-1⁺ en estadios intermedios/avanzados de la enfermedad. Por otra parte, aunque las células dendríticas desempeñan un papel crucial en la patogenia de la infección por el VIH-1, y se han descrito notables alteraciones en su número y función, los estudios disponibles en la actualidad acerca del efecto del TAR sobre las células dendríticas en la infección por el VIH-1 son escasos, y sus resultados con frecuencia contradictorios.

OBJETIVO: El objetivo principal del presente trabajo se ha centrado en analizar *ex vivo*, el efecto del TAR sobre la distribución numérica, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas y la capacidad de producción de citocinas inflamatorias por parte del sistema inmunitario de sangre periférica (SP) de individuos infectados por el VIH-1, con especial énfasis en el estudio de las células dendríticas y monocitos.

MATERIAL Y MÉTODOS: En total, hemos analizado un grupo de 30 pacientes VIH-1⁺ asintomáticos que no habían sido tratados previamente. Los pacientes se agruparon de acuerdo al número absoluto de linfocitos T CD4⁺ circulantes en SP en el momento de su inclusión en el estudio, en sujetos con <200 células CD4⁺/μl de SP e individuos con >200 células CD4⁺/μl de SP. Los estudios fenotípicos y funcionales se realizaron de forma previa a la instauración del TAR y a las 2, 4, 8, 12 y 52 semanas desde el inicio del mismo. Además, como controles se analizaron muestras de SP de 10 adultos sanos (AS). La identificación y recuento de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos se realizó a partir de muestras de SP lisada de hematíes, mediante técnica de inmunofluorescencia directa evaluada por citometría de flujo, marcando las células con anticuerpos monoclonales (AcMo) en combinaciones cuádruples y utilizando microesferas fluorescentes a una concentración conocida, para lograr una mayor precisión en el recuento celular (método de plataforma única).

Para el análisis del patrón de expresión de receptores de quimiocinas empleamos la misma metodología que para la identificación de las distintas subpoblaciones celulares estudiadas, utilizando tres anticuerpos para la identificación de las diferentes subpoblaciones de monocitos y células dendríticas, y un cuarto AcMo (en cada combinación) para determinar la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR1, CXCR2, CXCR4 y CCR5. El análisis de la producción de citocinas inflamatorias se realizó sobre células individuales, tras su incubación durante 6 horas a 37°C en presencia de brefeldina A y en ausencia de estimulantes exógenos, con el fin de analizar *ex vivo*, y mediante citometría de flujo, la producción espontánea de citocinas a nivel citoplasmático, por parte de cada una de las subpoblaciones celulares referidas anteriormente.

RESULTADOS: La administración de TAR provocó una rápida disminución de la carga viral hasta niveles indetectables en todos los pacientes. Sin embargo, el tratamiento no consiguió una reconstitución completa del compartimiento de células T, permaneciendo el número absoluto de células T CD4⁺, en su conjunto, por debajo de los valores normales, mientras que el número de linfocitos T CD8⁺ se encontraba significativamente incrementado, incluso después de un año de tratamiento ($p < 0.05$). Por otra parte, a pesar de que el número de células dendríticas mieloides CD33⁺⁺⁺ (en adelante “*CD mieloides*”) y de CD plasmocitoides estaba reducido de manera significativa en los pacientes VIH-1⁺ al comienzo del estudio, tras el inicio de la terapia se consiguió una recuperación de los niveles de ambas subpoblaciones, siendo la reconstitución de las CD plasmocitoides más tardía que la de las CD mieloides. Por el contrario, tras un año de tratamiento, el número de CD HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil} (en adelante “*CD CD16⁺*”) y de monocitos de SP, -normal al comienzo del estudio-, estaba significativamente incrementado en los pacientes con $< 200 \text{ CD4}^+/\mu\text{l}$, respecto a los valores encontrados en AS ($p < 0.05$).

Con respecto a la expresión de receptores de quimiocinas observamos que, previamente al tratamiento, el porcentaje de CD mieloides CXCR2⁺ estaba significativamente disminuido en pacientes VIH-1⁺ respecto a los AS ($p < 0.05$). Tras el comienzo del TAR, se observó un incremento importante en la proporción de monocitos CXCR1⁺ en el grupo más inmunodeprimido ($< 200 \text{ CD4}^+/\mu\text{l}$) al año de tratamiento ($p < 0.05$); por el contrario, el porcentaje

de CD mieloides que expresaba CXCR2 se mantuvo por debajo de los niveles normales durante todo el período de seguimiento evaluado. Nuestros resultados mostraron además que en situación basal, la proporción de CD mieloides y plasmocitoides CXCR4⁺ se encontraba considerablemente reducida en ambos grupos de pacientes ($p < 0.05$), existiendo una fuerte correlación negativa entre la carga viral y la expresión de CXCR4 en ambas poblaciones en los pacientes con >200 CD4⁺/μl. A pesar de la recuperación parcial del porcentaje de CD plasmocitoides CXCR4⁺ al año de tratamiento, la expresión de este receptor se mantuvo constantemente por debajo de los niveles normales en CD mieloides ($p < 0.05$). Con respecto a CCR5, la proporción de CD plasmocitoides que expresaba dicho receptor estaba inicialmente reducida de manera significativa en los pacientes VIH-1⁺ más inmunodeprimidos ($p < 0.05$), aunque se recuperó al año de tratamiento.

Ninguno de los AS mostró producción espontánea de citocinas inflamatorias en ausencia de estímulo exógeno. Por el contrario, previamente a la administración del TAR, los monocitos y CD CD16⁺ de ambos grupos de individuos VIH-1⁺ producían cantidades significativas de IL-6 y TNF- α en ausencia de estimulación ($p < 0.05$), asociándose ésta a secreción espontánea de IL-1 β e IL-6 en el caso de las CD CD16⁺ y las CD mieloides, respectivamente. Tras el comienzo del TAR, la producción espontánea de IL-6 y TNF- α por monocitos y CD CD16⁺ disminuyó progresivamente; sin embargo, tras un año de tratamiento las CD CD16⁺ de los pacientes más inmunodeprimidos continuaban produciendo IL-6 de forma espontánea ($p < 0.05$). Además, observamos una fuerte correlación negativa entre la producción espontánea de IL-6 por los monocitos y CD CD16⁺ y el porcentaje de CD mieloides CXCR2⁺ y CXCR4⁺, lo que sugiere que la secreción espontánea de citocinas inflamatorias podría contribuir a la expresión alterada de receptores de quimiocinas que se observa al año de tratamiento. La producción espontánea de citocinas inflamatorias por las CD plasmocitoides observada en condiciones basales se restringía al grupo de pacientes VIH-1⁺ >200 células T CD4⁺/μl de SP ($p < 0.05$), aunque tras el inicio del TAR revirtió por completo.

CONCLUSIONES: A pesar de los efectos beneficiosos del TAR sobre el sistema inmune, las alteraciones numéricas observadas en los compartimientos de células T, células dendríticas y monocitos de SP de pacientes infectados por el VIH-1 persisten incluso después

de un año de tratamiento, junto a notables anomalías fenotípicas y funcionales de las células dendríticas y monocitos de SP, siendo estas alteraciones más acentuadas en pacientes en estadios avanzados de la enfermedad.

Persistent Abnormalities in Peripheral Blood Dendritic Cells and Monocytes from HIV-1–Positive Patients After 1 Year of Antiretroviral Therapy

Maria Almeida,*† Miguel Cordero,†‡ Julia Almeida,*† and Alberto Orfao*†

Summary: Antiretroviral therapy (ART) has led to marked decreases in morbidity and mortality rates among HIV-1–positive patients; however, immune recovery is not complete. Although dendritic cells (DCs) were shown to be involved in HIV-1 pathogenesis, few studies have investigated the effect of ART on DCs. We have analyzed the effect of ART on numerical distribution, expression of chemokine receptors, and ex vivo production of inflammatory cytokines by peripheral blood (PB) monocytes and DCs in a cohort of chronically infected HIV-1–positive patients. Patients were tested before therapy and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART.

Our results show an incomplete T-cell immune reconstitution in chronically infected patients who had undetectable plasma viremia while taking ART for 1 year. This was associated with persistent abnormalities at week +52 of ART, corresponding to increased numbers of CD16⁺ DCs and monocytes, as well as altered expression of CXC chemokine receptors, in the form of increased CXCR1 expression on monocytes and decreased reactivity for CXCR2 and/or CXCR4 on myeloid and plasmacytoid DCs. In addition, an abnormally high spontaneous ex vivo secretion of inflammatory cytokines by CD16⁺ DCs and monocytes was still detected after 1 year of ART. These abnormalities were especially pronounced in patients with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L, which could be related to the persistence of undetected viral replication and sustained immune activation.

Key Words: dendritic cells, HIV-1, antiretroviral therapy, chemokine receptors, cytokines, immunophenotype

(*J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:405–415)

Highly active antiretroviral therapy (ART) leads to a dramatic decline in the morbidity and mortality rates of HIV-infected patients.^{1,2} In most patients, ART reduces plasma HIV RNA load toward undetectable levels and

partially restores the number and functionality of peripheral blood (PB) circulating CD4⁺ T cells.^{3,4} Nonetheless, ART does not lead to complete HIV eradication and fails to fully restore the immune function in HIV-infected patients with moderately advanced disease.^{5,6} In fact, when ART is discontinued, there is a rapid viral rebound,^{7,8} and low levels of viral replication have been detected in HIV-positive patients on prolonged ART.^{9–11} At present, latently infected resting CD4⁺ memory T lymphocytes are considered to be the most important long-term cellular reservoir for HIV, representing the major barrier to HIV eradication in patients receiving ART^{12–14}; however, other cells such as PB monocytes, CD8⁺ T lymphocytes, and natural killer cells are also capable of producing a replication-competent virus in ART-treated patients.^{10,11,15,16}

Recent studies indicate that dendritic cells (DCs) are also involved in the immunopathogenesis of HIV infection. Accordingly, DCs are susceptible to infection by HIV both in vitro and in vivo,^{17–20} which might contribute in explaining the marked depletion of PB myeloid DCs (mDCs) and plasmacytoid DCs (pDCs) found in HIV-1–positive patients,^{21–25} together with their impaired functionality as regards both cytokine secretion²¹ and their ability to stimulate allogeneic T-cell proliferative responses.²⁰ Moreover, DCs that have captured HIV, either through CD4 and a coreceptor or via DCs-SIGN, are able to migrate to lymph nodes, where they participate in the infection of CD4⁺ T lymphocytes.^{26,27} Given the central role of DCs in the activation of innate and adaptive immune responses, abnormalities in their distribution and functionality could be partially responsible for the impaired T-cell functionality observed in HIV infection. Despite this, few studies have investigated, so far, the effects of ART on mDCs and pDCs from HIV-positive patients. Pacanowski et al²³ have shown a partial recovery of the number of PB mDCs and pDCs, which remains below normal levels even 12 months after therapy was initiated. In contrast, Chehimi et al²⁴ found normal numbers of mDCs and an altered number and functionality of pDCs after ART, and Barron et al²⁵ reported an increase of PB pDCs after 6 months of ART associated with stable numbers of mDCs, similar to those detected before therapy. Definitively, the role of ART on the recovery of both the number and functionality of different subsets of PB DCs remains controversial and requires further investigation.

Here we analyzed the effect of ART on the numerical distribution, the expression of chemokine receptors, and the ability to secrete inflammatory cytokines of PB DCs and

Received for publication July 18, 2005; accepted December 13, 2005.

From the *Servicio General de Citometría and Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca, †Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, and ‡Sección de Medicina Interna-Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca, Salamanca, Spain.

M.A. is a recipient of a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia (Madrid, Spain) (Ref. AP2000-3818).

Reprints: Prof Alberto Orfao, Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer, Avda. Universidad de Coimbra s/n, 37007 Salamanca, Spain.

Copyright © 2006 by Lippincott Williams & Wilkins

monocytes from chronically infected HIV-1-positive patients who had not received ART before this study. Our results show an incomplete immune reconstitution of the PB DCs and monocytic compartments associated with persisting numerical, phenotypic, and functional abnormalities even 1 year after starting ART.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

PB samples from 30 asymptomatic antiretroviral I HIV-1-positive patients at different disease stages were studied. Subjects were stratified before therapy (time 0) as (1) cases with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L (n = 19; 63%) and (2) patients with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L (n = 11; 37%). The demographic, clinical, and immunologic characteristics of both groups of HIV-1-positive patients are shown in Table 1. In addition, 10 age- and sex-matched adult healthy volunteers (AHVs) were included as controls.

Patients were tested before therapy (day 0) and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART, with 2 nucleoside reverse transcriptase inhibitors plus either efavirenz or ritonavir-potentiated indinavir (Table 1). EDTA- and heparin-anticoagulated PB samples were collected for immunophe-

notypical and functional studies, respectively. Samples were obtained after acquiring informed consent according to the guidelines of the ethical committee of the University Hospital (Salamanca, Spain).

Quantification of PB T lymphocytes, Monocytes, and DCs

EDTA-anticoagulated PB samples were stained with 4-color combinations of monoclonal antibodies (MAb), using a direct immunofluorescence stain-and-lyse, nonwash, single-platform flow cytometry technique previously described in detail.²⁸ For the identification and enumeration of T-cell subsets, PB samples were stained with CD3-fluorescein isothiocyanate (clone UCHT1, Becton Dickinson Biosciences [BDB], San Jose, CA), CD8-phycoerythrin-cyanine 5 (clone B9.11, Immunotech, Marseille, France), and CD4-allophycocyanine (clone SK3, BDB). In parallel, PB samples were stained with the Dendritic Cell Exclusion Kit (which includes fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-CD3, CD14, CD19, and CD56 MAb; Cytognos, Salamanca, Spain), CD16-phycoerythrin (clone 3G8, Immunotech), anti-HLA-DR-peridinin chlorophyll protein (clone L243, BDB), and CD33-allophycocyanine (clone LeuM9, BDB) for the identification and enumeration of PB monocytes and DC subsets. Before data acquisition, 100 μ L of premixed Perfect-COUNT beads (Cytognos) was added; after having been gently mixed, samples were run in a FACSCalibur flow cytometer (BDB). Information was collected for DCs 10³ or more and lymphocytes 10⁴ or more and analyzed with the Paint-A-Gate PRO software program (BDB).

Analysis of the Expression of Chemokine Receptors on PB Monocytes and DCs

Expression of the CXCR1, CXCR2, CXCR4, and CCR5 chemokine receptors on PB monocytes and DCs was analyzed by 4-color direct immunofluorescence as previously described.²¹ The source and specificities of the MAb reagents used have been previously described.²¹ In addition, a tube stained with a phycoerythrin (PE)-conjugated, isotype-matched, nonspecific mouse immunoglobulin, instead of the anti-chemokine receptor reagent, was used as negative control. For each chemokine receptor analyzed, the intensity of expression was quantitatively evaluated as the mean fluorescence intensity (MFI) value obtained after subtracting the MFI of the corresponding isotype-matched negative control, expressed as arbitrary relative linear fluorescence units scaled from 0 to 10⁴.

Ex Vivo Analysis of Spontaneous Production of Inflammatory Cytokines by PB Monocytes and DCs

Ex vivo secretion of inflammatory cytokines by PB monocytes and DCs in the absence of any exogenous stimuli was analyzed at the single-cell level using a well-established technique that combines 4-color stainings for the specific identification of monocytes and DCs with the measurement of intracellular cytokine production.^{29,30} Heparin-anticoagulated PB samples were used to analyze the spontaneous secretion of interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-12, tumor

TABLE 1. Demographic, Clinical, and Immunologic Characteristics of HIV-1-Infected Patients Before ART

	CD4 ⁺ T-Cell Counts in PB (Cells/ μ L)	
	<200 (n = 19)	>200 (n = 11)
Age (y)	42 \pm 11 (26–63)	35 \pm 6 (27–48)
Sex (male/female)	15/4	6/5
No. copies of plasma HIV-1 RNA/mL	142,829 \pm 189,498 (8100–820,000)	45,942 \pm 49,467 (360–130,000)
No. CD4 ⁺ T cells/ μ L	74 \pm 57 (4–176)	316 \pm 202 (210–881)
No. CD8 ⁺ T cells/ μ L	822 \pm 714 (65–3244)	1026 \pm 352 (495–1643)
Duration of infection (y)	4 \pm 5 (0–15)	5 \pm 5 (0–12)
Clinical stage (% of patients)		
A2	0	20
A3	24	10
B2	0	30
B3	29	20
C3	47	20
Type of ART (% of patients)		
3TC/d4T/EFV	7	11
ddI/d4T/EFV	45	45
AZT/d4T/RTV/IDV	7	0
AZT/3TC/RTV/IDV	7	0
3TC/d4T/RTV/IDV	13	0
ddI/d4T/RTV/IDV	7	11
ddI/TDF/EFV	7	22
ddI/3TC/EFV	7	0
AZT/ddI/EFV	0	11

Age, viral load, and CD4⁺ and CD8⁺ T-cell counts and duration of HIV-1 infection are expressed as mean \pm 1 SD and range in parentheses.

3TC indicates lamivudine; d4T, estavudine; EFV, efavirenz; ddI, didanosine; AZT, zidovudine; RTV, ritonavir; IDV, indinavir; TDF, tenofovir.

necrosis factor (TNF)- α , and IL-8 by PB monocytes and DCs as previously described in detail.²¹ An isotype-matched, PE-conjugated mouse immunoglobulin was used as negative control. Stained cells were measured in a FACSCalibur flow cytometer as described above. For the evaluation of cytokine production, both the percentage of positive cells within each cell subset and their MFI (after subtracting the MFI obtained for the corresponding isotype-matched negative control) were calculated as previously described.²⁹

HIV-1 Viral Load

Plasmatic HIV-1 RNA load was measured using the Roche Amplicor PCR kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Results were expressed as the number of viral RNA copies per milliliter with a sensitivity of 50 copies/mL.

Statistical Analyses

Mean values and SDs, as well as median, range, 25th and 75th percentiles, and 95% confidence intervals, were calculated for each variable under study using the SPSS

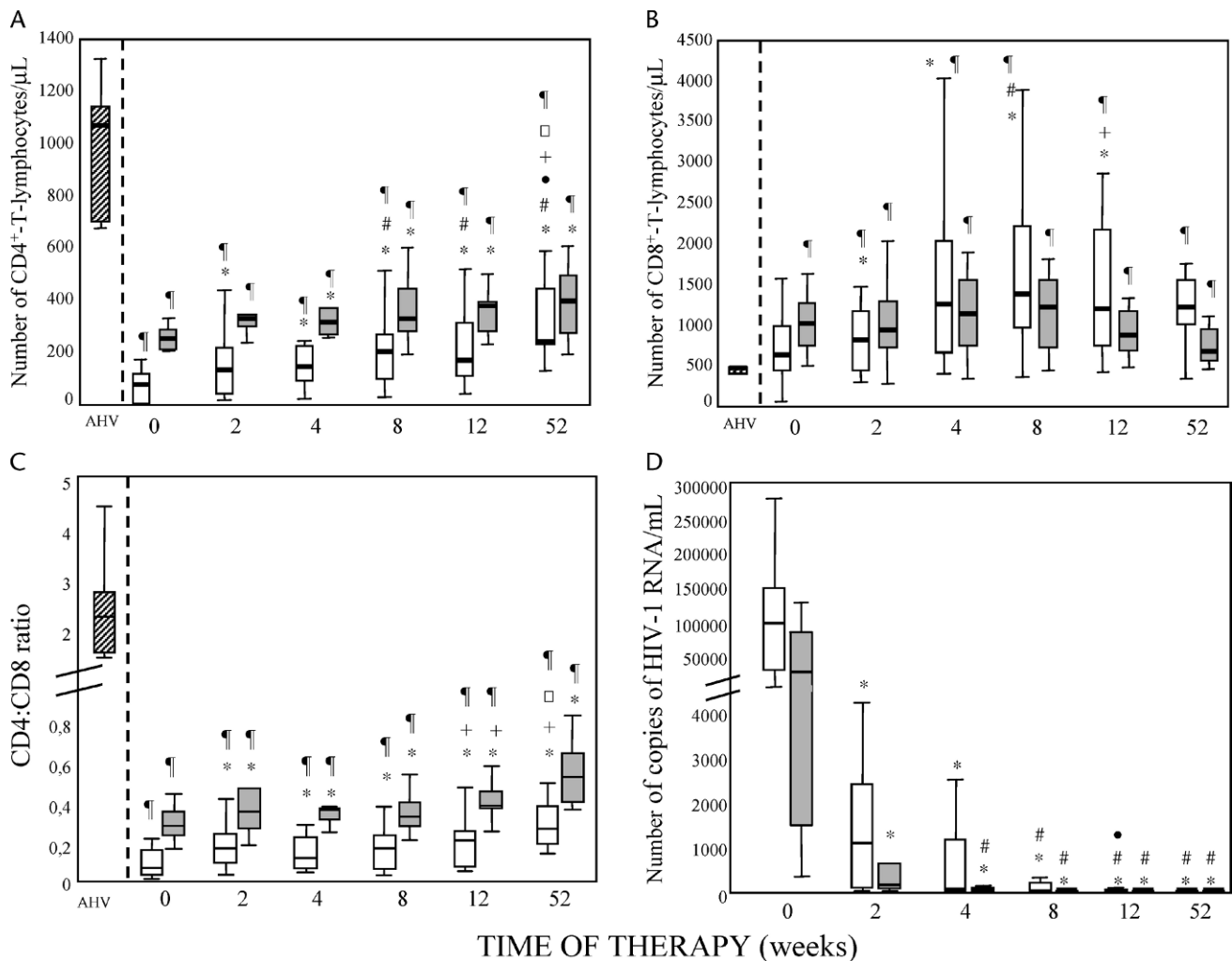


FIGURE 1. Distribution of PB T-cell subsets and HIV-1 RNA viral load in HIV-1-positive individuals before therapy (time 0) and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART, grouped according to the absolute number of PB CD4⁺ T cells. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. Hatched boxes correspond to AHVs. White and gray boxes represent HIV-1-positive patients with extremely low (<200 CD4⁺ T cells/ μ L) and low (>200 CD4⁺ T cells/ μ L) PB CD4⁺ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively. Panels A and B represent the absolute number of PB CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, respectively; panel C shows the CD4/CD8 ratio, and panel D represents HIV-1 plasma viral load. ¶: $P \leq 0.05$ vs AHVs; *: $P \leq 0.05$ vs time 0; #: $P \leq 0.05$ vs week +2 of ART; •: $P \leq 0.05$ vs week +4 of ART; +: $P \leq 0.05$ vs week +8 of ART; □: $P \leq 0.05$ vs week +12 of ART.

TABLE 2. Statistical Calculations

	Groups of Subjects and Time Points Compared (wk)	
	<200 CD4 ⁺ HIV-1-Positive Patients	>200 CD4 ⁺ HIV-1-Positive Patients
No. PB CD4 ⁺ T cells	0 vs AHVs ($P < 0.001$); +2 vs AHVs ($P < 0.001$); +2 vs wk 0 ($P = 0.001$); +4 vs AHVs ($P < 0.001$); +4 vs 0 ($P = 0.001$); +8 vs AHVs ($P < 0.001$); +8 vs 0 ($P < 0.001$); +8 vs +2 ($P = 0.02$); +12 vs AHVs ($P < 0.001$); +12 vs 0 ($P = 0.001$); +12 vs +2 ($P = 0.02$); +52 vs AHVs ($P < 0.001$); +52 vs 0 ($P = 0.01$); +52 vs +2 ($P = 0.03$); +52 vs +4 ($P = 0.03$); +52 vs +8 ($P = 0.02$); +52 vs +12 ($P = 0.03$)	0 vs AHVs ($P = 0.001$); +2 vs AHVs ($P = 0.001$); +4 vs AHVs ($P < 0.001$); +4 vs 0 ($P = 0.01$); +8 vs AHVs ($P = 0.001$); +8 vs wk 0 ($P = 0.02$); +12 vs AHVs ($P = 0.001$); +12 vs wk 0 ($P = 0.02$); +52 vs AHVs ($P = 0.001$); +52 vs wk 0 ($P = 0.02$)
No. PB CD8 ⁺ T cells	+2 vs AHVs ($P = 0.04$); +2 vs 0 ($P = 0.02$); +4 vs AHVs ($P = 0.01$); +4 vs 0 ($P = 0.002$); +8 vs AHVs ($P < 0.001$); +8 vs 0 ($P = 0.001$); +8 vs +2 ($P = 0.02$); +12 vs AHVs ($P = 0.001$); +12 vs 0 ($P = 0.01$); +12 vs +8 ($P = 0.03$); +52 vs AHVs ($P = 0.003$)	0 vs AHVs ($P = 0.002$); +2 vs AHVs ($P = 0.02$); +4 vs AHVs ($P = 0.01$); +8 vs AHVs ($P = 0.01$); +12 vs AHVs ($P = 0.01$); +52 vs AHVs ($P = 0.05$)
CD4/CD8 ratio	0 vs AHVs ($P < 0.001$); +2 vs AHVs ($P < 0.001$); +2 vs 0 ($P = 0.002$); +4 vs AHVs ($P < 0.001$); +4 vs wk 0 ($P = 0.01$); +8 vs AHVs ($P < 0.001$); +8 vs 0 ($P = 0.002$); +12 vs AHVs ($P < 0.001$); +12 vs 0 ($P = 0.001$); +12 vs +8 ($P = 0.01$); +52 vs AHVs ($P < 0.001$); +52 vs 0 ($P = 0.01$); +52 vs +8 ($P = 0.01$); +52 vs +12 ($P = 0.02$)	0 vs AHVs ($P < 0.001$); +2 vs AHVs ($P < 0.001$); +2 vs 0 ($P = 0.04$); +4 vs AHVs ($P < 0.001$); +4 vs wk 0 ($P = 0.01$); +8 vs AHVs ($P = 0.001$); +8 vs 0 ($P = 0.01$); +12 vs AHVs ($P = 0.001$); +12 vs 0 ($P = 0.02$); +12 vs +8 ($P = 0.02$); +52 vs AHVs ($P = 0.001$); +52 vs 0 ($P = 0.05$)
No. copies of HIV-1 RNA/mL	+2 vs 0 ($P = 0.001$); +4 vs 0 ($P = 0.002$); +8 vs 0 ($P = 0.001$); +8 vs +2 ($P = 0.003$); +12 vs 0 ($P = 0.001$); +12 vs +2 ($P = 0.003$); +12 vs +4 ($P = 0.03$); +52 vs 0 ($P = 0.01$); +52 vs +2 ($P = 0.03$)	+2 vs 0 ($P = 0.02$); +4 vs 0 ($P = 0.01$); +4 vs +2 ($P = 0.04$); +8 vs 0 ($P = 0.02$); +8 vs +2 ($P = 0.04$); +12 vs 0 ($P = 0.02$); +12 vs +2 ($P = 0.04$); +12 vs +4 ($P = 0.04$); +52 vs 0 ($P = 0.04$); +52 vs +2 ($P = 0.03$)
No. PB monocytes/ μ L	+2 vs 0 ($P = 0.05$); +8 vs 0 ($P = 0.04$); +52 vs AHVs ($P = 0.002$)	+4 vs 0 ($P = 0.02$); +12 vs +4 ($P = 0.04$); +52 vs +4 ($P = 0.04$)
No. PB total DCs/ μ L	+52 vs AHVs ($P < 0.001$); +52 vs 0 ($P = 0.02$); +52 vs +2 ($P = 0.02$); +52 vs +4 ($P = 0.02$); +52 vs +8 ($P = 0.03$); +52 vs +12 ($P = 0.02$)	+12 vs AHVs ($P = 0.04$)
No. PB mDCs/ μ L	0 vs AHVs ($P = 0.01$); +4 vs 0 ($P = 0.003$); +12 vs 0 ($P = 0.04$); +52 vs 0 ($P = 0.05$)	0 vs AHVs ($P = 0.05$)
No. PB CD16 ⁺ DCs/ μ L	+52 vs AHVs ($P < 0.001$); +52 vs 0 ($P = 0.04$); +52 vs +2 ($P = 0.02$); +52 vs +4 ($P = 0.02$); +52 vs +8 ($P = 0.03$)	
No. PB pDCs/ μ L	0 vs AHVs ($P = 0.002$); +2 vs AHVs ($P = 0.004$); +4 vs AHVs ($P = 0.001$); +8 vs AHVs ($P = 0.002$); +12 vs AHVs ($P = 0.001$); +52 vs 0 ($P = 0.03$); +52 vs +8 ($P = 0.05$)	0 vs AHVs ($P = 0.02$); +2 vs AHVs ($P = 0.002$); +4 vs AHVs ($P = 0.01$); +8 vs AHVs ($P = 0.001$); +12 vs AHVs ($P = 0.002$)
% Of CXCR1 ⁺ monocytes	+52 vs AHVs ($P = 0.03$); +52 vs +2 ($P = 0.03$); +52 vs +4 ($P = 0.01$); +52 vs +8 ($P = 0.01$); +52 vs +12 ($P = 0.01$);	+8 vs 0 ($P = 0.05$); +12 vs +8 ($P = 0.04$)
% Of CXCR2 ⁺ monocytes	+52 vs +2 ($P = 0.02$); +52 vs +4 ($P = 0.02$); +52 vs +8 ($P = 0.03$)	
% Of CXCR2 ⁺ mDCs	0 vs AHVs ($P = 0.02$)	0 vs AHVs ($P = 0.05$)
% Of CXCR4 ⁺ mDCs	0 vs AHVs ($P = 0.03$); +8 vs AHVs ($P = 0.03$); +12 vs AHVs ($P = 0.02$); +12 vs +2 ($P = 0.02$); +52 vs AHVs ($P = 0.02$)	0 vs AHVs ($P = 0.05$); +8 vs AHVs ($P = 0.01$); +12 vs AHVs ($P = 0.01$); +52 vs AHVs ($P = 0.004$)
% Of CXCR4 ⁺ CD16 ⁺ DCs	+52 vs 0 ($P = 0.02$)	
% Of CXCR4 ⁺ pDCs	0 vs AHVs ($P = 0.001$); +2 vs AHVs ($P = 0.003$); +4 vs AHVs ($P = 0.01$); +8 vs AHVs ($P = 0.01$); +12 vs AHVs ($P = 0.003$); +12 vs +8 ($P = 0.03$); +52 vs +8 ($P = 0.05$)	0 vs AHVs ($P = 0.002$); +2 vs AHVs ($P = 0.01$); +4 vs AHVs ($P = 0.01$); +4 vs 0 ($P = 0.04$); +8 vs AHVs ($P = 0.01$); +12 vs AHVs ($P = 0.02$)
MFI of CCR5 ⁺ mDCs	+2 vs AHVs ($P = 0.04$); +2 vs 0 ($P = 0.02$); +4 vs AHVs ($P = 0.02$); +4 vs 0 ($P = 0.01$); +8 vs AHVs ($P = 0.02$); +8 vs 0 ($P = 0.02$); +12 vs AHVs ($P = 0.02$); +12 vs 0 ($P = 0.01$); +52 vs +12 ($P = 0.04$)	+8 vs AHVs ($P = 0.02$); +12 vs +8 ($P = 0.04$)
% Of CCR5 ⁺ pDCs	0 vs AHVs ($P = 0.02$); +2 vs AHVs ($P = 0.03$); +4 vs AHVs ($P = 0.03$); +8 vs AHVs ($P = 0.03$); +12 vs 0 ($P = 0.05$); +12 vs +2 ($P = 0.02$); +12 vs +4 ($P = 0.04$); +12 vs +8 ($P = 0.05$); +52 vs 0 ($P = 0.04$); +52 vs +2 ($P = 0.02$); +52 vs +4 ($P = 0.02$); +52 vs +8 ($P = 0.02$); +52 vs +12 ($P = 0.04$)	

TABLE 2. (Continued) Statistical Calculations

	Groups of Subjects and Time Points Compared (wk)	
	<200 CD4 ⁺ HIV-1-Positive Patients	>200 CD4 ⁺ HIV-1-Positive Patients
% Of IL-6 ⁺ monocytes	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.002); +2 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03); +4 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03); +8 vs AHVs (<i>P</i> = 0.004); +52 vs 0 (<i>P</i> = 0.05); +52 vs +8 (<i>P</i> = 0.03)	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.05); +4 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03)
% Of IL-6 ⁺ mDCs	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.05)	
% Of IL-6 ⁺ CD16 ⁺ DCs	0 vs AHVs (<i>P</i> < 0.001); +2 vs AHVs (<i>P</i> = 0.01); +4 vs AHVs (<i>P</i> = 0.001); +4 vs 0 (<i>P</i> = 0.05); +8 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03); +12 vs AHVs (<i>P</i> = 0.02); +52 vs AHVs (<i>P</i> = 0.04); +52 vs 0 (<i>P</i> = 0.05); +52 vs +2 (<i>P</i> = 0.05)	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.01); +4 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03); +8 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03); +52 vs wk 0 (<i>P</i> = 0.05)
% Of IL-6 ⁺ pDCs		0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.05); +8 vs AHVs (<i>P</i> = 0.05)
% Of TNF-α ⁺ monocytes	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.01); +4 vs AHVs (<i>P</i> = 0.02); +52 vs 0 (<i>P</i> = 0.03); +52 vs +4 (<i>P</i> = 0.04); +52 vs +12 (<i>P</i> = 0.04)	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.05); +2 vs 0 (<i>P</i> = 0.04)
% Of TNF-α ⁺ CD16 ⁺ DCs	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.02); +2 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03); +4 vs AHVs (<i>P</i> = 0.01); +8 vs AHVs (<i>P</i> = 0.01); +12 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03)	0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.01); +2 vs AHVs (<i>P</i> = 0.02); +2 vs 0 (<i>P</i> = 0.05); +4 vs 0 (<i>P</i> = 0.03); +8 vs 0 (<i>P</i> = 0.02)
% Of TNF-α ⁺ pDCs		+8 vs AHVs (<i>P</i> = 0.05)
% Of IL-1β ⁺ CD16 ⁺ DCs		0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.04)
% Of IL-8 ⁺ CD16 ⁺ DCs	+2 vs 0 (<i>P</i> = 0.04); +8 vs +2 (<i>P</i> = 0.04); +12 vs +2 (<i>P</i> = 0.04)	
% Of IL-12 ⁺ pDCs		0 vs AHVs (<i>P</i> = 0.03)

The Mann-Whitney *U* and Wilcoxon signed rank nonparametric tests—for unpaired and paired samples, respectively—were used for the evaluation of the statistical significance of the differences observed between groups of individuals. *P* values 0.05 or less were considered to be associated with statistical significance.

software (SPSS 10.0, Chicago, IL). For the evaluation of the statistical significance of the differences observed between groups of individuals, the Mann-Whitney *U* and Wilcoxon signed rank nonparametric tests for unpaired and paired samples were used, respectively. The association between variables was explored using the Spearman correlation coefficient. *P* values 0.05 or less were considered to be associated with statistical significance.

RESULTS

Effect of ART on the Distribution of PB T-Cell Subsets and Plasma HIV-1 RNA Load

After ART, the absolute number of CD4⁺ T lymphocytes progressively increased over time in HIV-1-positive patients with low (>200 CD4⁺ T cells/μL) and extremely low (<200 CD4⁺ T cells/μL) CD4⁺ T-cell counts, this increase being already significant at week +2 of therapy for the latter group (*P* = 0.001). Despite this, ART was unable to normalize the absolute number of CD4⁺ T cells even after 1 year of therapy (*P* ≤ 0.001; Fig. 1A). Regarding CD8⁺ T cells, ART induced a rapid and significant increase in their absolute numbers in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/μL, remaining significantly increased after 1 year of ART when compared with AHVs (*P* = 0.003; Fig. 1B). In the group with more than 200 CD4⁺ T cells/μL, CD8⁺ T lymphocytes were also increased at week +52 as compared with AHVs (*P* = 0.05; Fig. 1B) but at significantly lower numbers than those of the HIV-1-positive patients with less than 200 CD4⁺ T cells/μL (*P* = 0.02). Altogether, these changes following therapy led

to a uniformly higher PB CD4/CD8 T-cell ratio in both groups of patients (Fig. 1C), which still remained below normal levels at week +52 (*P* ≤ 0.001).

As expected, a significant reduction (*P* ≤ 0.02) in HIV-1 RNA load was observed at week +2 of ART in both patient groups, becoming undetectable from week +8 in all the cases with more than 200 CD4⁺ T cells/μL and from week +12 in all but one case for the group with less than 200 CD4⁺ T cells/μL (Fig. 1D).

The actual *P* values for those differences reaching statistical significance are shown in Table 2.

Effect of ART on the Distribution of PB Monocytes and DCs

Overall, both groups of HIV-1-positive patients showed a normal distribution of monocytes and total DCs in PB before ART; however, after 1 year of therapy, both cell populations were significantly increased in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/μL (*P* ≤ 0.002), but not in patients with more than 200 CD4⁺ T cells/μL, as compared with AHVs (Figs. 2A and B). A more detailed analysis of the different DC subsets showed marked abnormalities; accordingly, mDCs and pDCs were severely decreased before therapy in both groups of patients (*P* < 0.05). After ART, the number of mDCs and pDCs normalized in both groups of patients, although the restoration in pDC counts was only achieved by week +52 of ART (*P* = 0.03 vs basal numbers; Figs. 2C and E). Although the number of PB CD16⁺ DCs was within the normal range in both groups of patients before therapy, a marked increase of this DC

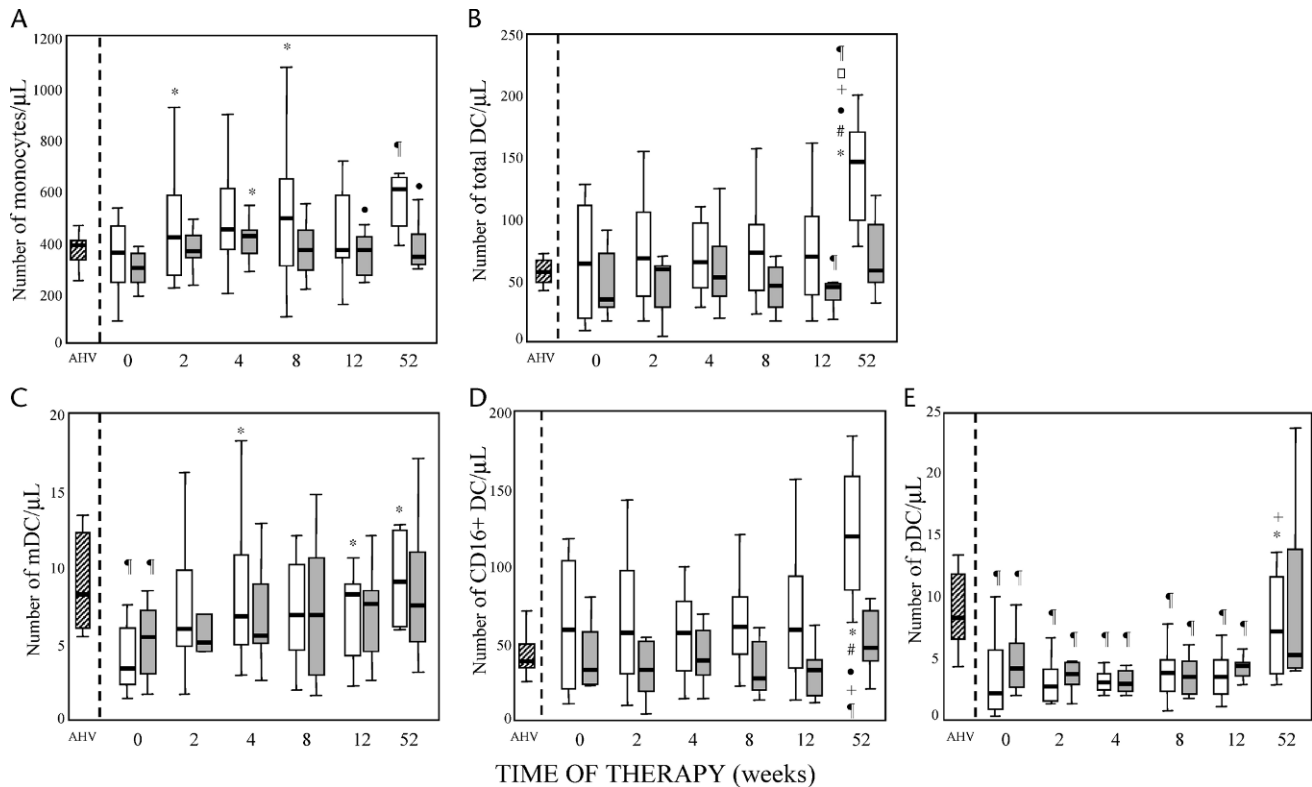


FIGURE 2. Distribution of PB monocytes and DC subsets from AHVs and HIV-1–positive individuals before therapy (time 0) and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART, grouped according to the absolute number of PB CD4⁺ T cells. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. Hatched boxes correspond to AHVs. White and gray boxes represent HIV-1–positive patients with extremely low (<200 CD4⁺ T cells/ μ L) and low (>200 CD4⁺ T cells/ μ L) PB CD4⁺ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively. Panels A and B represent the absolute number of PB myeloid DCs, CD16⁺ DCs, and plasmacytoid DCs, respectively. ¶: $P \leq 0.05$ vs AHVs; *: $P \leq 0.05$ vs time 0; #: $P \leq 0.05$ vs week +2 of ART; •: $P \leq 0.05$ vs week +4 of ART; +: $P \leq 0.05$ vs week +8 of ART; □: $P \leq 0.05$ vs week +12 of ART.

subset in PB was observed at week +52 in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L ($P < 0.05$; Fig. 2D), contributing to the overall increased number of total DCs observed for these patients at week +52 (Table 2 shows the actual P values for those differences reaching statistical significance).

ART-induced Changes on the Expression of Chemokine Receptors on PB Monocytes and DCs

The CXCR1 and/or CXCR2 IL-8 chemokine receptors were exclusively expressed by PB monocytes and mDCs. Before ART, the percentage of CXCR1⁺ and CXCR2⁺ monocytes was slightly reduced in both groups of HIV-1–positive patients ($P > 0.05$). After therapy, a marked increase in the percentage of both CXCR1⁺ and CXCR2⁺ monocytes was observed at week +52 in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L ($P \leq 0.03$ vs week +2), with no significant changes for the patients with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L (Figs. 3A and B). In turn, the proportion of CXCR2⁺ mDCs before therapy was significantly decreased in

both groups of HIV-1–positive individuals ($P \leq 0.05$). Although ART induced a slight increase in the percentage of CXCR2⁺ mDCs, particularly in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L, it constantly remained below normal levels in both patient groups during the whole follow-up period (Fig. 3C).

A variable percentage of PB monocytes and DCs from all individuals studied expressed CXCR4 (Figs. 3D–G). The proportion of both CXCR4⁺ CD16⁺ DCs and monocytes was similar to that of AHVs and remained stable during ART (Figs. 3D and F); by contrast, a significant reduction in the percentage of CXCR4⁺ mDCs ($P < 0.05$) and CXCR4⁺ pDCs ($P \leq 0.002$) was observed before therapy (Figs. 3E and G). Although a partial recovery of CXCR4 expression on pDCs was observed after 1 year of ART, the percentage of CXCR4⁺ mDCs remained constantly reduced with respect to AHVs ($P \leq 0.02$).

In all individuals, CCR5 was exclusively expressed by PB mDCs and pDCs (Figs. 3H and I), all mDCs from AHVs and HIV-1–positive patients being constantly CCR5⁺. Before therapy, the mean amount of CCR5 expressed per mDC in HIV-1–positive individuals was normal (Fig. 3H),

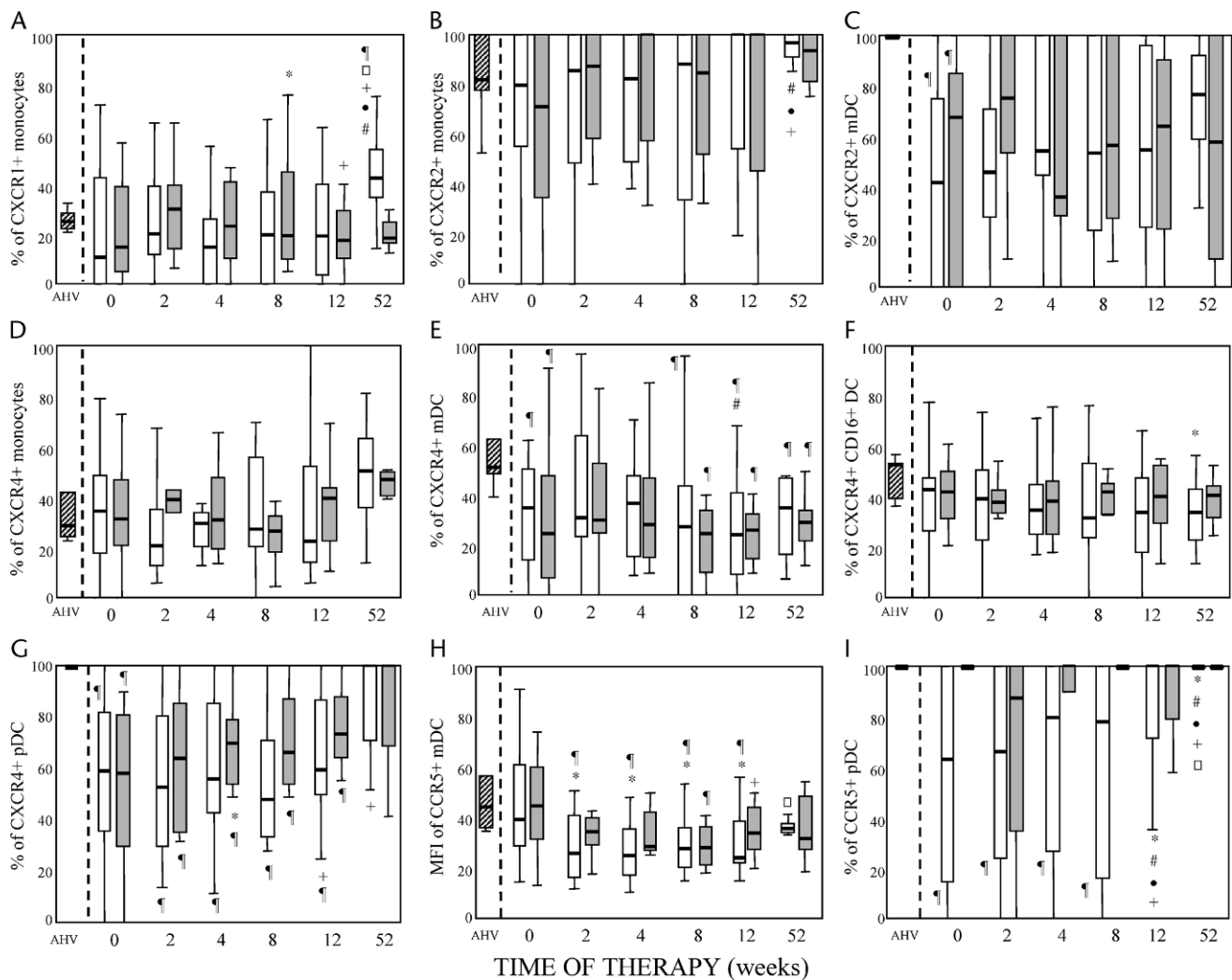


FIGURE 3. Expression of the CXCR1, CXCR2, CXCR4, and CCR5 chemokine receptors by PB monocytes and DC subsets from AHVs and HIV-1-positive individuals before therapy (time 0) and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART, grouped according to the absolute number of PB CD4+ T cells. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. Hatched boxes correspond to AHVs. White and gray boxes represent HIV-1-positive patients with extremely low (<200 CD4+ T cells/μL) and low (>200 CD4+ T cells/μL) PB CD4+ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively. Panels A, B, and D show the percentage of CXCR1+, CXCR2+, and CXCR4+ monocytes, respectively. Panels C and E display the percentage of CXCR1+ and CXCR2+ myeloid DCs, respectively. In panel H, the mean amount of CCR5 expressed per myeloid DC (MFI) is shown, and panel F represents the percentage of CXCR4+ CD16+ DCs. Panels G and I display the percentage of CXCR4+ and CCR5+ plasmacytoid DCs, respectively. In all groups of individuals studied, CD16+ DCs and plasmacytoid DCs were constantly negative for both CXCR1 and CXCR2, whereas CCR5 was constantly absent on monocytes and CD16+ DCs. ¶: $P \leq 0.05$ vs AHVs; *: $P \leq 0.05$ vs time 0; #: $P \leq 0.05$ vs week +2 of ART; +: $P \leq 0.05$ vs week +4 of ART; *: $P \leq 0.05$ vs week +8 of ART; □: $P \leq 0.05$ vs week +12 of ART.

whereas it was significantly reduced among pDCs from the group with less than 200 CD4+ T cells/μL ($P = 0.02$; Fig. 3I). From week +2, ART induced a complete normalization of CCR5 expression on pDCs (Fig. 3I), together with a significant transient drop ($P < 0.05$) in the amount of CCR5 expressed per mDC, particularly within the group with less than 200 CD4+ T cells/μL, which was recovered at week +52 (Fig. 3H).

The actual P values for those differences reaching statistical significance are shown in Table 2.

Effect of ART on Spontaneous Ex Vivo Secretion of Inflammatory Cytokines by PB Monocytes and DCs

PB monocytes and DCs from AHVs showed no spontaneous ex vivo secretion of inflammatory cytokines. By

contrast, PB monocytes and DCs from HIV-1-positive individuals showed different patterns of spontaneous ex vivo production of inflammatory cytokines, varying according to cell type, patient group, and time of analysis (Fig. 4 and Table 2). Before ART, PB monocytes and CD16⁺ DCs from both groups of HIV-1-positive patients showed a significant spontaneous secretion of IL-6 and TNF- α ($P \leq 0.05$; Figs. 4A, E, C, and G). In addition, at this time point, CD16⁺ DCs from the group with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L also secreted significant amounts of IL-1 β ($P = 0.04$; Fig. 4K). After starting ART,

spontaneous production of IL-6 and TNF- α by PB monocytes and CD16⁺ DCs progressively decreased in both groups; however, significant spontaneous secretion of IL-6 by CD16⁺ DCs was still detected in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L 1 year after starting ART ($P = 0.03$; Fig. 4C). Although spontaneous production of IL-6 by mDCs was totally absent in the group with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L at time 0, mDCs from the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L produced significant amounts of this cytokine ($P = 0.05$), which dropped to undetectable levels after ART (Fig. 4B).

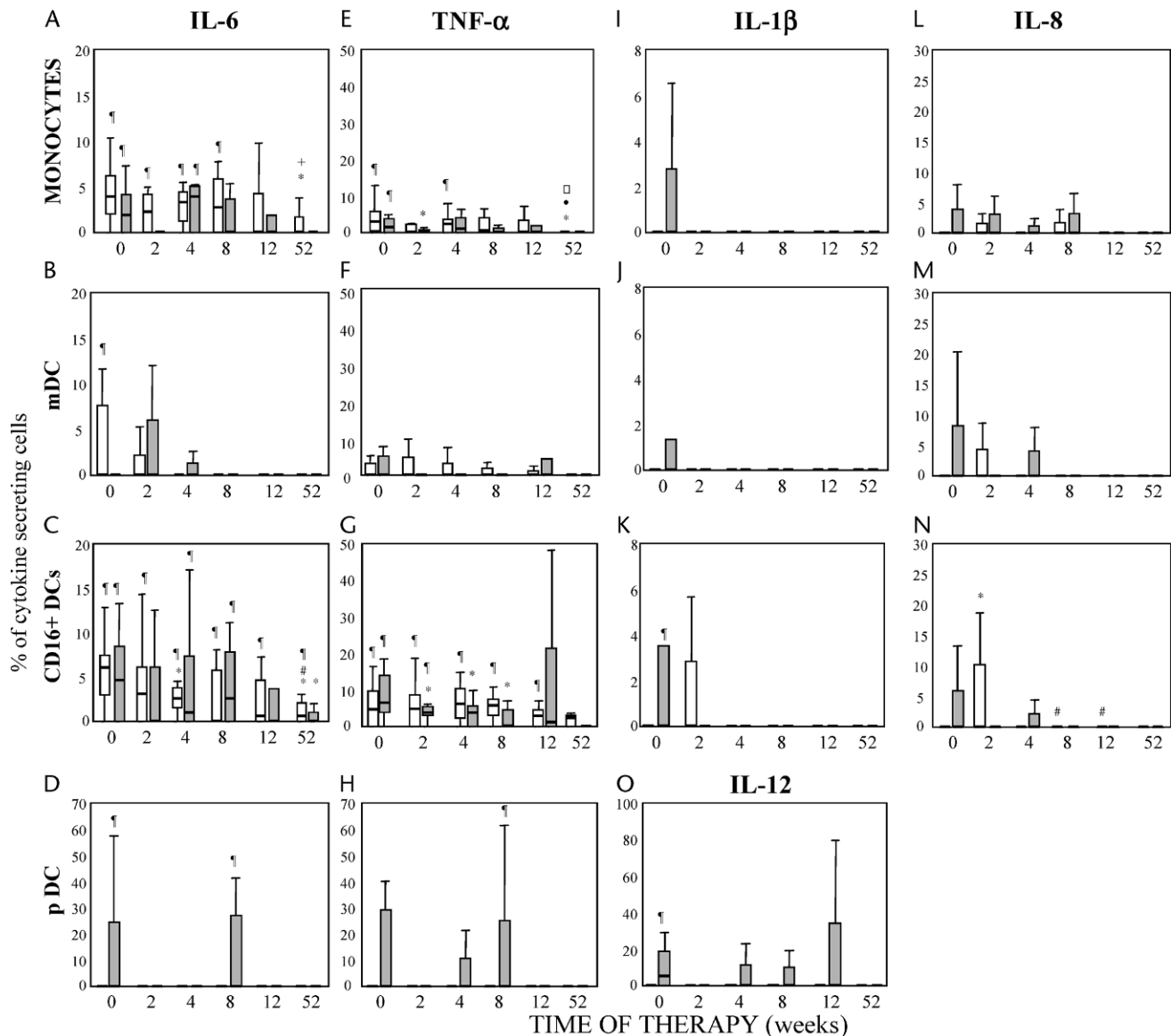


FIGURE 4. Spontaneous ex vivo secretion of the IL-6 (panels A to D), TNF- α (panels E to H), IL-1 β (panels I to K), IL-8 (panels L to N), and IL-12 (panel O) inflammatory cytokines by PB monocytes and DC subsets from HIV-1-positive individuals, grouped according to the absolute number of PB CD4⁺ T cells. Notched boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. White and gray boxes represent HIV-1-positive patients with extremely low (<200 CD4⁺ T cells/ μ L) and low (>200 CD4⁺ T cells/ μ L) PB CD4⁺ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively. ¶: $P \leq 0.05$ vs AHVs; *: $P \leq 0.05$ vs time 0; #: $P \leq 0.05$ vs week +2 of ART; •: $P \leq 0.05$ vs week +4 of ART; +: $P \leq 0.05$ vs week +8 of ART; □: $P \leq 0.05$ vs week +12 of ART.

Interestingly, transient secretion of IL-8 ($P = 0.04$) and IL-1 β ($P = 0.08$) by CD16⁺ DCs from the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L and of IL-6 ($P > 0.05$) by mDCs from the group with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L was observed at week +2 and at weeks +2 and +4 of ART, respectively (Figs. 4B, K, and N), disappearing thereafter.

Although pDCs from the group with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L showed a significantly increased production of IL-6 ($P = 0.05$) and IL-12 ($P = 0.03$) at time 0 and of IL-6 ($P = 0.05$) and TNF- α ($P = 0.05$) at week +8, ART was able to completely abrogate spontaneous production of IL-6 and TNF- α by pDCs from week +8 and of IL-12 from week +12 in this group of HIV-1-positive patients (Figs. 4D, H, and O).

DISCUSSION

ART has proven to be highly effective on decreasing viral load and inducing a significant recovery of CD4⁺ T cells in HIV-1-positive individuals,^{3,4} as also found in the present study. Despite this, a limited long-term reconstitution of PB CD4⁺ T cells was observed, according to previous reports, in which HIV-1-positive patients at advanced disease stages were studied.^{5,32,33} In addition, high levels of CD8⁺ T lymphocytes were detected before ART, and they did not normalize after 1 year of therapy, even increasing over initial numbers. Despite its beneficial effects, it is well established that ART is unable to eradicate HIV-1, as viral replication is still detected in patients receiving therapy.⁹⁻¹¹ The persistence of abnormally low CD4⁺ T-cell counts and high CD8⁺ T-cell counts in HIV-1-positive patients might reflect ongoing low-grade viral replication, persistence of the virus, and anti-HIV-1 cytotoxic immune responses; alternatively, it could simply represent the continuous disturbance of T-cell homeostasis characteristic of HIV-1 infection. Of note, the abnormalities in the distribution of both T-cell subsets were more pronounced in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L, supporting the notion that a better immune reconstitution can be achieved when ART is initiated at earlier stages of infection.³⁴⁻³⁷

Increasing evidences support the notion that DCs may play an important role in HIV-1 infection either because they are infected by HIV-1 or because of their impaired ability to stimulate antigen-specific T cells.¹⁷⁻²⁰ However, few studies have investigated the effect of ART on the number and functionality of PB DCs in HIV-1-positive patients^{23-25,31} and their potential role on the defective ART-induced immune recovery. As previously reported,²¹ before therapy, both groups of HIV-1-positive individuals showed significant abnormalities in the number, phenotype, and functionality of circulating PB DCs. Interestingly, these alterations varied between the different subsets of DCs. Accordingly, whereas PB mDCs and pDCs were severely decreased and showed abnormally low expression of CXCR2/CXCR4 and CXCR4/CCR5 chemokine receptors, respectively, no numerical and phenotypic alterations were detected for PB CD16⁺ DCs and monocytes. Whether the decreased mDC and pDC counts in HIV-1-positive individuals is a consequence of an increased DC death or sequestering to lymph nodes, where active viral replication is occurring, remains unclear. Regardless of this,

our results show a complete normalization of the number and phenotype of PB mDCs and pDCs in both groups of patients after 1 year of ART. Of note, restoration of pDC numbers was a late event as compared with that of mDCs, whose absolute number rapidly normalized in both patient groups. Such different kinetics of DC recovery could reflect distinct mechanisms of depletion from PB during active viremia. In contrast to mDCs and pDCs, before initiating ART, the number of circulating PB CD16⁺ DCs was within the normal range. This could be related to the fact that CD16⁺ DCs show a unique CCR5⁻/DC-SIGN⁺ phenotype, which could prevent them from being infected by both macrophage-tropic and T-cell line-tropic HIV-1 strains because of lack of expression of the CCR5 HIV-1 coreceptor^{38,39} and the high avidity of DC-SIGN for viral gp-120,⁴⁰ which may prevent both gp-120-CD4-CXCR4 interaction and cell infection. After 1 year of ART, the number of PB monocytes and CD16⁺ DCs was significantly increased in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L. Whether this specific increase is due to a direct effect of HIV-1 on both cell subsets, to a general activation of the immune system characteristic of HIV-1 infection, or to a late effect of ART remains to be elucidated. In any case, it should be noted that the specific expansion of CD16⁺ DCs is not exclusive of HIV-1 infection because they have been shown to be also increased in other systemic inflammatory disorders.^{41,42}

Ligand-receptor interaction induces rapid internalization of chemokine receptors and initiation of signaling responses.⁴³⁻⁴⁵ This phenomenon might contribute to explain the reduced expression of chemokine receptors on mDCs and pDCs, reflecting down-modulation after interacting with the corresponding ligand. In addition, the abnormally low CXCR4 expression on mDCs and pDCs before ART could be directly related to HIV-1 infection, as supported by the strong negative correlation observed between HIV-1 RNA load and the percentage of both CXCR4⁺ mDCs ($r^2 = -0.92$; $P < 0.001$) and CXCR4⁺ pDCs ($r^2 = -0.70$; $P = 0.04$) for the group with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L. In turn, the decreased expression of CCR5 on pDCs found in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L could also reflect maturation of DCs as a consequence of their interaction with HIV-1 because maturation of DCs has been associated with down-modulation of CCR5 expression.⁴⁶ ART induced a complete normalization of the levels of CCR5 on pDCs. In line with these results, Giovannetti et al⁴⁷ have shown that the production of the regulated on activation, normal T expressed and secreted (RANTES) and macrophage inflammatory protein (MIP)-1 α CC chemokines decreased after ART, getting closer to normal levels. In contrast, the pattern of expression of the CXC chemokine receptors remained altered even after 1 year of ART, being consistent with an increased expression of CXCR1⁺ and CXCR2⁺ on monocytes from the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L and a decreased reactivity for CXCR2 on mDCs and CXCR4 on mDCs and pDCs in both patient groups. Overall, these findings may be related to the persistence of residual viral replication in lymphoid organs and a sustained recruitment of antigen-presenting cells, including monocytes, to sites of inflammation. Further studies are required to elucidate whether the

altered expression of chemokine receptors represents an irreversible feature of advanced HIV-1 infection or it could be normalized after longer periods of ART with suppression of viremia.

DCs obtained from HIV-1-positive patients or pulsed in vitro with high doses of HIV-1 have been shown to produce inflammatory cytokines when exposed to different stimuli.^{48,49} As previously reported,²¹ PB monocytes and DCs from our HIV-1-positive patients produced detectable amounts of inflammatory cytokines in the absence of exogenous stimulation before starting ART, supporting the existence of an in vivo activation of the immune system in untreated patients. The pattern of secretion of inflammatory cytokines was different in the 2 groups of patients analyzed; we found a more pronounced activation state in the group with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L, particularly as regards pDCs, which might reflect a better ability of the immune system to respond to HIV-1 infection in less immunocompromised patients. After ART, spontaneous production of inflammatory cytokines progressively decreased in both groups of patients, being completely abrogated in the group with more than 200 CD4⁺ T cells/ μ L after 1 year of therapy, indicating that a partial immune reconstitution can be achieved in HIV-1-positive patients receiving ART. However, our results also show that despite the ART-induced suppression of plasmatic viremia to undetectable levels, significant spontaneous secretion of IL-6 by CD16⁺ DCs (and, to a lesser extent, of IL-6 by monocytes and of TNF- α by CD16⁺ DCs) could still be detected even after 1 year of therapy in the group with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L. Moreover, we found a strong inverse correlation between the amounts of IL-6 and TNF- α spontaneously secreted by monocytes and CD16⁺ DCs and the percentage of CXCR2⁺ ($r^2 = -0.89$, $P = 0.004$; and $r^2 = -0.75$, $P = 0.03$, respectively) and CXCR4⁺ ($r^2 = -0.79$, $P = 0.02$; and $r^2 = -0.76$, $P = 0.03$, respectively) mDCs, supporting that the production of these cytokines could account for the persistent alterations in the expression of chemokine receptors observed. It should be noted that, in HIV-1 infection, secretion of inflammatory cytokines has been shown to induce viral replication in CD4⁺ T lymphocytes^{48,50} and recruitment of resting CD4⁺ T cells into sites of inflammation,⁵¹⁻⁵³ contributing to the spread of the infection. If we take into account that both CD16⁺ DCs and monocytes were also abnormally increased in the PB from patients with less than 200 CD4⁺ T cells/ μ L after ART, this would even enhance the negative effects of a persistently increased in vivo secretion of inflammatory cytokines in this patient group.

Altogether, these results point to the existence of a distinct pattern of pathophysiological alterations in the immune system depending on the PB CD4⁺ T-cell level even after ART is administered; under 200 CD4⁺ T cells/ μ L, the persistent activation and failure of the immune system to control HIV-1 infection could be responsible for the accelerated course of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank MSD España S.A. and BMS S.L. for their financial support. We also thank Prof Miguel Ángel del Pozo from the Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital

Clinico de Valladolid and Universidad de Valladolid (Valladolid, Spain), for his kind collaboration with this study by sending samples from HIV-1-infected patients, and Dr Jesús Iglesias from the Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, Spain), for his contribution to the virologic studies.

REFERENCES

- Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1998;338:853-860.
- Hammer SM, Squires KE, Hughes MD, 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. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med*. 1998;337:725-733.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*. 1995;373:123-126.
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs, total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*. 1997;387:183-188.
- Valdez H, Connick E, Smith KY, et al. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS*. 2002;16:1859-1866.
- Lederman HM, Williams PL, Wu WJ, et al. Incomplete immune reconstitution after initiation of highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected patients with severe CD4⁺ cell depletion. *J Infect Dis*. 2003;188:1794-1803.
- Montaner JS, Harris M, Mo T, et al. Rebound of plasma HIV viral load following prolonged suppression with combination therapy. *AIDS*. 1998;12:1398-1399.
- Harrigan PR, Whaley M, Montaner JS. Rate of HIV-1 RNA rebound after stopping antiretroviral therapy. *AIDS*. 1999;13:F59-F62.
- Furtado MR, Callaway DS, Phair JP, et al. Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med*. 1999;340:1614-1622.
- Zhu T, Muthui D, Holte S, et al. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2002;76:707-716.
- Valentin A, Rosati M, Patenaude DJ, et al. Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:7015-7020.
- Finzi D, Hermankova M, Pierson T, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science*. 1997;278:1295-1300.
- Siciliano JD, Kajdas J, Finzi D, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat Med*. 2003;9:727-728.
- Pomerantz RJ. Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clin Infect Dis*. 2002;34:91-97.
- Sonza S, Mutimer HP, Oelrichs R, et al. Monocytes harbour replication-competent, non-latent HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *AIDS*. 2001;15:17-22.
- Saha K, Zhang J, Gupta A, et al. Isolation of primary HIV-1 that target CD8⁺ T lymphocytes using CD8 as a receptor. *Nat Med*. 2001;7:65-72.
- Granelli-Piperno A, Moser B, Pope M, et al. Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med*. 1996;184:2433-2438.
- Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, et al. Immature dendritic cells selectively replicate macrophage tropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol*. 1998;72:2733-2737.
- MacDougall TH, Shattock RJ, Madsen C, et al. Regulation of primary HIV-1 isolate replication in dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 2002;127:66-71.
- Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, et al. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood*. 2003;101:4505-4511.

21. Almeida M, Cordero M, Almeida J, et al. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS*. 2005;19:261–271.
22. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, et al. Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood*. 2001;98:906–912.
23. Pacanowski J, Kahi S, Baillet M, et al. Reduced blood CD123⁺ (lymphoid) and CD11c⁺ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood*. 2001;98:3016–3021.
24. Chehimi J, Campbell DE, Azzoni L, et al. Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol*. 2002;168:4796–4801.
25. Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, et al. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis*. 2003;187:26–37.
26. Turville SG, Santos JJ, Frank I, et al. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood*. 2004;103:2170–2179.
27. Sanders RW, de Jong EC, Baldwin CE, et al. Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J Virol*. 2002;76:7812–7821.
28. Menéndez P, Prósper F, Bueno C, et al. Sequential analysis of CD34⁺ and CD34⁻ cell subsets in peripheral blood and leukapheresis products from breast cancer patients mobilized with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia*. 2001;15:430–439.
29. Almeida J, Bueno C, Alguero MC, et al. Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II⁺/lineage⁻ cells. *Clin Exp Immunol*. 1999;118:392–401.
30. Bueno C, Almeida J, Alguero MC, et al. Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry*. 2001;46:33–40.
31. Pacanowski J, Develioglu L, Kamga I, et al. Early plasmacytoid dendritic cell changes predict plasma HIV load rebound during primary infection. *J Infect Dis*. 2004;190:1889–1892.
32. Kaufmann GR, Bloch M, Zaunders JJ, et al. Long-term immunological response in HIV-1-infected subjects receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS*. 2000;14:959–969.
33. Gulick RM, Mellors JW, Havlir D, et al. 3-Year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *Ann Intern Med*. 2000;133:35–39.
34. Al-Harti L, Siegel J, Spritzler J, et al. Maximum suppression of HIV replication leads to the restoration of HIV-specific responses in early HIV disease. *AIDS*. 2000;14:761–770.
35. Kaufmann GR, Zaunders JJ, Cunningham P, et al. Rapid restoration of CD4 T cell subsets in subjects receiving antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection. *AIDS*. 2000;14:2643–2651.
36. Malhotra U, Berrey MM, Huang Y, et al. Effect of combination antiretroviral therapy on T-cell immunity in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*. 2000;181:121–131.
37. Lori F, Jessen H, Lieberman J, et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with hydroxyurea, didanosine, and a protease inhibitor before seroconversion is associated with normalized immune parameters and limited viral reservoir. *J Infect Dis*. 1999;180:1827–1832.
38. Deng H, Liu R, Ellmeier W, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661–666.
39. Dragic T, Litwin V, Allaway GP, et al. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature*. 1996;381:667–673.
40. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell*. 2000;100:587–597.
41. Emminger W, Zlabinger GJ, Fritsch G, et al. CD14(dim)/CD16(bright) monocytes in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur J Immunol*. 2001;31:1716–1719.
42. Okamoto H, Mizuno K, Horio T. Circulating CD14⁺ CD16⁺ monocytes are expanded in sarcoidosis patients. *J Dermatol*. 2003;30:503–509.
43. Alkhatib G, Locati M, Kennedy PE, et al. HIV-1 Coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology*. 1997;234:340–348.
44. Chuntharapai A, Kim KJ. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol*. 1995;155:2587–2594.
45. Signoret N, Oldridge J, Pelchen-Matthews A, et al. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol*. 1997;139:651–664.
46. Canque B, Bakri Y, Camus S, et al. The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood*. 1999;93:3866–3875.
47. Giovannetti A, Ensolì F, Mazzetta F, et al. CCR5 and CXCR4 chemokine receptor expression and beta-chemokine production during early T cell repopulation induced by highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 1999;118:87–94.
48. Lore K, Sonnerborg A, Olsson J, et al. HIV-1 exposed dendritic cells show increased pro-inflammatory cytokine production but reduced IL-1ra following lipopolysaccharide stimulation. *AIDS*. 1999;13:2013–2021.
49. Ghanekar S, Zheng L, Logar A, et al. Cytokine expression by human peripheral blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J Immunol*. 1996;157:4028–4036.
50. Chun TW, Engel D, Mizell SB, et al. Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4⁺ T cells using a combination of cytokines. *J Exp Med*. 1998;188:83–91.
51. Engering A, Van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, et al. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood*. 2002;100:1780–1786.
52. Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, et al. CCR5 is characteristic of T_H1 lymphocytes. *Nature*. 1998;391:344–345.
53. Ostrowski MA, Justement SJ, Catanzaro A, et al. Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol*. 1998;161:3195–3201.

Las alteraciones observadas en la capacidad de producción de citocinas por monocitos y células dendríticas de origen mieloide de sangre periférica de pacientes VIH-1⁺ sometidos a tratamiento antirretroviral se relacionan con la recuperación de los niveles de células T CD4⁺ y con la co-infección por el virus de la hepatitis C.

INTRODUCCIÓN: Las citocinas son moléculas efectoras de gran importancia en el inicio, mantenimiento y regulación de las respuestas inmunitaria e inflamatoria, y son esenciales en la comunicación entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos. En los últimos años, se ha demostrado ampliamente la existencia de alteraciones significativas en la producción de citocinas inflamatorias por las células del sistema inmune de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Pese a ello, los estudios disponibles hasta la fecha en cuanto a la producción de citocinas por las células dendríticas de sangre periférica (SP) en la infección por el VIH-1 han proporcionado resultados discrepantes e incluso contradictorios. Por otra parte, existe un gran desconocimiento acerca del efecto del tratamiento antirretroviral (TAR) sobre la capacidad funcional de las células dendríticas para producir citocinas inflamatorias en estos pacientes.

OBJETIVO: En el presente trabajo hemos analizado el efecto del TAR sobre la capacidad de producir citocinas inflamatorias, *ex vivo*, por parte de los monocitos y las células dendríticas de origen mieloide de SP de individuos VIH-1⁺.

MATERIAL Y MÉTODOS: Para ello, hemos analizado un total de 32 pacientes VIH-1⁺, agrupados en función del número absoluto de linfocitos T CD4⁺ de SP en el momento de su inclusión en el estudio, en sujetos con <200 células T CD4⁺/μl de SP e individuos con >200 células T CD4⁺/μl de SP. Como controles se analizaron muestras de SP de 10 adultos sanos (AS). Los estudios se realizaron previamente a la instauración del TAR y a las 2, 4, 8, y 12 semanas desde el inicio del tratamiento, con el objeto de evaluar su efecto sobre la capacidad de producción de citocinas a corto plazo. Además, se repitieron los estudios al año de tratamiento, con el fin de evaluar el efecto del TAR a largo plazo. El análisis de la producción de citocinas inflamatorias por las células dendríticas de origen mieloide –células CD33⁺⁺⁺ (en

adelante “CD mieloides”) y células HLA-DR⁺/CD16⁺/CD14^{-/+débil} (en adelante “CD CD16⁺”)– y monocitos de SP se realizó mediante citometría de flujo, sobre células cultivadas durante 6 horas a 37°C, en presencia de lipopolisacárido (LPS), interferón-gamma (IFN- γ) y brefeldina A. La técnica de citometría de flujo empleada para la evaluación de la producción de citocinas nos permitió realizar el marcaje simultáneo de antígenos de membrana y de las citocinas producidas a nivel citoplasmático, en las distintas subpoblaciones celulares objeto de estudio. Además, evaluamos la concentración de citocinas inflamatorias presentes en plasma de pacientes VIH-1⁺ en el momento de su inclusión en el estudio y a las 12 y 52 semanas tras el inicio del TAR, utilizando el reactivo comercial *BD™ Human Inflammation Cytometric Bead Array* (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA).

RESULTADOS: De forma previa al inicio del TAR, el porcentaje de monocitos productores de citocinas inflamatorias tras estimulación estaba ligeramente reducido en ambos grupos de pacientes VIH-1⁺ (<200 y >200 células T CD4⁺/ μ l de SP). Tras el inicio del tratamiento, observamos una disminución transitoria y significativa de la producción de IL-6, IL-12 e IL-8 en el grupo de pacientes con >200 CD4⁺/ μ l ($p < 0.05$). Merece destacar que, tras un año de TAR, se detectó un patrón de secreción de citocinas muy diferente en cada uno de los dos grupos de pacientes. Así, mientras que el porcentaje de monocitos que producían IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α estaba reducido de forma significativa en los pacientes con >200 células T CD4⁺/ μ l de SP ($p < 0.05$), éste era normal, o estaba incluso incrementado en el caso de la IL-8, en el grupo de pacientes más inmunodeprimidos (<200 linfocitos T CD4⁺/ μ l de SP). Respecto a las CD mieloides, previamente al tratamiento, observamos una proporción incrementada de células productoras de IL-12, y una cantidad media de IL-6 y TNF- α producida por célula significativamente mayor en los pacientes con >200 células T CD4⁺/ μ l de SP ($p < 0.05$). Tras el inicio del TAR, el porcentaje de células IL-12⁺ fue aumentando progresivamente a lo largo del tratamiento en ambos grupos de pacientes, manteniéndose incrementado al cabo de un año ($p < 0.05$); en este momento del tratamiento, el porcentaje de células productoras de IL-6 e IL-8, así como la cantidad media producida por célula de todas las citocinas inflamatorias analizadas –incluyendo la IL-12–, estaba reducida en los pacientes con >200 células T CD4⁺/ μ l de SP ($p < 0.05$), siendo normal en los sujetos más inmunodeprimidos.

En cuanto a las CD CD16+, al comienzo del estudio observamos una proporción incrementada de células productoras de IL-8 e IL-12 en los pacientes con >200 células T CD4+/ μl de SP ($p<0.05$). Tras el inicio de la terapia, observamos un incremento progresivo de la proporción de células que producían IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α en los casos más inmunodeprimidos, permaneciendo ésta incrementada al año del inicio del TAR ($p<0.05$). Por el contrario, aunque el porcentaje de células IL-12+ estaba aumentado al año de tratamiento en los individuos con >200 células T CD4+/ μl de SP, tanto el porcentaje de células productoras de otras citocinas inflamatorias, como la cantidad media de cada citocina producida por célula, se encontraban significativamente reducidos en estos pacientes ($p<0.05$).

En función de estos resultados, analizamos la posible asociación entre la recuperación de los niveles de linfocitos T CD4+ al año de TAR, la presencia de co-infección por el virus de la hepatitis C (VHC) y la producción alterada de citocinas inflamatorias tras estimulación *in vitro*. Así comprobamos que, entre los pacientes más inmunodeprimidos, únicamente los casos que mostraron una buena recuperación del número de células T CD4+ en SP al año de tratamiento, tenían incrementada su capacidad de producción de citocinas frente a un estímulo externo ($p<0.05$). Merece destacar que en este grupo de pacientes, la co-infección por el VHC no tenía influencia en la producción de citocinas. Por el contrario, en los pacientes VIH-1+ menos inmunodeprimidos (>200 células T CD4+/ μl de SP), solamente aquellos casos que presentaban co-infección por el VHC tenían claramente disminuida su capacidad de producción de citocinas inflamatorias ($p<0.05$).

Además, nuestros resultados pusieron de manifiesto la existencia de una fuerte correlación negativa entre la concentración de IL-8 en plasma y el porcentaje de monocitos y CD CD16+ productoras de IL-8, de forma previa al inicio del TAR y durante el tratamiento, en el caso de los pacientes con <200 células T CD4+/ μl de SP y de los individuos con >200 linfocitos T CD4+/ μl de SP, respectivamente.

CONCLUSIONES: La capacidad de producción de citocinas inflamatorias en respuesta a un estímulo exógeno por parte de los monocitos y células dendríticas de origen mieloide de individuos infectados por el VIH-1 no tratados se encuentra alterada. Tras la administración de TAR, la recuperación parcial de la capacidad funcional de las células inflamatorias de SP está

asociada a la reconstitución de los niveles de linfocitos T CD4+ de SP en los pacientes más inmunodeprimidos (<200 células CD4+/ μ l SP), y a la presencia de co-infección por el VHC en el caso de los individuos menos inmunodeprimidos (>200 células CD4+/ μ l SP).

Abnormal Cytokine Production by Circulating Monocytes and Dendritic Cells of Myeloid Origin in ART-Treated HIV-1+ Patients Relates to CD4+ T-Cell Recovery and HCV Co-Infection

Maria Almeida^{1,2}, Miguel Cordero^{1,3}, Julia Almeida^{1,2} and Alberto Orfao^{*1,2}

¹Department of Medicine, University of Salamanca, ²Service of Flow Cytometry and Center for Cancer Research, University of Salamanca, ³Service of Internal Medicine-Unity of Infectious Diseases, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

Abstract: HIV-1 infection is associated with dysregulation of cytokine production by peripheral blood (PB) monocytes and dendritic cells (DC), but controversial results have been reported. We aimed to analyze the effect of antiretroviral therapy (ART) on the *in vitro* production of inflammatory cytokines by PB-stimulated monocytes and DC of myeloid origin –CD33^{high+} myeloid DC (mDC) and CD33⁺/CD14^{-dim+}/CD16^{high+} DC– from HIV-1+ patients and its relationship with CD4+ T-cell recovery and co-infection with hepatitis C virus (HCV). *In vitro* cytokine production was analyzed at the single cell level in 32 HIV-1+ patients, grouped according to the number of CD4+ T-cells/μl in PB (<200 CD4 versus >200 CD4). Patients were tested prior to therapy and at weeks +2, +4, +8, +12 and +52 after ART. Prior to ART, production of IL-6, TNF-α and IL-12 by mDC and of IL-8 and IL-12 by CD16+ DC was significantly increased among >200 CD4 patients. After one year of ART, increased production of IL-8 by monocytes, of TNF-α by mDC and of IL-1β, IL-6 and TNF-α by CD16+ DC was specifically observed among <200 CD4 HIV-1+ individuals showing a high recovery of PB CD4+ T-cell counts. In turn, we found that the significantly reduced percentage of IL-1β, IL-6, IL-8 and TNF-α-producing monocytes and of IL-6 and IL-8-producing mDC and CD16+ DC, as well as the significantly diminished mean amount of IL-6 produced per monocyte, mDC and CD16+ DC and of IL-12 produced per CD16+ DC observed at week +52 for the >200 CD4 patients, were related to the presence of co-infection with HCV. In summary, HIV-1+ individuals show abnormal production of inflammatory cytokines by PB-stimulated monocytes and DC of myeloid origin even after one year of ART, such abnormalities being associated with the degree of recovery of PB CD4+ T-cell counts in more immunocompromised patients and HCV co-infection in more immunocompetent HIV-1+ individuals.

Keywords: Dendritic cells, inflammatory cytokines, HIV-1 infection, antiretroviral therapy, CD4+ T-cell recovery, HCV co-infection.

INTRODUCTION

Dendritic cells (DC) are specialized antigen-presenting cells (APC) that play a crucial role in linking innate and adaptive immunity and possess a unique ability to stimulate naive T-cells [7, 32]. Two major subsets of DC have been well characterized in peripheral blood (PB) samples from adult subjects: myeloid (mDC) and plasmacytoid DC (pDC) [11]. A third subset of CD4+/CD33+ DC has been characterized in PB by our group and others [2, 16, 27, 40]; this DC subset also derives from a myeloid progenitor cell [14], and typically shows a high expression of FcγRIII (CD16) –absent in the other PB DC subsets–, and reactivity for DC-SIGN (CD209) –a C-type lectin exclusively expressed by DC [13]– together with an important stimulatory capacity for naive T-cells in mixed allogeneic cell cultures [37]. In early stages of infection, DC are considered to be among the first target cells for HIV, due to their localization at mucosal surfaces [24, 41], and because DC express CD4, CXCR4 and CCR5, which are essential for the virus entry into the cell. Despite discrepant results exist [39], several studies have shown that DC can be infected by HIV, both *in vitro* and *in vivo* [10, 17, 28]; this might help to explain their impaired ability to stimulate allogeneic T-cell proliferative responses [10], as well as their abnormally increased spontaneous production of inflammatory cytokines, observed even after one year of antiretroviral therapy (ART) [3, 4].

Cytokines are important effector molecules in the initiation, maintenance and regulation of inflammatory and immune responses, and are essential for the communication between APC and T-cells [33, 36]. Dysregulation of the cytokine network in HIV-infected individuals is well documented, as well as its role in the impairment of cell-mediated immune responses in these patients [5, 12, 23]. Accordingly, an increased production of IL-12p70, IL-1β and TNF-α by monocyte-derived DC (MDDC) infected *in vitro* with HIV and matured with classical stimuli such as CD40 ligand (CD40L) or lipopolysaccharide (LPS), has been reported [22, 26]. However, these findings could not be confirmed by other groups who have shown

that MDDC stimulated with either LPS or CD40L and exposed to HIV glycoprotein (gp)-120 produced lower levels of IL-12 and/or TNF-α [15, 42]. Furthermore, other studies have shown a normal pattern of cytokine production by LPS or CD40L-matured MDDC infected *in vitro* with HIV or exposed to recombinant Nef [9, 35]. Thus, the effect of HIV infection on the functionality of DC, as regards their ability to secrete cytokines in response to CD40L or LPS, remains controversial and requires further investigation. Although initiation of ART leads to a marked reduction of the abnormally high production of inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and monocytes from HIV+ patients [5, 44], little is known about the long-term effect of ART on the ability of *in vitro* stimulated PB DC from HIV+ individuals to produce inflammatory cytokines.

The aim of the present study is to analyze the effects of ART on the *in vitro* production of inflammatory cytokines by PB mDC, CD16+ DC and monocytes in a cohort of chronically-infected, newly-diagnosed HIV-1+ patients, followed for a period of one year of ART.

MATERIAL AND METHODS

Patients and samples: PB samples from 32 newly-diagnosed HIV-1+ patients who had not previously received ART were analyzed. According to PB CD4+ T-cell counts prior to therapy, patients were grouped as: 1) cases with <200 CD4+ T-cells/μl (n= 20; 63%) (named <200 CD4) and 2) patients with >200 CD4+ T-cells/μl (n= 12; 37%) (named >200 CD4). Among <200 CD4 and >200 CD4 HIV-1+ patients, 9 cases (45%) and 8 cases (67%) were co-infected with hepatitis C virus (HCV), respectively. Tables 1 and 2 show additional information about the clinical, immunological and virological characteristics of the whole series of patients, and of those co-infected with HCV, respectively. HIV-1+ individuals with concomitant acute diseases related to their immunodeficiency were excluded from the study. In addition, PB samples from 10 age- and gender-matched adult healthy volunteers (AHV) were analyzed, as normal controls.

Patients were sequentially tested prior to therapy (time 0) and at weeks +2, +4, +8 and +12 of ART, to closely analyze the very early changes on cytokine production by APC after initiating treatment; then, the final analysis was performed at week +52 (one year) after

*Address correspondence to this author at the Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Avda. Alfonso X el Sabio s/n, Campus Miguel de Unamuno, 37007 Salamanca, Spain; Tel: +34 923 29 48 11; Fax: +34 923 29 47 95; E-mail: orfao@usal.es

Table 1. Baseline Clinical, Immunological and Virological Features of HIV-1+ Patients Grouped According to the Absolute Number of PB CD4⁺ T-Cells/ μ l Prior to ART

	HIV-1+ patient group	
	<200 CD4 ⁺ T-cells/ μ l (n= 20)	>200 CD4 ⁺ T-cells/ μ l (n= 12)
Age (y)	42 \pm 11 (26-63)	35 \pm 6 (27-48)
Sex (M/F)	15/5	7/5
Duration of HIV-1 infection (y)	4 \pm 5 (0-15)	5 \pm 5 (0-12)
N. of CD4 ⁺ T-cells/ μ l	74 \pm 57 (4-176)	316 \pm 202 (210-881)
Plasma HIV-1 RNA load (n. of copies/ml)	143x10 ³ \pm 189x10 ³ (8x10 ³ -820x10 ³)	46x10 ³ \pm 49x10 ³ (0.4x10 ³ -130x10 ³)
N. of cases co-infected with HCV	9 (45%)	8 (67%)
Clinical status (% of cases) *	A (24%) B (29%) C (47%)	A (30%) B (50%) C (20%)
Type of ART (% of cases)	2 NA+EFV (66%) 2 NA+RTV+IDV (34%)	2 NA+EFV (89%) 2 NA+RTV+IDV (11%)

Age, CD4⁺ T-cell counts, viral load and duration of HIV-1 infection are expressed as mean \pm one standard deviation; range is shown between brackets.

*Clinical status according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification.

HCV: Hepatitis C virus; ART: antiretroviral therapy; NA: nucleoside analogue; EFV: efavirenz; RTV: ritonavir; IDV: indinavir.

initiating ART, to evaluate the changes observed at long term. Treatment consisted of two nucleoside reverse transcriptase (RT) inhibitors plus either efavirenz or ritonavir-potentiated indinavir (Table 1). Of note, none of the patients included in this study received therapy for HCV infection. The degree of PB CD4⁺ T-cell count recovery was analyzed by calculating, for each individual patient, the ratio between the number of CD4⁺ T-lymphocytes at week +52 of therapy and the number of CD4⁺ T-cells prior to ART. An arbitrary ratio of <5 and >20 was considered to reflect a low and high recovery of PB CD4⁺ T-cell counts, respectively.

EDTA- and heparin-anticoagulated PB samples were collected by venipuncture after informed written consent was given by the individuals, according to the guidelines of the Ethical Committee of the University Hospital (Salamanca, Spain).

In vitro analysis of cytokine production by PB monocytes and DC of myeloid origin: *In vitro* production of inflammatory cytokines by PB monocytes and myeloid DC -CD33^{high+} myeloid DC (mDC) and CD33⁺/CD14^{-dim+}/CD16^{high+} DC- was analyzed at the single cell level, using a well-established technique that combines four-color stainings for the specific identification of PB monocytes and DC, with the measurement of intracellular cytokine production on erythrocyte-lysed whole blood [1, 8]. Briefly, 500 μ l of heparin-anticoagulated PB were placed in a tube, to which 100ng/ml of LPS from *Escherichia coli* (serotype 055:B5; Sigma, St Louis, MO) and 10ng/ml of human recombinant IFN- γ (Promega, Madison, WI) were added for the specific stimulation of PB monocytes and DC of myeloid origin. In addition, 10 μ g/ml of Brefeldin A (BFA; Sigma, St Louis, MO) were added to block cytokine secretion [8]. A non-stimulated aliquot of each sample, also containing BFA and proc-

Table 2. Characteristics of HIV-1+ Patients Co-Infected with Hepatitis C Virus (HCV), According to the Absolute Number of PB CD4⁺ T-Cells/ μ l Prior to ART

	Patient group	
	HIV-1 ⁺ /HCV ⁺ patients with <200 CD4 ⁺ T-cells/ μ l (n= 9)	HIV-1 ⁺ /HCV ⁺ patients with >200 CD4 ⁺ T-cells/ μ l (n= 8)
Duration of HCV infection (y)	7 \pm 3 (2-12)*	8 \pm 3 (4-12)*
Plasma HCV RNA load (UI/ml)		
Prior to ART	314x10 ⁴ \pm 675x10 ⁴ (0.1x10 ⁴ -1810x10 ⁴)	190x10 ⁴ \pm 254x10 ⁴ (0.5x10 ⁴ -610x10 ⁴)
After one year of ART	579x10 ⁴ \pm 817x10 ⁴ (0.1x10 ⁴ -1950x10 ⁴)	355x10 ⁴ \pm 539x10 ⁴ (5x10 ⁴ -1150x10 ⁴)
HCV genotype (number of cases)	1a (3) 1b (1) 3 (2) ND (3)	1a (5) 3 (1) 4 (1) ND (1)
Liver status (number of cases)	CH (5) CC (1) N (3)	CH (4) CC (1) N (3)
ALT (IU/ml)	71 \pm 69 (16-213)	44 \pm 25 (21-91)
Other diseases causing hepatitis (number of cases)	PHB (6) PHB, alcohol (3)	PHB (4) PHB, alcohol (3) PHB, PDH (1)
Treatment for HCV infection (before and/or during follow-up)	None	None

Duration of HCV infection, viral load and alanine aminotransferase (ALT) levels are expressed as mean \pm one standard deviation; range is shown between brackets.

*5 and 2 HIV-1⁺/HCV⁺ patients with <200 and >200 CD4⁺ T-cells/ μ l, respectively, were infected before 1990, thus in these cases duration of infection could not be determined, since no diagnostic test was available to diagnose HCV infection before that time.

ND: not determined; CH: chronic hepatitis (chronic alanine-aminotransferase elevation); CC: compensated cirrhosis; N: normal (sustained normal or intermittently elevated alanine-aminotransferase levels); PHB: past hepatitis B; PHD: past hepatitis D.

essed in parallel in an identical way, was used as baseline control for cytokine production. Afterwards, samples were incubated for 6h at 37°C in a 5% CO₂ and 95% humidity, sterile environment, as previously described in detail [1]. Once this incubation period was finished, cells were stained with 20µl of the Dendritic Cell Exclusion Kit (a commercial kit which includes fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated CD3, CD14, CD19 and CD56 reagents; Cytognos, Salamanca, Spain), 20µl of anti-HLA-DR-peridinin chlorophyll protein (PerCP; clone L243, Becton Dickinson Biosciences (BDB), San Jose, CA) and 5µl of CD33-allophycocyanine (clone LeuM9, BDB). After gently mixing, cells were incubated for 15 min in the darkness (room temperature) and subsequently washed in 2ml of PBS. Afterwards, cells were fixed, permeabilized and stained with monoclonal antibodies (Mab) directed against different human inflammatory cytokines, using the Fix & Perm reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), as recommended by the manufacturer. Mab reagents used to detect human inflammatory cytokines were as follows: anti-IL-6-phycoerythrin (PE; clone MQ2-6A3; PharMingen); anti-IL-12-PE (clone C11.5; PharMingen); tumor necrosis factor (TNF)-α-PE (clone Mab11; PharMingen); anti-IL-1β-PE (clone AS10; BDB) and anti-IL-8 (anti-CXCL8)-PE (clone AS14; BDB). An isotype-matched PE-conjugated Mab was used as negative control. Once stained and washed, samples were acquired in two consecutive steps in a FACSCalibur flow cytometer (BDB), using the CellQUEST software (BDB): in the first step, information about 10⁵ events corresponding to the whole PB cellularity was collected per test (Fig. 1A); in the second step, information about a minimum of 3x10⁵ events

from total PB cells included in an electronic live-gate containing only HLA-DR⁺ cells, was stored (Fig. 1B); in this electronic gate, information on at least 3x10⁵ DC was collected. For data analysis, the Paint-A-Gate PRO software (BDB) was used. PB monocytes were identified by their high expression of CD33 and CD14 antigens (Fig. 1C). DC were identified as HLA-DR⁺/lineage^{-/+dim} cells (Fig. 1D), with forward light scatter (FSC) versus (vs) sideward light scatter (SSC) characteristics intermediate between those of PB lymphocytes and monocytes (Fig. 1E). As we have previously shown [2] that the three subsets of PB DC show different levels of expression of CD33 and HLA-DR, both markers were used to distinguish among them in PB samples (Fig. 1F). For the evaluation of cytokine production, both the percentage of positive cells within each cell subset and their mean fluorescence intensity (MFI; after subtracting the MFI obtained for the corresponding isotype-matched negative control), were calculated [1].

Quantification of inflammatory cytokines in the plasma of HIV-1+ patients: Quantification of soluble inflammatory cytokines was performed on plasma samples prior to ART (time 0) and then at weeks +12 and +52 after starting therapy. The BD™ Cytometric Bead Array (CBA) immunoassay system (BDB) was used to simultaneously quantify the concentration of IL-1β, IL-6, IL-12, TNF-α and IL-8 in plasma samples, using the BD Human Inflammation CBA Kit (BDB). Briefly, 50µl of plasma were incubated for 1.5h at room temperature in the dark with 50µl of a mixture of anti-cytokine monoclonal antibody (Mab)-coated beads. Afterwards, samples were washed once (5 min at 200g) and incubated in the presence of the

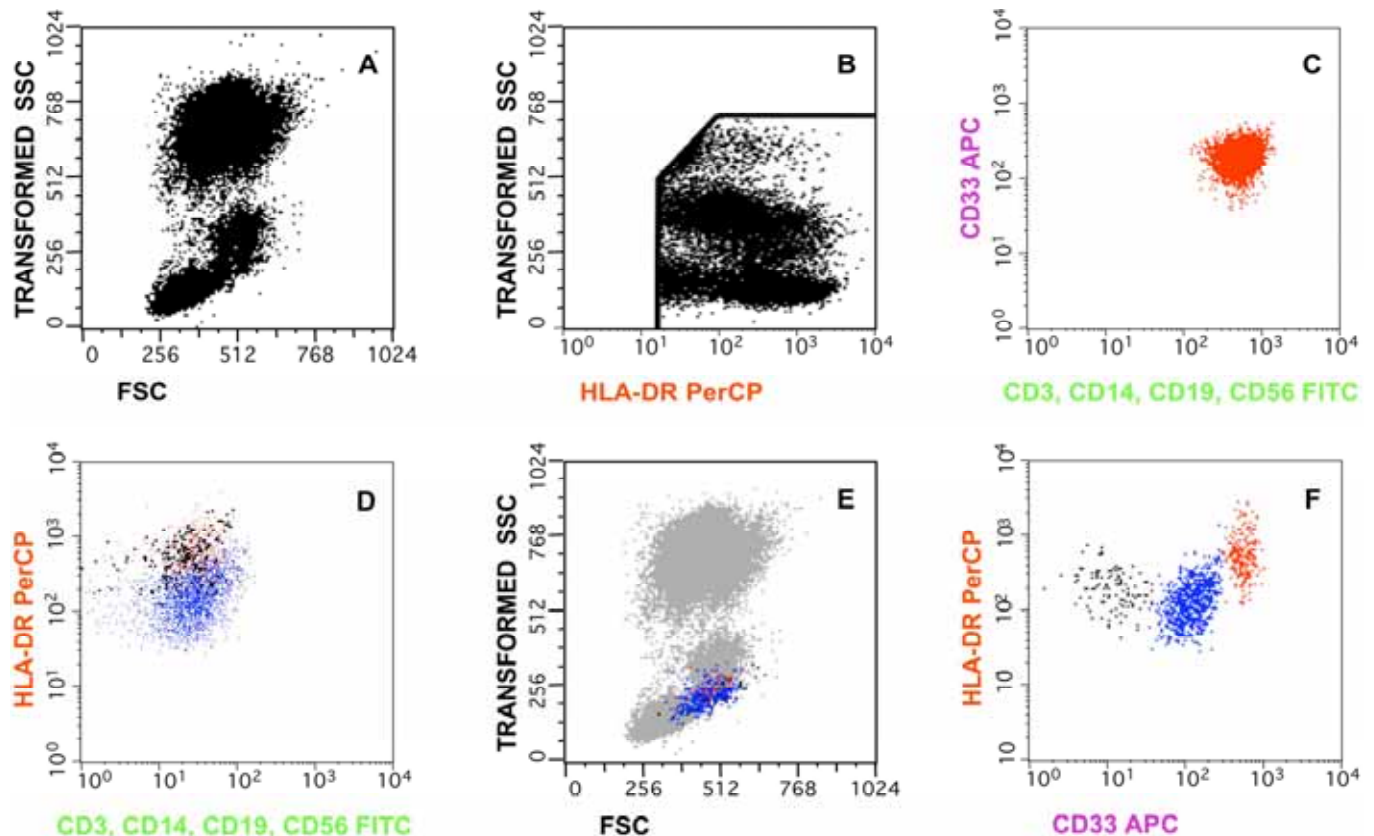


Fig. (1). Immunophenotypic analysis of human peripheral blood (PB) monocytes and dendritic cell (DC) subsets. Panels A and B show the two-step data acquisition strategy employed for the analysis of the different subsets of PB monocytes and DC: in the first step (Panel A) information about around 5x10⁵ events/test, corresponding to the whole sample cellularity, was stored. In the second step (Panel B) information was collected only for those events included in an electronic live-gate drawn in the SSC^{lo/inter}/HLA-DR⁺ fraction. PB monocytes were identified by their high reactivity for the CD14 and CD33 antigens (Panel C). Total DC were identified as HLA-DR⁺/lineage^{-/+dim} cells (Panel D), with a forward light scatter (FSC) versus sideward light scatter (SSC) characteristics intermediate between those of PB lymphocytes and monocytes (Panel E). Panel F shows the gating strategy used for the phenotypic identification of the three subsets of PB DC, based on their different reactivity for CD33 and HLA-DR: DC of myeloid origin -CD33^{lo/inter}/HLA-DR^{high} myeloid DC (mDC) (red dots) and CD33^{high}/HLA-DR^{high} CD16^{high} DC (blue dots)-, and CD33^{dim}/HLA-DR⁺ plasmacytoid DC (pDC) (black dots).

appropriate PE-conjugated anti-cytokine antibody detector, under the same conditions as those described above. Then, samples were washed and immediately acquired in a FACSCalibur flow cytometer using the CellQUEST software. Information was stored for at least 300 events corresponding to each bead population analyzed per sample. For data analysis, the Paint-A-Gate PRO and the BD CBA software (BDB) were used. The MFI value for the PE-associated fluorescence was recorded for each population of cytokine capture-beads.

Standard curves developed from the measurement of different known concentrations of human inflammatory cytokine standards for each cytokine measured were used to quantify the corresponding captured cytokines following the technical instructions of the manufacturer, as previously reported [38]. Standard curves were plotted (cytokine calibrator concentration *versus* PE MFI) using a four-parameter logistic curve fitting model (BD CBA software). A total of 12 standards for each cytokine were used at concentrations ranging from 0 to 10000pg/ml. The amount of the cytokine present in the plasma was considered to be directly proportional to the MFI of the corresponding bead population measured in fluorescence channels (relative linear arbitrary units scaled from 0 to 10^4). The specific concentration of each cytokine analyzed was determined through the comparison of the MFI of unknown samples to the standard curve.

Statistical methods: Mean values and their standard deviations as well as median, range, 25th and 75th percentiles and 95% confidence intervals, were calculated for each variable using the SPSS software (SPSS 12.0, Chicago, IL). The statistical significance of the differences observed between groups was determined using the non-parametric Mann-Whitney U and Wilcoxon signed rank tests for unpaired and paired samples, respectively. Linear correlations were tested by using the Spearman rank method. P values ≤ 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

RESULTS

***In vitro* production of inflammatory cytokines by PB monocytes from HIV-1+ patients under ART:** Prior to ART, the percentage of PB monocytes producing IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α and IL-12 after *in vitro* stimulation with LPS+IFN- γ was within the lower normal range for both the <200 and >200 CD4 HIV-1+ patient groups ($p > 0.05$) (Fig. 2A-E). Similarly, no differences were found at this time-point as regards the mean amount of cytokines produced per monocyte (measured as MFI values) in HIV-1+ patients with respect to AHV (Fig. 3A-E). After starting ART, a marked drop in the percentage of monocytes producing IL-6 ($p = 0.008$) and IL-12 ($p = 0.04$) was observed at week +2 for the >200 CD4 patient group (Fig. 2B,E). Accordingly, a diminished mean amount of IL-6 produced per monocyte was observed at this time point for >200 CD4 patients ($p = 0.03$ and $p = 0.02$ vs AHV and basal levels, respectively) (Fig. 3B); in addition, a transient drop in the amount of TNF- α produced by PB stimulated monocytes was also observed for >200 CD4 HIV-1+ patients at week +2 of ART, reverting to normal levels thereafter ($p = 0.02$ vs basal levels) (Fig. 3D). From week +2 on, ART induced a slight recovery towards normal levels of the proportion of cytokine producing PB monocytes until week +12 of ART, although a reduced mean amount of IL-1 β ($p = 0.03$ vs AHV) (Fig. 3A) and of IL-12 ($p = 0.02$ vs basal levels) (Fig. 3E) produced per monocyte could be observed for the >200 CD4 HIV-1+ patients at week +8 of ART. Interestingly, a different pattern of production of inflammatory cytokines by stimulated PB monocytes was observed at week +52 for the two patient groups. Accordingly, the percentage of PB monocytes producing IL-1 β ($p = 0.04$), IL-6 ($p = 0.002$), IL-8 ($p = 0.01$) and TNF- α ($p = 0.03$) was significantly reduced among the >200 CD4 HIV-1+ patients (Fig. 2A-D), whereas a normal percentage of PB monocytes producing the inflammatory cytokines analyzed was observed at this time point for the <200 CD4 group, except for IL-8, whose levels were significantly increased ($p = 0.03$ vs AHV) (Fig. 2C). In turn, a diminished mean amount of all inflammatory cytokines analyzed – including IL-12 – produced per monocyte was observed for the >200 CD4 HIV-1+ patients after one year of therapy ($p \leq 0.001$), whereas

they were within the normal range for the <200 CD4 HIV-1+ patients (Fig. 3A-E).

***In vitro* production of inflammatory cytokines by PB DC of myeloid origin from HIV-1+ patients under ART:** At enrollment (time 0), an increased percentage of PB mDC stimulated *in vitro* with LPS+IFN- γ producing IL-12 was observed for the >200 CD4 patient group ($p = 0.03$) (Fig. 2J), with normal percentages for the other cytokines; at this time point, an increased mean amount of IL-6 ($p = 0.05$) and TNF- α ($p = 0.02$) produced per mDC was also observed for this HIV-1+ patient group (Fig. 3G,I). Initiation of ART led to a significant increase in the percentage of IL-12-producing PB mDC from week +8 on for the >200 CD4 patient group ($p \leq 0.05$) and from week +12 on for the <200 CD4 HIV-1+ patients ($p \leq 0.05$). Despite this, a slight drop in the proportion of IL-12-producing mDC was observed for the >200 CD4 group at week +52, although it remained significantly increased as compared to AHV (Fig. 2J). Of note, although the percentage of IL-12 producing PB mDC was increased for the >200 CD4 HIV-1+ patients, the mean amount of IL-12 produced per mDC was significantly reduced among these individuals at week +52 ($p = 0.001$) (Fig. 3J). Regarding other cytokines, a transiently increased proportion of IL-1 β and IL-8 producing PB mDC was observed for the <200 CD4 patient group at weeks +2 and +4 of therapy, respectively ($p = 0.02$ and $p = 0.04$ vs time 0, respectively) (Fig. 2F,H). By contrast, a transient drop in the overall mean amount of IL-6 produced by mDC was observed at week +2 of ART for the >200 CD4 patients ($p = 0.05$) (Fig. 3G). Moreover, after one year of ART the percentage of IL-6 ($p = 0.03$) and IL-8 ($p = 0.01$) producing PB mDC was significantly decreased in the >200 CD4 HIV-1+ patients as compared to AHV (Fig. 2G,H). In contrast, no significant changes with respect to AHV were detected after one year of ART in the percentage of PB mDC producing IL-1 β and TNF- α among >200 CD4 patients. Finally, it should be noted that at week +52 of therapy the mean amounts of IL-1 β ($p = 0.04$), IL-6 ($p = 0.01$), IL-8 ($p = 0.002$) and TNF- α ($p = 0.002$) produced per mDC were significantly reduced for the >200 CD4 HIV-1+ patients (Fig. 3F-I), whereas <200 CD4 patients showed an increased mean amount of TNF- α produced by mDC at this time point ($p = 0.04$) (Fig. 3J).

Regarding CD16+ DC, an increased percentage of IL-8 and IL-12 producing cells was detected for the >200 CD4 HIV-1+ patients prior to ART ($p = 0.04$) (Fig. 2M,O). At this time point, the mean amount of IL-8 ($p = 0.04$) (Fig. 3M) and of IL-12 ($p = 0.04$) (Fig. 3O) produced per CD16+ DC were also increased for the <200 CD4 and >200 CD4 HIV-1+ patients, respectively. ART induced a significant and gradual increase of the percentage of IL-12 producing CD16+ DC over time for both patient groups, this percentage remaining significantly increased over normal values at week +52 of therapy for both the <200 CD4 ($p = 0.005$) and >200 CD4 ($p = 0.04$) cases (Fig. 2O). However, despite the percentage of IL-12 producing PB CD16+ DC was increased at week +52 for both the >200 CD4 and <200 CD4 HIV-1+ patients, the mean amount of IL-12 produced per CD16+ DC was significantly reduced after one year of ART for the former group ($p = 0.001$), while it was within the normal range for the latter group (Fig. 3O). Regarding other cytokines, ART led to a marked increase in the percentage of stimulated PB CD16+ DC that produced IL-1 β and TNF- α ($p < 0.05$), which, together with IL-6, remained significantly increased even after one year of ART among <200 CD4 HIV-1+ patients ($p < 0.006$) (Fig. 2K,LN). In contrast, at this time point, >200 CD4 individuals showed a significantly decreased proportion of IL-6- and IL-8-producing PB CD16+ DC as compared to AVH ($p < 0.03$) (Fig. 2L,M); accordingly, the mean amount of IL-1 β , IL-6 and TNF- α produced per PB CD16+ DC was significantly reduced for this patient group at week +52 of ART ($p \leq 0.002$) (Fig. 3K,L,N).

Recovery of PB CD4+ T-cell counts at week +52 of ART, coinfection with hepatitis C virus (HCV) and production of inflammatory cytokines by PB monocytes and DC of myeloid origin: In order to gain further insights into the potential explanations for the altered patterns of *in vitro* cytokine production by PB mono-

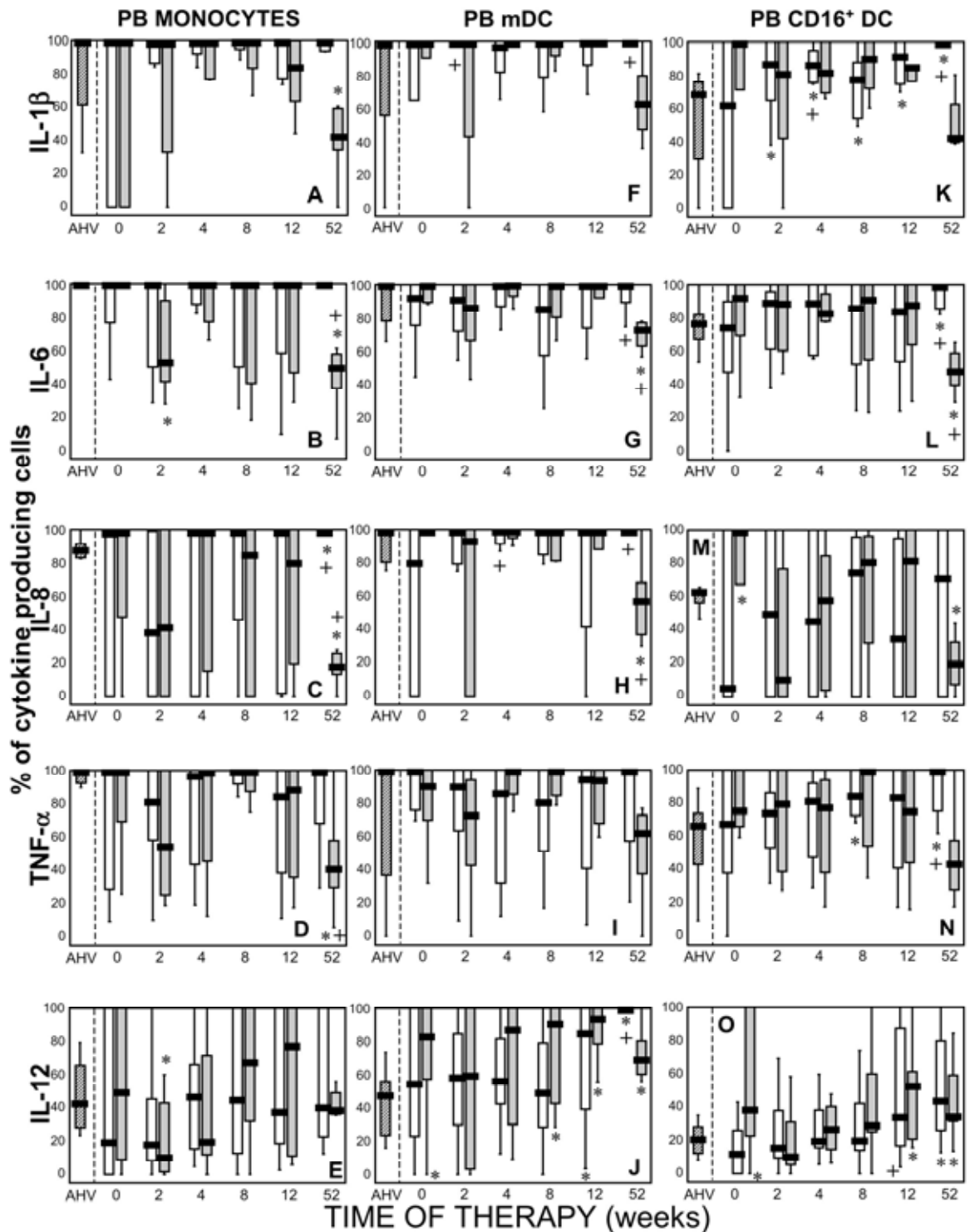


Fig. (2). Percentage of LPS+IFN γ -stimulated PB monocytes and DC of myeloid origin (mDC and CD16+ DC) from HIV-1+ infected patients, grouped according to the absolute number of CD4+ T-cells in PB, producing inflammatory cytokines at different time-points: prior to therapy (time 0) and at weeks +2, +4, +8, +12 and +52 after starting antiretroviral therapy (ART). Panels A to O show the ART-induced time-dependent variations of the percentage of cytokine-producing PB monocytes and DC. Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. Hatched boxes correspond to AHV. White boxes and grey boxes represent HIV-1+ patients with extremely low (<200 CD4+ T-cells/ μ l) and low (>200 CD4+ T-cells/ μ l) PB CD4+ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively.

*: $p \leq 0.05$ vs adult healthy volunteers (AHV).

+: $p \leq 0.05$ vs basal levels (time 0).

cytes and DC of myeloid origin detected for both HIV-1+ patient groups at week +52 of therapy, we analyzed the relationship between both the degree of recovery of PB CD4+ T-cell counts after one year

of ART and the presence of HCV co-infection, and the *in vitro* ability of stimulated PB monocytes and DC of myeloid origin to produce inflammatory cytokines.

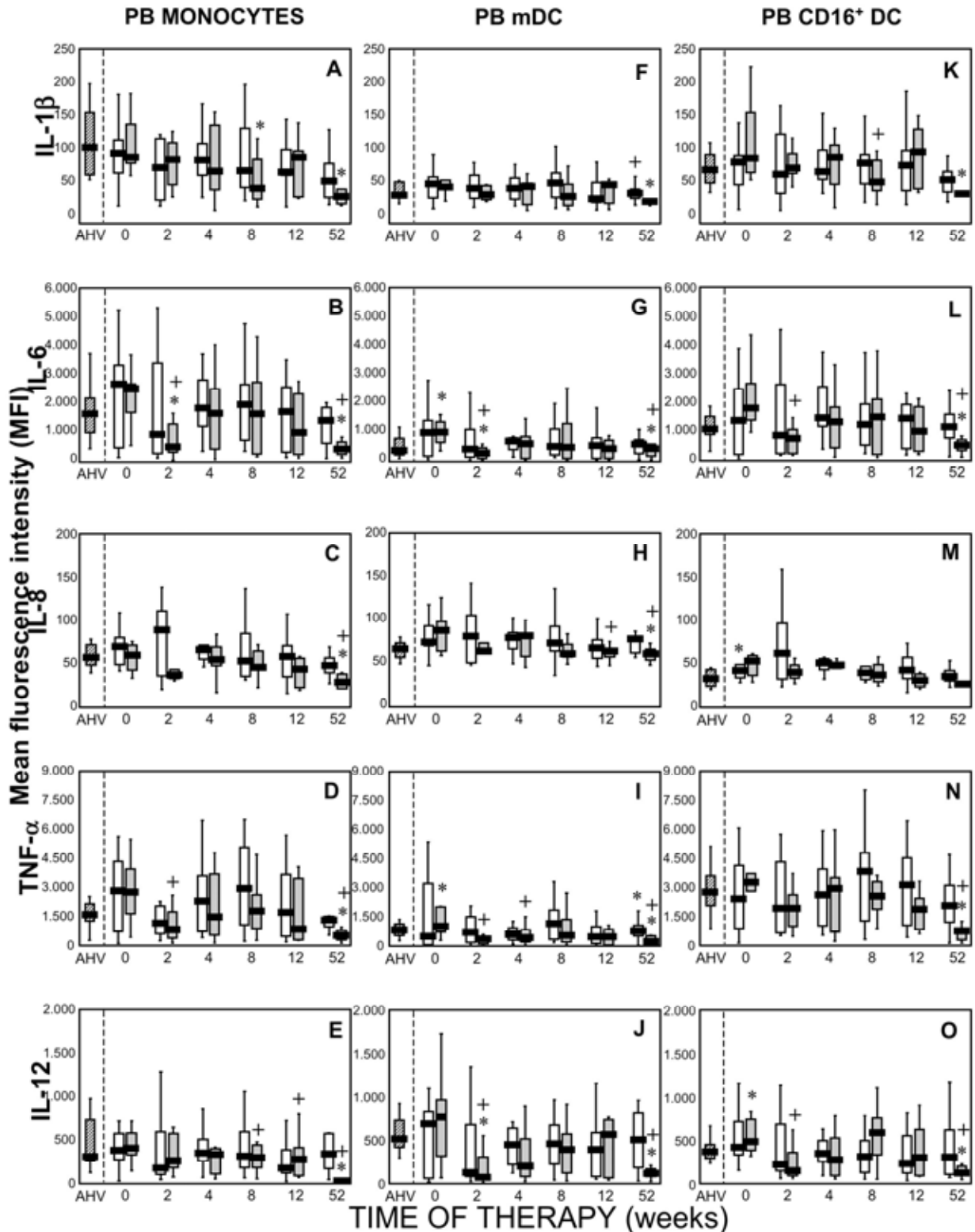


Fig. (3). Amount of inflammatory cytokines produced by LPS+IFN γ -stimulated PB monocytes and DC of myeloid origin (mDC and CD16⁺ DC) from HIV-1+ infected patients, grouped according to the absolute number of CD4⁺ T-cells in PB, prior to therapy (time 0) and at weeks +2, +4, +8, +12 and +52 after starting antiretroviral therapy (ART). Panels A to O show the ART-induced time-dependent variations on the mean amount of cytokines produced per PB monocyte and DC, measured as mean fluorescence intensity (MFI; arbitrary units scaled from 0 to 1024). Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively. Hatched boxes correspond to AHV. White boxes and grey boxes represent HIV-1+ patients with extremely low (<200 CD4⁺ T-cells/ μ l) and low (>200 CD4⁺ T-cells/ μ l) PB CD4⁺ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively.

*: $p \leq 0.05$ vs adult healthy volunteers (AHV).

+: $p \leq 0.05$ vs basal levels (time 0).

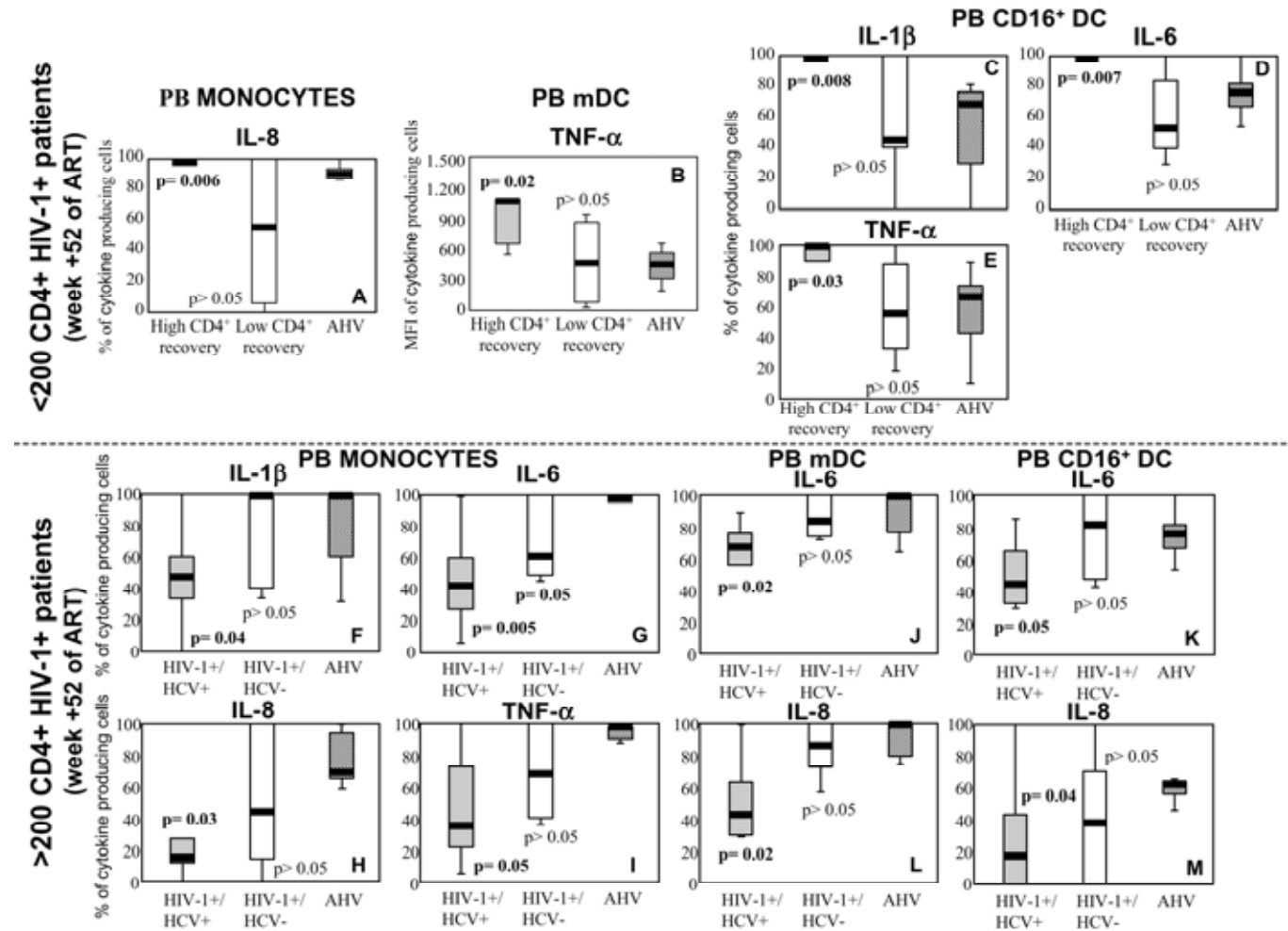


Fig. (4). Cytokine production by PB monocytes and DC of myeloid origin (mDC and CD16+ DC) at week +52 of ART after *in vitro* stimulation with LPS+IFN- γ in <200 CD4+ HIV-1+ patients (grouped according to the degree of recovery of CD4+ T-cell counts in PB after one year of ART), in >200 CD4+ HIV-1+ patients (grouped according to the existence or not of hepatitis C virus (HCV) co-infection), and in adult healthy volunteers (AHV). Notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and the 10th and 90th percentiles, respectively. In panels A to E, grey boxes and white boxes represent <200 CD4+ HIV-1+ patients with high and low CD4+ T-cell recovery, respectively; hatched boxes correspond to AHV. In panels F to M, grey boxes represent >200 CD4+ HIV-1+ patients co-infected with HCV (HIV-1+/HCV+) and white boxes represent >200 CD4+ HIV-1+ patients not co-infected with HCV (HIV-1+/HCV-); hatched boxes correspond to AHV.

Our results showed that among the <200 CD4 HIV-1+ individuals, only those cases who had a high recovery of CD4+ T-cells in PB (56% of the cases; mean CD4+ T-cell recovery ratio of 54±24) had both a significantly increased proportion of IL-1 β , IL-6 and TNF- α -producing PB CD16+ DC and of IL-8-producing PB monocytes, as well as an increased mean amount of TNF- α produced per mDC, no significant differences from AHV being found for the <200 CD4 HIV-1+ patients with a low CD4+ T-cell recovery (44% of the cases; mean CD4+ T-cell recovery ratio of 2.9±0.9) (Fig. 4A-E). It should be noted that the increased production of inflammatory cytokines was not influenced by the presence of HCV co-infection in this group of patients (data not shown).

All >200 CD4 HIV-1+ patients showed a relatively low recovery of their CD4+ T-lymphocyte counts (mean CD4+ T-cell recovery ratio of 1.7±0.7). Interestingly however, the percentage of stimulated PB monocytes that produced IL-1 β , IL-8 and TNF- α at week +52 of ART was significantly reduced among those >200 CD4 HIV-1+ individuals who were co-infected with HCV, while it was normal for the HIV-1+/HCV- cases (Fig. 4F,H,I); only the proportion of IL-6-producing PB monocytes was found to be significantly reduced in both HCV+ and HCV- individuals within the >200 CD4 HIV-1+

patient group (Fig. 4G). Similarly, reduced percentage of IL-6 and IL-8-producing PB mDC and CD16+ DC at week +52 of ART was also restricted to those >200 CD4 HIV-1+ patients who were co-infected with HCV (Fig. 4J-M). It should be noted that the significantly increased percentage of IL-12-producing mDC found at week +52 of ART for the >200 CD4 HIV-1+ patients was restricted to those cases not co-infected with HCV (p=0.03 vs AHV), being normal for HCV co-infected patients (82±18 vs 58±24 for >200 CD4 HIV-1+/HCV- and >200 CD4 HIV-1+/HCV+ cases, respectively). Regarding the significantly reduced mean amount of cytokines produced –measured as MFI values– by these cell subsets after one year of ART for the >200 CD4 HIV-1+ patients, only the mean amount of IL-6 produced by PB monocytes, mDC and CD16+ DC and that of IL-12 produced by CD16+ DC, were found to be significantly reduced among those patients co-infected with HCV (p≤0.01 vs AHV), while they were normal for the >200 CD4 HIV-1+/HCV- cases; no differences were found between >200 CD4 HIV-1+/HCV+ and >200 CD4 HIV-1+/HCV- cases regarding the mean amount of cytokine produced per cell for the other cytokines and/or cell subsets analyzed (data not shown). However, it should be noted that although the mean amount of IL-12 produced per mDC at week +52 of therapy was

significantly reduced for both the >200 CD4 HIV-1+/HCV+ and >200 CD4 HIV-1+/HCV- cases, those patients co-infected with HCV showed a trend to have a more markedly decreased production of IL-12 by mDC (37±12; $p=0.004$ vs AHV) than the >200 CD4 HIV-1+/HCV- cases (149±180; $p=0.03$ vs AHV). Although ART was unable to restore the number of CD4+ T-cells in PB towards normal levels after one year of therapy, those >200 CD4 HIV-1+ patients who were HCV- showed a trend ($p=0.16$) to have a better overall recovery of CD4+ T-cell counts than HCV+ cases: 448±129 vs 308±112 CD4+ T-cells/μl of PB, respectively.

Plasma concentration of inflammatory cytokines and its relationship with the percentage of cytokine producing PB monocytes and DC of myeloid origin: Overall, no statistically significant differences were observed in the plasma concentration of the inflammatory cytokines analyzed, neither between the two HIV-1+ patient groups nor among the different time-points evaluated (time 0 and weeks +12 and +52 of ART), except for a transiently increased concentration of sIL-12 at week +12 detected among the <200 CD4 patients ($p=0.05$) (Table 3). Despite this, clear correlations were observed between the plasma concentration of specific cytokines and the percentage and/or the MFI of cytokine-producing monocytes and/or DC of myeloid origin in PB. Accordingly, prior to ART a negative correlation was found between the concentration of sIL-8 in plasma and the percentage of stimulated PB CD16+ DC producing IL-8 for the <200 CD4 group ($r^2: -0.51$; $p=0.03$) (Fig. 5A). Of note, both the percentage as well as the absolute number of IL-8-producing CD16+ DC were found to be within normal values for <200 CD4 HIV-1+ patients before starting ART ($p>0.05$): 40±46 vs 60±7 and 20±30 vs 27±8 for the percentage and the absolute number (cells/μl) of IL-8-producing cells among <200 CD4 HIV-1+ patients and AHV, respectively. Interestingly however, in this HIV-1+ patient group a strong positive correlation was found between the concentration of sIL-8 in plasma and the mean amount of IL-8 produced per CD16+ DC at this time point ($r^2: 0.86$; $p=0.001$) (Fig. 5B). It should be noted that the mean amount of IL-8 produced per CD16+ DC was significantly increased for <200 CD4 HIV-1+ patients prior to therapy ($p=0.04$ vs AHV). During therapy (week +12 and week +52 of ART), the percentage of IL-12+/CD16+ DC showed a direct correlation with sIL-12 plasma levels for the <200 CD4 patients ($r^2: 0.44$; $p=0.02$) (Fig. 5C), whereas we found a negative correlation between the concentration of sIL-8 in plasma and the percentage of IL-8-producing PB monocytes for the >200 CD4 HIV-1+ patients during ART ($r^2: -0.46$; $p=0.03$) (Fig. 5E); of note, both the percentage and the absolute number of IL-8-producing monocytes, as well as the mean amount of IL-8 produced per monocyte were significantly decreased ($p\leq 0.02$) among >200 CD4 patients at week +52 of ART: 28±33 vs 88±13, 99±124 vs 353±99, and 27±3 vs 68±32, for the percentage, absolute number (cells/μl) and mean amount (MFI) of IL-8 produced per monocyte for the >200 CD4 HIV-1+ patients and AHV, respectively. After one year of therapy, strong positive correlations were found between the amount of sIL-8 and both the percentage of stimulated PB CD16+ DC producing IL-8 ($r^2: 0.85$; $p=0.007$) (Fig. 5D), and the mean amount of IL-8 produced per mDC ($r^2: 0.84$; $p=0.04$) (Fig. 5F), for the <200 CD4 and the >200 CD4 HIV-1+ patient groups, respectively.

DISCUSSION

HIV-1 infection has been associated with significant dysregulation of the cytokine network, which contributes to the pathogenesis of HIV-1/AIDS disease by impairing cell-mediated immunity [3, 5, 12, 23]. Since APC play a crucial role in the stimulation of T-cell dependent immune responses through secretion of cytokines [46], the existence of abnormalities in the ability of stimulated APC to produce cytokines could be partially responsible for the functional impairment of T-cells observed in HIV-1+ patients. In line with this, we observed an increased production of IL-12 by *in vitro* stimulated PB mDC and CD16+ DC from HIV-1+ patients showing >200 CD4+ T-cells/μl of

PB; in addition, increased production of IL-6 and TNF- α by

LPS+IFN- γ -stimulated PB mDC and of IL-8 by stimulated CD16+ DC, was also detected in this patient group prior to ART, whereas PB CD16+ DC from <200 CD4 HIV-1+ patients showed production of increased amounts of IL-8. In turn, production of all inflammatory cytokines analyzed by PB monocytes was within the normal range, independently of the PB CD4+ T-cell counts.

Currently, the effect of HIV-1 infection on DC functionality is poorly understood, and conflicting data exists about the ability of HIV-1-infected DC or DC isolated from HIV-1+ patients to produce cytokines after stimulation with CD40L and/or LPS [9, 15, 22, 26, 35, 42], which might be due, among other reasons, to the existence of significant differences between the level of DC infection, the type of stimuli used, the purity and maturation status of the DC analyzed, or the cohort of patients studied. It should be noted that the majority of studies performed used PB monocytes differentiated into DC after cultured in the presence of high concentrations of GM-CSF and IL-4, which likely affect DC functionality; in contrast, we analyzed the pattern of production of inflammatory cytokines by LPS+IFN- γ -stimulated PB DC *ex vivo*, which probably reflects more closely what occurs *in vivo*. On the other hand, our results confirm previous observations showing an increased production of IL-12 by LPS-stimulated whole-blood cells from asymptomatic HIV-1+ patients [25], as well as from CD40L-stimulated MDDC either infected *in vitro* with HIV-1 or exposed to gp-120 [22, 48], providing evidence that increased production of IL-12 could be specifically associated with cases showing higher (>200 cells/μl) CD4+ T-cell counts in PB; in turn, our results argue against the possibility that PB DC could be potential candidates contributing to the deficit of IL-12 observed in HIV-1+ disease, as previously hypothesized [15].

Although the introduction of ART has led to decreased mortality and morbidity rates among HIV-1+ individuals, immune recovery is not complete in ART-treated patients [21, 45]. Persistent dysregulation of APC functions might contribute to the incomplete recovery of the immune system in HIV-1+ patients receiving ART. To our knowledge, this is the first study in which the effects of ART on the ability of PB stimulated-monocytes and DC of myeloid origin from HIV-1+ patients to produce inflammatory cytokines are investigated at the single cell level, allowing the analysis of the kinetics of those functional changes in the cytokine production profile occurring in these cell subsets. Overall, no substantial changes were observed early after starting ART, except for an early transient drop in IL-6 and IL-12 production by both PB monocytes and mDC from less immunocompromised cases, and an increased proportion of IL-1 β -producing PB CD16+ DC from week +2 of ART for the <200 CD4+ patients. From this time-point on, no major changes were detected until the last follow-up time-points, marked differences being observed at week +52 of ART between both HIV-1+ patient groups as regards cytokine production by PB monocytes and DC of myeloid origin. Interestingly, the increased proportion of both IL-1 β , IL-6 and TNF- α -producing PB CD16+ DC and IL-8-producing PB monocytes, as well as the increased amount of TNF- α produced by PB mDC observed after one year of ART, was exclusively restricted to those <200 CD4 HIV-1+ individuals showing a high recovery of CD4+ T-cell counts in PB. In line with this, reduced production of inflammatory cytokines by LPS-stimulated whole-blood cells has recently been associated with disease progression and increased mortality risk in HIV-1+ patients [31], suggesting that the increased production of inflammatory cytokines found in HIV-1+ patients with higher recovery of CD4+ T-cell numbers could reflect an improved ability of PB monocytes and DC to respond to an exogenous stimulus. In contrast, production of inflammatory cytokines by stimulated PB monocytes and DC of myeloid origin was found to be significantly decreased at week +52 of ART for the less immunocompromised (>200 CD4) HIV-1+ patients; interestingly, this finding was clearly related to the co-existence of HCV infection in the case of the percentages of cytokine-producing cells, the proportion of inflammatory cytokine-

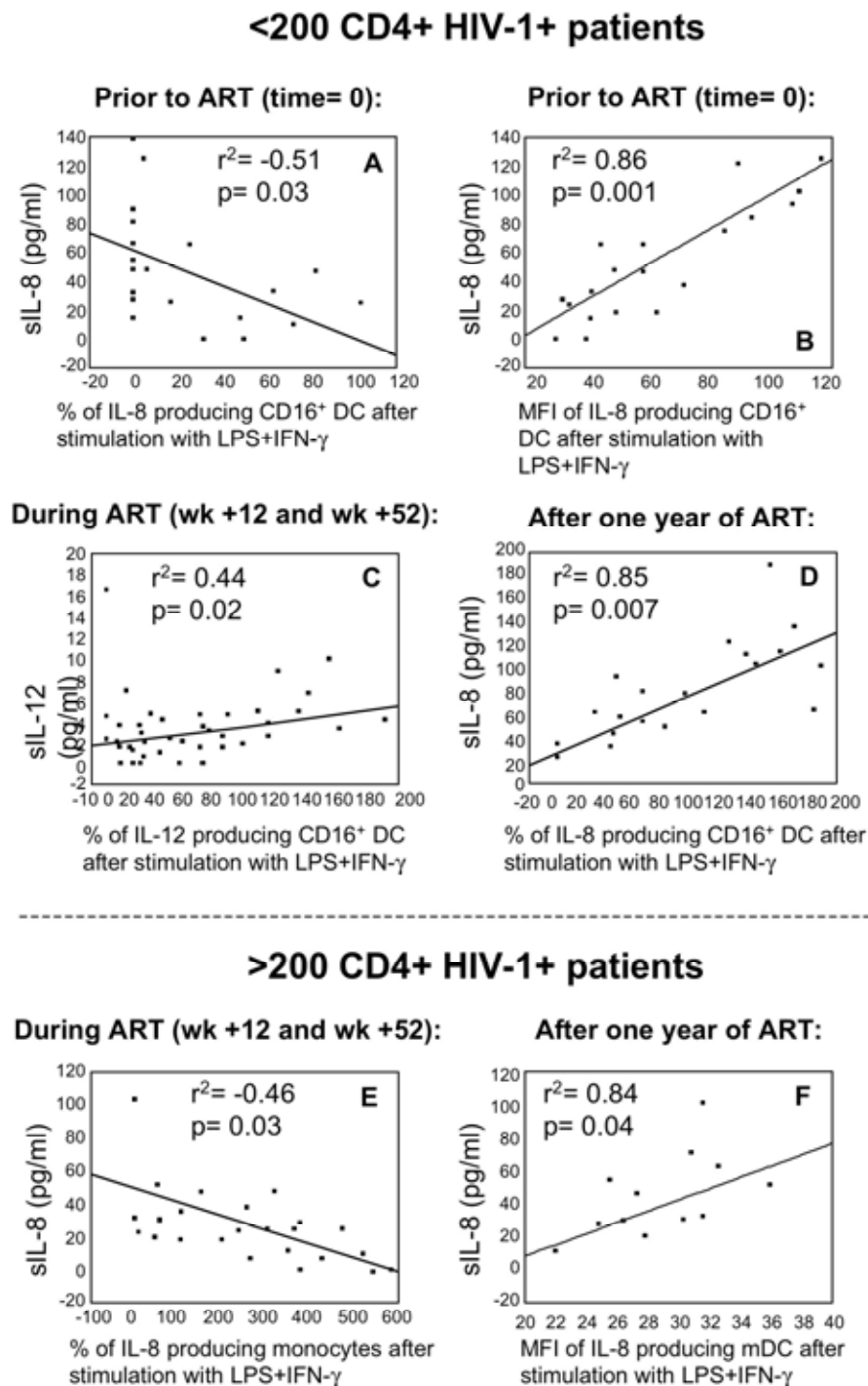


Fig. (5). Correlation between the concentration of inflammatory cytokines in plasma and the percentage of cytokine producing PB monocytes and DC of myeloid origin and/or the mean amount of cytokines produced per cell, after *in vitro* stimulation with LPS+INF γ , among HIV-1 infected patients grouped according to the absolute number of CD4+ T-cells in PB. Panels A and B display the correlations found prior to ART for the <200 CD4 HIV-1+ patients between soluble (s)IL-8 plasma levels and both the percentage of IL-8-producing PB CD16+ DC and the mean amount of IL-8 produced per CD16+ DC. Panels C and D show the correlations observed for the <200 CD4 HIV-1+ patients between sIL-12 plasma levels and the percentage of IL-12-producing PB CD16+ DC during ART, and between sIL-8 in plasma and the percentage of IL-8 producing PB CD16+ DC at week +52 of ART, respectively. In panels E and F the correlations found for the >200 CD4 HIV-1+ patients between sIL-8 and both the percentage of IL-8-producing PB monocytes during ART, and the mean amount of IL-8 produced per mDC at week +52 of ART, are shown.

producing cells being within the normal range for the non-co-infected cases. Despite discrepant results have been reported [25, 43], impairment of the maturation and functionality of DC from chronic HCV+

individuals has been observed [6, 19, 20], and the functional abnormalities of APC have been proposed to play a role in the persistence of HCV infection [19]. The effect of HCV co-infection on the outcome of HIV-1+ patients treated with ART remains controversial and is supported by few data [18, 43, 44]. Since HCV infection induces

Table 3. Plasma Concentration of Soluble Cytokines in HIV-1+ Patients Treated with Antiretroviral Therapy (ART)

Cytokine	HIV-1+ patient group	Amount of cytokine (pg/ml)		
		Prior to ART (time 0)	Week +12 of ART	Week +52 of ART
IL-1 β	<200 CD4+ T-cells/ μ l	59 \pm 155	101 \pm 265	29 \pm 18
	>200 CD4+ T-cells/ μ l	17 \pm 22	24 \pm 19	23 \pm 20
IL-6	<200 CD4+ T-cells/ μ l	6.1 \pm 12	12 \pm 24	1.4 \pm 2.8
	>200 CD4+ T-cells/ μ l	1.6 \pm 5.4	<0.1*	<0.1*
IL-8	<200 CD4+ T-cells/ μ l	52 \pm 40	68 \pm 70	62 \pm 55
	>200 CD4+ T-cells/ μ l	34 \pm 32	15 \pm 12	44 \pm 30
TNF- α	<200 CD4+ T-cells/ μ l	1.6 \pm 3.6	2 \pm 4	0.6 \pm 1.7
	>200 CD4+ T-cells/ μ l	1.8 \pm 3.6	1.5 \pm 4	1.5 \pm 2.4
IL-12	<200 CD4+ T-cells/ μ l	7.3 \pm 23	27 \pm 90*	3.1 \pm 3.1
	>200 CD4+ T-cells/ μ l	1 \pm 1.5	2 \pm 1.9	1.7 \pm 2

Results are expressed as mean \pm one standard deviation.

* $p \leq 0.05$ as compared to time 0.

†constantly undetectable.

an hyperactivation of the immune system [29], and ART does not reduce HCV replication [34], it could be expected that the immune activation promoted by HCV co-infection would persist in HIV-1+ patients receiving ART. Therefore, this could lead to immunologic exhaustion upon further stimulation of DC subsets of myeloid origin and monocytes, which might explain the reduced proportion of cells that produced inflammatory cytokines after stimulation *in vitro* with LPS+IFN- γ observed for the >200 CD4 HIV-1+/HCV+ patients. In line with this, it should be noted that none of the patients included in this study received specific treatment for HCV infection, and that a clear increase in the plasma HCV RNA load was observed for these patients at week +52 of ART ($p = 0.1$). These findings, together with the inhibitory effects of ART on HIV replication, could also contribute to explain why the effects of HCV co-infection on DC function only became evident after ART. Further studies in which HIV-1+/HCV+ patients receiving both ART and anti-HCV therapy are included, together with a control group consisting of HIV-1/HCV+ patients, will contribute to clarify the precise role of HCV on cytokine production by LPS+IFN- γ -stimulated APC in these patients. In contrast with the >200 CD4 HIV-1+/HCV+ group, we did not find a decreased proportion of cytokine-producing PB monocytes and/or DC of myeloid origin for the >200 CD4 HIV-1+/HCV- patients. Based on this observation, it could be hypothesized that in those patients in whom HIV-1 infection is likely to be more resolved, such as in less immunocompromised (>200 CD4) patients, the negative effects related to HCV co-infection would be more pronounced.

Initiation of ART led to a significant increase in the proportion of IL-12-producing DC of myeloid origin. This behavior was observed for both stimulated PB mDC and CD16+ DC from weeks +8 and +12 on, respectively, in both the >200 CD4 and <200 CD4 HIV-1+ patient groups. The increased proportion of IL-12-producing PB mDC and CD16+ DC observed after one year of ART for both patient groups might reflect an improvement in terms of immune function, since a strong Th-1 response, essential for the induction of cellular responses against intracellular infections, could be generated. Moreover, IL-12 has been shown to down-regulate expression of the CCR5 HIV-1 co-receptor in human T-lymphocytes through the induction of β -chemokines [47]; therefore, high levels of IL-12 might help to prevent infection of T-lymphocytes with macrophage-tropic strains of HIV-1. In line with this hypothesis, during ART IL-12 production by PB stimulated-CD16+ DC showed a significant correlation with the plasma concentration of sIL-12, which would support a major role for this cell subset in producing IL-12 in <200 CD4 HIV-1+ infected individuals under ART. However, it should be noted that although the percentage of IL-12-producing PB mDC and CD16+ DC was increased for the >200 CD4 HIV-1+ patients at week +52 of therapy, the mean amount of IL-12 produced per mDC and CD16+ DC was significantly diminished in comparison with AHV; again, this effect

was related to the presence of co-infection of HCV. Thus, we could hypothesize that in those less immunocompromised HIV-1+ patients (>200 CD4) co-infected with HCV, the immune system is able to respond to an exogenous stimulus such as LPS or IFN- γ in terms of increasing the proportion of IL-12-producing cells, however the magnitude of the response (measured as the mean amount of IL-12 produced per cell) is not adequate.

We also found clear correlations, before and after starting therapy, between the presence of sIL-8 in plasma and both the percentage of cytokine producing cells as well as the mean amount of cytokine produced per cell. Accordingly, prior to ART a negative correlation was observed between the concentration of sIL-8 in plasma and the percentage of IL-8-producing CD16+ DC for the <200 CD4 HIV-1+ patients; however, sIL-8 levels correlated directly with the mean amount of IL-8 produced per CD16+ DC in this patient group. This could reflect that the presence of sIL-8 in plasma might not be due to an increased proportion of IL-8-producing cells, but to greater amounts of IL-8 produced by a reduced number of circulating CD16+ DC. Similarly, the major sources of sIL-8 in plasma after one year of ART seemed to be the CD16+ DC and the mDC subsets for the <200 CD4 and >200 CD4 HIV-1+ patient groups, respectively. In contrast, the negative correlation observed between sIL-8 in plasma and the percentage of IL-8-producing PB monocytes for the >200 CD4 HIV-1+ patients during ART could indicate that monocytes are not major contributors to the presence of sIL-8 in plasma in these patients. The absence of significant correlations between cytokine producing cells and the plasma concentration of the other inflammatory cytokines analyzed –except for sIL-12– might reflect that these cytokines are maintained in plasma for shorter periods of time than sIL-8.

As expected, no significant differences were found between spontaneous and stimulated production of inflammatory cytokines by pDC, reflecting that the combined use of LPS+IFN- γ might not be an appropriate stimulus to induce cytokine production by pDC. In fact, it has been shown that pDC do not respond well to IFN- γ , while they show higher survival rate in the presence of IL-3 and other stimuli, such as enveloped virus and oligodeoxynucleotides (ODNs) [30].

In summary, our results show the existence of abnormalities in the production of inflammatory cytokines by PB-stimulated monocytes, mDC and CD16+ DC in HIV-1+ individuals after one year of ART, which are associated with the recovery of CD4+ T-cell counts in <200 CD4 HIV-1+ individuals and the presence of HCV co-infection in cases with >200 CD4+ T-cells/ μ l in PB.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been partially supported by grants from MSD España S.A. and BMS S.L., as well as by the grant (SAF02-03096)

from the Ministerio de Ciencia y Tecnología/FONDOS FEDER (Madrid, SPAIN).

We also thank Prof. Miguel Ángel del Pozo from the Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínico de Valladolid and Universidad de Valladolid (Valladolid, SPAIN) for his kind collaboration with this study by sending samples from HIV-1 infected patients, and Dr. Jesús Iglesias from the Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, SPAIN) for his contribution with the virologic studies.

M.A. is a recipient of a grant from the Ministerio de Educación y Ciencia. (Madrid, SPAIN) (Ref. AP2000-3818).

REFERENCES

- [1] Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, Canizo MC, Fernandez ME, Vaquero JM, Laso FJ, Escribano L, San Miguel JF, Orfao A. (1999). Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II⁺ lineage⁺ cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 118: 392-401.
- [2] Almeida J, Bueno C, Alguero MC, Sanchez ML, de Santiago M, Escribano L, Diaz-Agustin B, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF, Orfao A. (2001). Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypic, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clinical Immunology*. 100: 325-338.
- [3] Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. (2005). Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *AIDS*. 19: 261-271.
- [4] Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. (2006). Persistent abnormalities in peripheral blood dendritic cells and monocytes from HIV-1⁺ patients after one year of antiretroviral therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 41: 405-415.
- [5] Amirayan-Chevillard N, Tissot-Dupont H, Capo C, Brunet C, Dignat-George F, Obadia Y, Gallais H, Mege JL. (2000). Impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on cytokine production and monocyte subsets in HIV-infected patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 120: 107-112.
- [6] Anthony DD, Yonkers NL, Post AB, Asaad R, Heinzel FP, Lederman MM, Lehmann PV, Valdez H. (2004). Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *Journal of Immunology*. 172: 4907-4916.
- [7] Banchereau J, Steinman RM. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392: 245-252.
- [8] Bueno C, Almeida J, Alguero MC, Sanchez ML, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF, Escribano L, Orfao A. (2001). Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry*. 46: 33-40.
- [9] Chounet C, Cohen SS, Kawamura T, Landay AL, Kessler HA, Thomas E, Blauvelt A, Shearer GM. (1999). Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy. *Journal of Immunology*. 163: 1666-1673.
- [10] Donaghy H, Gazzard B, Gotch F, Patterson S. (2003). Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood*. 101: 4505-4511.
- [11] Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J. (2000). BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology*. 165: 6037-6046.
- [12] Emilie D, Galanaud P. (1998). Cytokines and chemokines in HIV infection: implications for therapy. *International Reviews of Immunology*. 16: 705-726.
- [13] Engering A, Van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. (2002). Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood*. 100: 1780-1786.
- [14] Fagnoni FF, Oliviero B, Zibera C, Gibelli N, Lozza L, Vescovini R, Sansoni P, Zambelli A, DaPrada G, and Robustelli della Cuna G. (2001). Circulating CD33⁺ large mononuclear cells contain three distinct populations with phenotype of putative antigen-presenting cells including myeloid dendritic cells and CD14⁺ monocytes with their CD16⁺ subset. *Cytometry*. 45: 124-132.
- [15] Fantuzzi L, Purificato C, Donato K, Belardelli F, Gessani S. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *Journal of Virology*. 78: 9763-9772.
- [16] Grage-Griebenow E, Zawatzky R, Kahlert H, Brade L, Flad H, Ernst M. (2001). Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *European Journal of Immunology*. 31: 48-56.
- [17] Granelli-Piperno A, Delgado E, Finkel V, Paxton W, Steinman RM. (1998). Immature dendritic cells selectively replicate Macrophage-tropic (M-Tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-Tropic virus to T cells. *Journal of Virology*. 72: 2733-2737.
- [18] Greub G, Ledergerber B, Battegay M, Grob P, Perrin L, Furrer H, Burgisser P, Erb P, Boggian K, Piffaretti JC, Hirschel B, Janin P, Francioli P, Flepp M, Telenti A. (2000). Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet*. 356: 1800-1805.
- [19] Kanto T, Hayashi N, Tekehara T, Tatsumi T, Kuzushita N, Ito A, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M. (1999). Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *Journal of Immunology*. 162: 5584-5591.
- [20] Kanto T, Inoue M, Miyatake H, Sato A, Sakakibara M, Yakushijiin T, Oki C, Itoe I, Hiramatsu N, Takehara T, Kasahara A, Hayashi N. (2004). Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *Journal of Infectious Diseases*. 190: 1919-1926.
- [21] Kaufmann GR, Bloch M, Zaunders JJ, Smith D, Cooper DA. (2000). Long-term immunological response in HIV-1-infected subjects receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS*. 14: 959-969.
- [22] Kawamura T, Gatanaga H, Borris DL, Connors M, Mitsuya H, Blauvelt A. (2003). Decreased stimulation of CD4⁺ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells. *Journal of Immunology*. 170: 4260-4266.
- [23] Kedzierska K, Crowe SM. (2001). Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. 12: 133-150.
- [24] Knight SC. (2001). Dendritic cells and HIV infection; immunity with viral transmission versus compromised cellular immunity? *Immunobiology*. 204: 614-621.
- [25] Longman RS, Talal AH, Jacobson IM, Albert ML, Rice CM. (2004). Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood*. 103: 1026-1029.
- [26] Lore K, Sonnerborg A, Olsson J, Patterson BK, Fehniger TE, Perbeck L, Andersson J. (1999). HIV-1 exposed dendritic cells show increased pro-inflammatory cytokine production but reduced IL-1ra following lipopolysaccharide stimulation. *AIDS*. 13: 2013-2021.
- [27] MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. (2002). Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 100: 4512-4520.
- [28] MacDougall TH, Shattock RJ, Madsen C, Chain BM, Katz DR. (2002). Regulation of primary HIV-1 isolate replication in dendritic cells. *Clinical and Experimental Immunology*. 127: 66-71.
- [29] Macias J, Sanchez-Quijano A, Pineda JA, Abad MA, Rubio A, Rosa R, Leal M, Lissen E. (2001). Minimal liver injury in chronic hepatitis C virus infection is associated with low levels of soluble TNF-alpha/Fas receptors and acquisition in childhood. *Liver*. 21: 410-414.
- [30] McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. (2005). Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *Journal of Virology*. 79: 17-27.
- [31] Ostrowski SR, Gerstoft J, Pedersen BK, Ullum H. (2003). Impaired production of cytokines is an independent predictor of mortality in HIV-1-infected patients. *AIDS*. 17: 521-530.
- [32] Palucka AK, Laupeze B, Asford C, Saito H, Jego G, Fay J, Paczesny S, Pascual V, Banchereau J. (2005). Immunotherapy via dendritic cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 560: 105-114.
- [33] Paul WE, Seder RA. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 76: 241-251.
- [34] Puoti M, Gargiulo F, Roldan EQ, Chiodera A, Palvarini L, Spinetti A, Zalttron S, Putzolu V, Zanini B, Favilli F, Turano A, Carosi G. (2000). Liver damage and kinetics of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus replication during the early phases of combination antiretroviral treatment. *Journal of Infectious Diseases*. 181: 2033-2036.
- [35] Quaranta MG, Tritarelli E, Giordani L, Viora M. (2002). HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4⁺ T cell activation. *Experimental Cell Research*. 275: 243-254.
- [36] Reid SD, Penna G, Adorini L. (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Current Opinion in Immunology*. 12: 114-121.
- [37] Rivas-Carvalho A, Meraz-Rios MA, Santos-Argumedo L, Bajana S, Soldevila G, Moreno-Garcia ME, Sanchez-Torres C. (2004). CD16⁺ human monocyte-derived dendritic cells matured with different and unrelated stimuli promote similar allogeneic Th2 responses: regulation by pro- and anti-inflammatory cytokines. *International Immunology*. 16: 1251-1263.
- [38] Rodríguez-Caballero A, Garcia-Montero AC, Bueno C, Almeida J, Varro R, Chen R, Pandiella A, Orfao A. (2004). A new simple whole blood flow cytometry-based method for simultaneous identification of activated cells and quantitative evaluation of cytokines released during activation. *Laboratory Investigation*. 84: 1387-1398.
- [39] Sapp M, Engelmayr J, Larsson M, Granelli-Piperno A, Steinman R, Bhardwaj N. (1999). Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunology Letters*. 66: 121-128.
- [40] Schakel K, Mayer E, Federle C, Schmitz M, Riethmuller G, Rieber EP. (1998). A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and *in vitro* priming of cytotoxic T lymphocytes. *European Journal of Immunology*. 28: 4084-4093.
- [41] Sewell AK, Price DA. (2001). Dendritic cells and transmission of HIV-1. *Trends in Immunology*. 22: 173-175.
- [42] Smed-Sorensen A, Lore K, Walther-Jallow L, Andersson J, Spetz AL. (2004). HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but

- fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood*. 104: 2810-2817.
- [43] Stebbing J, Patterson S, Portsmouth S, Thomas C, Glassman R, Wildfire A, Gotch F, Bower M, Nelson M, Gazzard B. (2004). Studies on the allostimulatory function of dendritic cells from HCV-HIV-1 co-infected patients. *Cell Research*. 14: 251-256.
- [44] Stylianou E, Bjerkeli V, Yndestad A, Heggelund L, Waehre T, Damas JK, Aukrust P, SS Froland SS. (2003). Raised serum levels of interleukin-18 is associated with disease progression and may contribute to virological treatment failure in HIV-1-infected patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 132: 462-466.
- [45] Valdez H, Connick E, Smith KY, Lederman MM, Bosch RJ, Kim RS, St Clair M, Kuritzkes DR, Kessler H, Fox L, Blanchard-Vargas M, Landay A; AIDS Clinical Trials Group Protocol 375 Team. (2002). Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS*. 16: 1859-1866.
- [46] Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood*. 106: 2252-2258.
- [47] Wang J, Guan E, Roderiquez G, Norcross MA. (1999). Inhibition of CCR5 expression by IL-12 through induction of beta-chemokines in human T lymphocytes. *Journal of Immunology*. 163: 5763-5769.
- [48] Williams MA, Trout R, Spector SA. (2002). HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research*. 11: 829-847.

Received: August 8, 2006

Revised: December 29, 2006

Accepted: January 3, 2007

Relación entre la expresión de CD38 en linfocitos T y monocitos de sangre periférica y la respuesta al tratamiento antirretroviral (TAR): estudio longitudinal de una serie de pacientes VIH-1⁺ en fase crónica no tratados previamente con TAR.

INTRODUCCIÓN: Los linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ de sangre periférica (SP) de individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) expresan la molécula CD38 en su superficie de forma significativamente más intensa que los linfocitos T normales en situación basal, lo que a su vez se ha relacionado con un pronóstico adverso en pacientes VIH-1⁺ no tratados con tratamiento antirretroviral (TAR). A pesar de que la administración del TAR conlleva una disminución de los niveles de CD38 en linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ de SP, el tratamiento no consigue restablecer los valores normales de expresión de dicho marcador de activación en ambas poblaciones linfocitarias. Por el contrario, el estudio de la expresión de CD38 en monocitos de SP de pacientes VIH-1⁺, así como los cambios inducidos por el TAR sobre la misma, han recibido menor atención.

OBJETIVO: En el presente trabajo hemos cuantificado la expresión de CD38 en linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y monocitos de SP de un grupo de pacientes VIH-1⁺ en fase crónica de la infección y que no habían sido tratados previamente con TAR. Asimismo, hemos estudiado de manera prospectiva los cambios inducidos por el TAR, a corto y a largo plazo, sobre la cantidad de moléculas CD38 expresadas en las tres subpoblaciones celulares de SP referidas.

MATERIAL Y MÉTODOS: Hemos analizado un total de 30 pacientes VIH-1⁺, agrupados de acuerdo al número absoluto de linfocitos T CD4⁺ en SP en el momento de su inclusión en el estudio, en: 19 pacientes con <200 células CD4⁺/μl y 11 pacientes con >200 células CD4⁺/μl de SP. Los estudios realizados se llevaron a cabo de forma previa a la instauración del TAR, y a las 2, 4, 8, 12 y 52 semanas desde el inicio del mismo. Además, como controles se analizaron en paralelo muestras de SP de 10 adultos sanos (AS). La identificación y recuento de linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ y de monocitos se realizó a partir de muestras de SP lisada de hematíes mediante técnica de inmunofluorescencia directa evaluada

por citometría de flujo, tras el marcaje de las células con anticuerpos monoclonales en combinaciones cuádruples y utilizando microesferas fluorescentes a una concentración conocida, para lograr una mayor precisión en el recuento de las poblaciones celulares (método de plataforma única). Para la cuantificación de la expresión de CD38 en unidades ABC (del inglés “*antibody binding capacity*”) en cada población celular de SP, se empleó técnica de citometría de flujo, tras marcaje de las muestras de SP con CD3/CD38/CD8/CD4; para la cuantificación del número de moléculas de CD38 expresadas por célula se utilizó el reactivo *QuantiBRITE™* (Becton Dickinson Biosciences –BDB–, San José, CA) y el programa informático *QuantiCALC™* (BDB). Con el fin de analizar la posible asociación entre la expresión de CD38 –en linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺ y monocitos de SP– y la respuesta a la terapia, realizamos un análisis jerárquico de “*clusters*” mediante el programa J-Express Pro V2.1 (MolMine AS, Bergen, Norway); en esta parte del estudio se incluyeron en el análisis las siguientes variables: número absoluto de moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T CD8⁺, en las células T CD4⁺ y en los monocitos previamente al inicio del TAR, y los cocientes obtenidos específicamente para cada una de estas variables entre la semana 2 de tratamiento y el día 0 y entre la semana 4 de tratamiento y el día 0.

RESULTADOS: Nuestros resultados mostraron que de forma previa al inicio del TAR, la expresión de CD38 estaba significativamente aumentada tanto en los linfocitos T CD8⁺ como en los linfocitos T CD4⁺ y los monocitos de SP en ambos grupos de pacientes VIH-1⁺, definidos de acuerdo al número absoluto de células T CD4⁺ de SP ($p < 0.05$). Si bien tras el inicio del TAR se observó un descenso significativo de los niveles de CD38 –asociado a un incremento del número absoluto de linfocitos T CD8⁺ en el grupo de pacientes >200 células CD4⁺/μl SP–, la expresión de dicho antígeno –al igual que el número de linfocitos T CD8⁺– continuaba incrementada de forma anormal en los linfocitos T CD8⁺ de SP de pacientes VIH-1⁺ con carga viral indetectable, incluso después de un año de tratamiento ($p < 0.05$). Con respecto a la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4⁺ de SP, el inicio del TAR se asoció con un patrón de respuesta diferente para cada grupo de pacientes VIH-1⁺; así, mientras que en los pacientes más inmunocomprometidos (<200 células T CD4⁺/μl de SP), observamos un aumento significativo y transitorio del número de moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T CD4⁺

entre las semanas 2 y 4 de tratamiento, que se correlacionaba de forma directa con el incremento del número absoluto de linfocitos T CD4⁺ observado en dicho período ($p < 0.05$), en los pacientes con >200 células CD4⁺/μl de SP, la terapia produjo una disminución significativa y rápida de la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4⁺ ($p < 0.05$). Al año de tratamiento, la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4⁺ era normal en ambos grupos de pacientes VIH-1⁺.

Finalmente, el comienzo del TAR se asoció con un aumento del número de moléculas CD38 expresadas en los monocitos de SP hacia la segunda semana de tratamiento, en ambos grupos de pacientes VIH-1⁺, siendo más pronunciado entre los pacientes más inmunodeprimidos. En paralelo, ambos grupos de pacientes mostraron un ligero aumento del número absoluto de monocitos en SP. A pesar de que posteriormente el TAR consiguió reducir la expresión de CD38 en los monocitos de SP, ésta seguía estando anormalmente incrementada incluso después de un año de tratamiento ($p < 0.05$).

El análisis jerárquico de “clusters” confirmó la existencia de una clara asociación entre la expresión de CD38 en linfocitos T CD8⁺, células T CD4⁺ y monocitos de SP previamente al inicio del TAR, los cambios producidos sobre la misma al poco tiempo de iniciarse el tratamiento (entre las primeras 2 y 4 semanas), y la respuesta a la terapia –evaluada por la presencia o ausencia de carga viral en plasma tras 4 semanas de TAR–. Así, estos parámetros fenotípicos permitían clasificar a los pacientes en tres grupos: uno de mal pronóstico (el 88% de los casos incluidos en él tenían carga viral detectable en plasma tras 4 semanas de TAR), otro grupo de buen pronóstico (el 100% de los casos mostraban niveles de carga viral indetectable) y un tercer grupo compuesto por 7 casos, de los cuales 3 tenían carga viral detectable a la cuarta semana de tratamiento. Un análisis detallado de las características de cada uno de estos grupos de pacientes confirmó que en aquellos individuos VIH-1⁺ que presentaban un aumento más pronunciado de la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4⁺ y monocitos de SP al poco tiempo del comienzo del TAR (2 semanas), se observaba con mayor frecuencia una desaparición más rápida de la carga viral en plasma.

CONCLUSIONES: En resumen, nuestros resultados demuestran la utilidad de la evaluación cuantitativa de la expresión del antígeno CD38, no solamente en los linfocitos T CD8⁺, sino también en los linfocitos T CD4⁺ y monocitos de SP, como indicador precoz de la

respuesta al tratamiento en pacientes VIH-1⁺ sometidos a TAR, dado que el patrón general de cambios que se observa en la expresión de este marcador al poco tiempo de iniciarse la terapia se asocia con el aclaramiento de la carga viral en el plasma de estos individuos.

Relationship Between CD38 Expression on Peripheral Blood T-Cells and Monocytes, and Response to Antiretroviral Therapy: A One-Year Longitudinal Study of a Cohort of Chronically Infected ART-Naive HIV-1+ Patients

Maria Almeida,^{1,2} Miguel Cordero,^{2,3} Julia Almeida,^{1,2} and Alberto Orfao^{1,2*}

¹Service of Flow Cytometry, Center for Cancer Research, University of Salamanca, Salamanca, Spain

²Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

³Service of Internal Medicine-Unity of Infectious Diseases, University Hospital of Salamanca, Salamanca, Spain

Background: HIV-1 infection has been associated with high expression of CD38 on peripheral blood (PB) CD8+ and CD4+ T-cells, which has been related with poor prognosis in untreated HIV-1+ patients. In turn, CD38 expression on PB monocytes from HIV-1+ individuals and its behavior after starting antiretroviral therapy (ART) have been poorly studied.

Methods: CD38 expression on PB CD8+ and CD4+ T-lymphocytes and monocytes was prospectively analyzed in 30 ART-naive HIV-1+ patients, using a quantitative multiparameter flow cytometry approach. Patients were tested prior to therapy, and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after ART.

Results: Prior to ART, CD38 expression was significantly increased on PB CD8+ and CD4+ T-cells and monocytes; despite a significant decrease after ART, CD38 expression remained abnormally high on PB CD8+ T-cells and monocytes, even after one year of therapy, in the absence of detectable plasma viral load. The ART-induced early changes on CD38 expression by PB T-cells and monocytes differed among the cell subsets analyzed and patient groups, probably reflecting an interaction between the direct effects of therapy and a redistribution of the PB compartments of T-cells and monocytes. Hierarchical clustering analysis showed that the overall pattern of changes in CD38 expression observed early after starting ART was predictive of a better response to therapy, not only for PB CD8+ T-cells, but also for CD4+ T-cells and monocytes. Accordingly, those HIV-1+ patients, who experienced a more pronounced increase in CD38 expression on both PB CD4+ T-cells and monocytes after 2 weeks of ART, showed a more rapid viral clearance, which might reflect decreased HIV-1 replication in lymph nodes and other tissues, and a partial restoration of hematopoiesis.

Conclusions: Combined quantitative measurement of CD38 expression on PB monocytes, and CD8+ and CD4+ T-cells is a more useful tool for monitoring HIV-1+ patients under ART, rather than quantitation of CD38 expression on PB CD8+ T-lymphocytes alone. © 2006 Clinical Cytometry Society

Key terms: CD38 expression; HIV-1; antiretroviral therapy; monocytes; T-lymphocytes; disease progression; immune activation; hierarchical clustering analysis

Chronic immune activation has been pathogenically associated with HIV-1 disease in untreated patients. Typically, activation of T-lymphocytes is associated with phenotypic changes involving the expression of different cell surface markers such as CD38 (1–14). An increased expression of CD38 on CD8+ T-lymphocytes from HIV-1+ patients was first reported by Giorgi and Detels (5). Since then, several studies have shown that elevated expression of CD38 on CD8+ T-cells is a strong adverse prognostic marker in HIV-1+ patients (6–11), which predicts disease

Grant sponsors: MSD España S.A., BMS S.L.; Grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia, Madrid, Spain; Grant number: AP2000-3818.

*Correspondence to: Prof. Alberto Orfao, Servicio General de Citometría, Centro de Investigación del Cáncer, Avda. Universidad de Coimbra s/n, 37007 Salamanca, Spain. E-mail: orfao@usal.es

Received 15 February 2006; Revision 17 July 2006; Accepted 20 July 2006

Published online 18 October 2006 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI: 10.1002/cyto.b.20144

Table 1
Baseline Clinical, Immunological and Therapeutic Characteristics of HIV-1+ Patients Before ART

	Group of HIV-1+ patients	
	<200 CD4+ T-cells/ μ l of PB (n = 19)	>200 CD4+ T-cells/ μ l of PB (n = 11)
Age, median years (IQR)	40 (37–56) ^a	36 (33–42)
% of males	79%	55%
Median no. of copies of plasma HIV-1 RNA $\times 10^3$ /mL (IQR)	100 $\times 10^3$ (30.5 $\times 10^3$ – 165 $\times 10^3$)	29 $\times 10^3$ (1.3 $\times 10^3$ – 94.3 $\times 10^3$)
Median no. of CD4+ T-cells/ μ L (IQR)	77 (8–120)	253 (215–301)
Median no. of CD8+ T-cells/ μ L (IQR)	631 (431–997)	1013 (727–1303)
Median no. of years from diagnosis of HIV-1 infection (IQR)	1 (0–9)	4 (1–11)
Clinical category ^{b, c}		
A	24%	30%
B	29%	50%
C	47%	20%
Type of ART ^c		
2 NA + efavirenz	66%	89%
2 NA + ritonavir + indinavir	34%	11%

IQR, interquartile range; ART, antiretroviral therapy; NA, nucleoside analogue.

^aValues in parentheses indicate ranges.

^bClinical status according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification.

^cResults expressed as percentage of patients.

progression independent of the plasma viral load and peripheral blood (PB) CD4+ T-cell counts (7–13). Furthermore, CD38 expression on CD8+ T-cells correlates with HIV-1 disease progression, and it also predicts further declines in PB CD4+ T-cells (11,14). Initiation of antiretroviral therapy (ART) leads to a dramatic decrease of both the relative and absolute number of CD8+CD38+ T-cells in HIV-1+ patients (15–18), and persistence of high numbers of CD8+CD38+ T-cells has been associated with ART failure (19,20). Recent studies have suggested that persistent upregulation of CD38 expression on CD8+ T-cells from ART-treated HIV-1+ patients with suppression of plasma viral load could be used as a marker of residual viral replication (21,22). Altogether, these findings point out the potential utility of the measurement of CD38 expression on CD8+ T-lymphocytes for monitoring HIV-1+ patients under ART.

CD38 has also been reported as increased on CD4+ T-lymphocytes from HIV-1+ untreated patients, a high CD38 expression being associated with a poor prognosis (23, 24). Despite a parallel decrease in CD38 expression on both CD4+ and CD8+ T-cells after starting therapy (15–18, 25–27), recent studies show that ART fails to normalize expression of CD38 not only on CD8+, but also on CD4+ T-cells (25,26); moreover, an increase in the number of CD4+ T-cells programmed to home into lymph nodes (CD38+/CD62L+) has been reported to occur in HIV-1+ patients receiving ART (27). Therefore, although CD4+ T-cell activation has been associated with disease progression in HIV-1 infection, its significance in ART-treated patients remains unclear and requires further investigations.

In contrast to T-cells, the activation status of PB monocytes in HIV-1+ patients has received less attention. Recently, it has been shown that upregulation of HLA-DR expression on PB monocytes correlates with the degree of PB CD4+ T-cell depletion and predicts for a poor CD4+

T-cell response in primary infected HIV-1+ patients under ART (28). Expression of CD38 on PB monocytes from HIV-1+ patients and its behavior after initiation of ART have been poorly studied.

In the present study, we have analyzed the effect of ART on CD38 expression on PB CD4+ and CD8+ T-cells and monocytes from a cohort of chronically infected, ART-naïve HIV-1+ patients, using quantitative flow cytometry. Overall, our results showed an increase of CD38 expression prior to therapy; after ART, important changes on CD38 expression were noted with varying kinetics for the different cell populations and patient groups analyzed. Interestingly, the overall pattern of changes on CD38 expression on monocytes, CD4+ and CD8+ T-cells observed early after the initiation of ART showed a predictive value for the clearance of viral load.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

PB samples from 30 asymptomatic HIV-1-infected patients at different stages of the disease, who were naïve for ART, were studied. At enrolment (time 0), 19 patients (63%) showed extremely low CD4 counts (<200 CD4+ T-cells/ μ l), and 11 cases (37%) had >200 CD4+ T-cells/ μ l of PB. The demographic, clinical, and immunological characteristics of both groups of HIV-1+ patients are displayed in Table 1. Of note, none of the HIV-1+ patients had underlying opportunistic infections during the 12-month course of the study. As controls, 10 PB samples from an identical number of age- and gender-matched HIV-seronegative adult healthy volunteers (AHV) were studied in parallel. All PB samples were obtained by venipuncture directly into VacutainerTM tubes containing tripotassium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) as anticoagulant (Becton/Dickinson -BD- Labware, Franklin Lakes, NJ), after written informed consent was given by the participants.

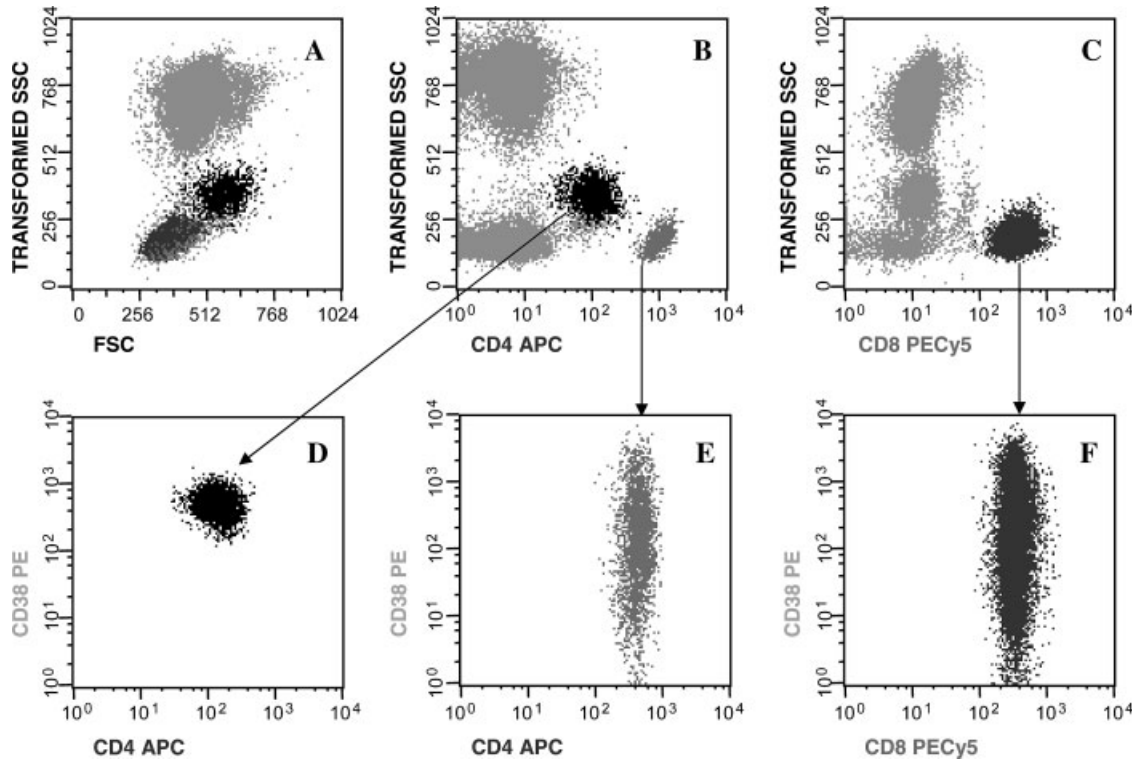


Fig. 1. Immunophenotypic analysis of CD38 expression on PB CD8+ and CD4+ T-cells and monocytes. Panel A shows the forward light scatter (FSC) vs. sideward light scatter (SSC) characteristics of CD8+ T-lymphocytes, CD4+ T-lymphocytes, and monocytes. Identification of these cell populations was made on the basis of their pattern of expression for the CD4 (panel B) and CD8 antigens (panel C). Panels D–F show the pattern of expression of CD38 on PB CD4^{dim} monocytes, CD4+ T-cells, and CD8+ T-lymphocytes, respectively.

Patients were sequentially tested at enrolment (time 0) and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART. ART consisted of two nucleoside reverse transcriptase inhibitors plus either efavirenz or ritonavir-potentiated indinavir (Table 1). The study was approved by the Ethical Committee of the University Hospital (Salamanca, Spain).

Quantitation of PB T-Lymphocyte Subsets and Monocytes

Identification and enumeration of PB T-lymphocyte subsets and monocytes was performed from EDTA-anticoagulated PB samples, using a direct immunofluorescence, stain-and-lyse, nonwash, single-platform flow cytometry technique, as previously described in detail (29). Briefly, 100 μ l of a premixed PB sample was stained with CD3-fluorescein isothiocyanate (FITC; clone SK7, Becton Dickinson Biosciences (BDB), San Jose, CA), CD8-phycoerythrin-cyanine 5 (PC5; clone B9.11, Immunotech, Marseille, France), and CD4-allophycocyanine (APC; clone SK3, BDB). Then, the samples were incubated for 15 min in the dark at room temperature, and after this incubation period, 2 ml of the Quicklysis lysing solution (Cytognos, Salamanca, Spain) was added, and a further 10-min incubation under the same conditions as described earlier was performed. Immediately prior to data acquisition, 100 μ l of premixed Perfect-COUNT beads (Cytognos) were added by reverse-pipetting; after gentle mixing, samples were run on a FACSCalibur

flow cytometer (BDB), using the CellQuest software (BDB). Information was acquired in two consecutive steps; first, 10⁵ events/test corresponding to the whole PB cellularity and the counting beads were collected. In a second step, information on at least 10⁴ lymphocytes was collected. For data analysis, the Paint-A-Gate PRO software (BDB) was used. PB monocytes were identified as CD4+ cells with a typical light scatter pattern, with their FSC/SSC values higher than those from lymphocytes and dendritic cells (DC, Fig. 1).

Quantitation of CD38 Molecules Expressed on PB CD8+ and CD4+ T-Lymphocytes and Monocytes

Quantitation of the number of CD38 molecules expressed on the surface of PB CD4+ and CD8+ T-lymphocytes and monocytes was performed on PB samples, using a direct immunofluorescence stain-and-lyse, nonwash technique, together with the QuantiBRITE™ PE kit (BDB), strictly following the recommendations of the manufacturer (30,31). The assay allows quantitation of fluorescence using calibrated standardized phycoerythrin (PE)-conjugated beads and reagents. Evaluation of the number of antibodies bound per cell was performed from a calibrated bead standard curve, which converts the CD38 relative fluorescence intensity—proportional to the number of Mab CD38 bound to the cell surface—into the corresponding number of sites per cell. For this pur-

pose, 100 μ l of a premixed EDTA-anticoagulated PB sample was stained with the following four-color combination of MAb: CD3-FITC, CD38-PE (clone HB7, BDB, conjugated with PE at 1:1 fluorochrome-to-antibody ratio), CD8-PC5 and CD4-APC. In addition, a tube stained with a PE-conjugated isotype-matched negative MAb instead of the CD38-PE reagent was used as negative control. After an incubation of 15 min at room temperature in the dark, 2 ml of the Quicklysis lysing solution was added and afterward, samples were incubated for 10 min under the same conditions as described earlier. Immediately prior to sample acquisition, QuantiBRITE beads were run on a FACSCalibur flow cytometer, and the calibrated standard curve was obtained using QuantiQuest (BDB), the quantitative calibration feature of CellQuest software. Then, the sample was acquired—at exactly the same instrument settings as the QuantiBRITE beads—in two consecutive steps, as described earlier. To ensure consistent instrument set up along the whole longitudinal period of the study, fluorescence detectors/amplifiers were weekly tested for logarithmic amplifier linearity and dynamic range, using Rainbow beads (Spherotech, Libertyville, IL); the same batch of Rainbow beads was used throughout the duration of the study. Compensation settings were adjusted using singly stained (CD8 FITC, CD4 PE) PB samples from healthy donors (32). For data analysis, the Paint-A-Gate PRO software was used; quantitation of CD38 molecules expressed per cell was performed using the QuantiCALC software (BDB) (30). To evaluate the reliability and reproducibility of the nonwash method used here in comparison with other conventional stain-lyse-and-wash techniques for assessing CD38 expression (30,31), PB samples from five HIV-1 infected patients were analyzed in parallel with both approaches, and a high degree of correlation (Pearson correlation test) being observed between both methods for the quantitation of CD38 expression on CD8+ T-lymphocytes ($r^2 = 0.999$; $P < 0.001$), CD4+ T-cells ($r^2 = 0.994$; $P = 0.001$), and monocytes ($r^2 = 0.975$; $P = 0.005$).

HIV-1 Viral Load

The amount of plasma HIV-1 RNA was measured for each PB sample, using the Roche Amplicor PCR kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). Results were expressed as the number of viral RNA copies/ml, with a lowest detection limit of 50 copies/ml.

Statistical Methods and Hierarchical Clustering Analysis

Mean values and their standard deviations, as well as median, range, 25th and 75th percentiles, and 95% confidence intervals, were calculated for each variable under study using the SPSS 12.0 software program (SPSS, Chicago, IL). For the evaluation of the statistical significance of the differences observed between groups, the nonparametric Mann-Whitney U and Wilcoxon signed rank tests for unpaired and paired samples were used, respectively. The correlation between variables was explored using the

Spearman's coefficient. P values ≤ 0.05 were considered to be associated with statistical significance.

Hierarchical clustering analysis was performed using those 19 HIV-1+ patients, in which all parameters tested had been collected. For this purpose, log transformed values of each variable measured for each individual sample were used. Prior to the analysis, the value obtained for each variable under study was introduced into a dedicated database system (Microsoft Excel, Microsoft, Seattle, WA). Then, data were normalized by dividing the value of each variable obtained for each individual sample by the mean value obtained for all HIV-1+ patient samples tested for that variable; a logarithmic (base 2) transformation was then applied to the ratio values, for individual data sets. The average-linkage method, based on the analysis of Bray-Curtis distance matrices, was used for clustering of individual cases (J-Express Pro V2.1 software; MolMine AS, Bergen, Norway). In this part of the study, the following variables were considered: mean absolute number of CD38 molecules expressed per PB CD4+ T-lymphocyte, CD8+ T-cell and monocyte before starting ART, and the ratios specifically obtained for these three variables between week +2 and day 0 and between week +4 and day 0, for each individual patient. In addition, we also considered other interesting variables such as the absolute number of PB CD4+ T-lymphocytes and the amount of plasma HIV-1 RNA, either before therapy and after starting ART.

To investigate the predictive value of quantifying the levels of CD38 expressed on PB CD8+ and CD4+ T-lymphocytes and monocytes and their changes early after starting ART, on the evaluation of response to therapy in ART-treated HIV-1+ patients, a class predictor was built using a weighted voting algorithm evaluated with a leave-one-out cross validation. For this purpose, a training set with those HIV-1+ patients included in the hierarchical clustering analysis was used, where patients were grouped in two classes: (1) HIV-1+ patients with plasma HIV-1 RNA load detectable at week +4 of ART (>50 copies/ml) and (2) HIV-1+ patients with plasma HIV-1 RNA load undetectable at week +4 of ART (<50 copies/ml). The accuracy of the predictor was tested in the same group of HIV-1 infected patients, using the nearest shrunken centroids method (PAM software; University of Stanford, Stanford, CA) (33).

RESULTS

ART-Induced Changes on the Expression of CD38 on PB T-Lymphocytes from HIV-1+ Patients

Prior to ART, expression of CD38 was significantly increased on both PB CD8+ ($P \leq 0.001$) (Fig. 2A) and CD4+ T-lymphocytes ($P \leq 0.02$) (Fig. 2B), from HIV-1+ patients with either <200 CD4+ or >200 CD4+ T-cells/ μ l of PB. After starting ART, a gradual and progressive reduction of CD38 expression on CD8+ T-lymphocytes was observed over time for both patient groups, except for a slight increase in CD38 expression detected at week +4 of ART for the <200 CD4 patient group (Fig. 2A). Despite this, ART was unable to restore the mean amount of CD38 expressed per PB CD8+ T-lymphocyte toward normal levels, being

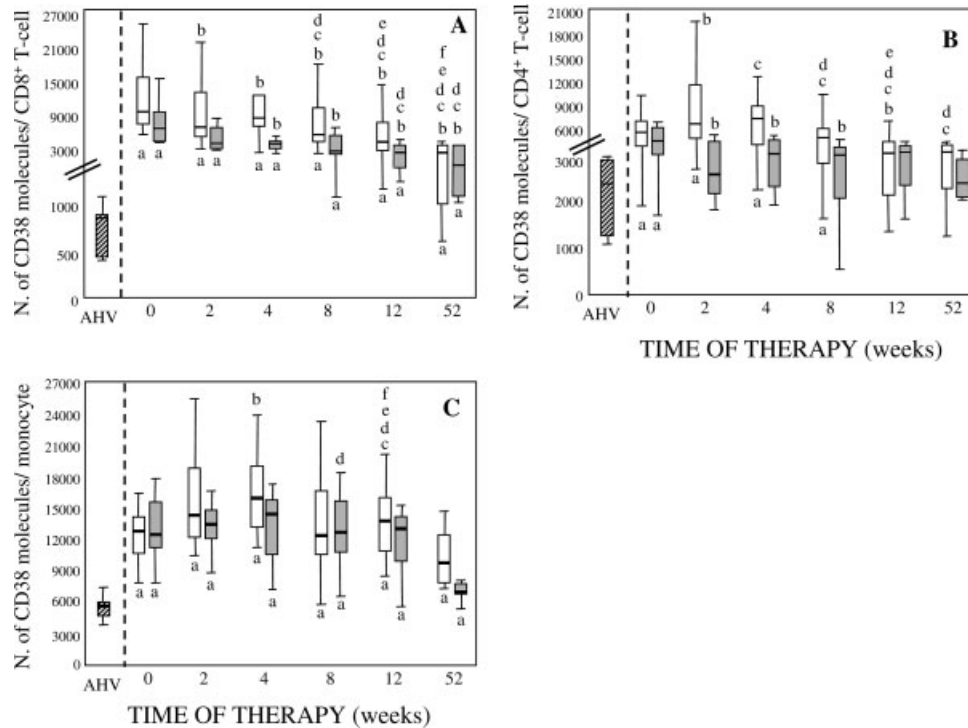


FIG. 2. Expression of CD38 on PB CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocytes and monocytes from HIV-1⁺ individuals prior to therapy (day 0), and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART, according to the absolute number of PB CD4⁺ T-cells. Panels **A–C** show the absolute number of CD38 molecules expressed on the surface of CD8⁺ T-cells, CD4⁺ T-cells, and monocytes, respectively. In these three panels, notched-boxes represent 25th and 75th percentile values; the line in the middle and the vertical lines correspond to the median value and both the 10th and 90th percentiles, respectively; hatched boxes correspond to AHV. White and grey boxes represent HIV-1⁺ patients with extremely low (<200 CD4⁺ T-cells/ μ l) and high (>200 CD4⁺ T-cells/ μ l) PB CD4⁺ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively. (a) $P \leq 0.05$ vs. AHV; (b) $P \leq 0.05$ vs. time 0; (c) $P \leq 0.05$ vs. week +2 of ART; (d) $P \leq 0.05$ vs. week +4 of ART; (e) $P \leq 0.05$ vs. week +8 of ART; (f) $P \leq 0.05$ vs. week +12 of ART.

significantly increased for both HIV-1⁺ patient groups even after one year of treatment ($P < 0.04$) (Fig. 2A). The ART-induced decrease on CD38 expression by PB CD8⁺ T-cells was associated with a marked increase in the absolute number of CD8⁺ T-lymphocytes for the <200CD4 group at week +4 of ART ($P = 0.01$) (Fig. 3A); despite a slight decrease from week +8 of therapy, the number of CD8⁺ T-cells remained significantly higher than in AHV, even one year after starting ART ($P = 0.005$). Among the >200CD4 HIV-1⁺ patients, the number of CD8⁺ T-lymphocytes was already significantly increased prior to therapy ($P = 0.002$), and it remained relatively stable and elevated during therapy, even after one year of ART ($P = 0.03$) (Fig. 3A). No significant correlation was found between the variation on CD38 expression per CD8⁺ T-cell and that of the number of PB CD8⁺ T-lymphocytes for any of the two patient groups ($P > 0.05$) (data not shown).

Regarding CD38 expression on PB CD4⁺ T-cells, initiation of ART was associated with distinct patterns of response in both groups. Accordingly, in the <200CD4 patient group, a significant increase in the number of CD38 molecules expressed per CD4⁺ T-lymphocyte was transiently observed at weeks +2 and +4 of ART ($P = 0.05$), gradually decreasing thereafter toward normal levels, which were reached at week +12 of ART (Fig. 2B). In this group of HIV-1⁺ patients, a significant increase in PB CD4⁺ T-lym-

phocyte counts was observed between time 0 and week +2 ($P = 0.001$) (Fig. 3B); then, PB CD4 counts were stable between week +4 and week +12, and they progressively increased again thereafter (Fig. 3B). Interestingly, a strong positive correlation was observed between the increase on CD38 expression on PB CD4⁺ T-cells and the increase of PB CD4⁺ T-lymphocyte counts at week +2 (vs. initial levels) in the <200CD4 patient group ($r^2: 0.811$; $P = 0.001$) (Fig. 4A). In contrast, among the >200CD4 patients, ART induced a rapid and significant reduction of CD38 expression on CD4⁺ T-cells, which decreased toward normal levels already at week +2 ($P = 0.02$ and $P > 0.05$ when compared to basal and normal levels, respectively) (Fig. 2B); from then on, it remained stable (Fig. 2B), despite the slight increase in the PB CD4⁺ T-cell counts observed in these patients during the first year of ART (Fig. 3B). Interestingly, no significant correlation was found between the changes on the number of CD4⁺ T-cells and their expression of CD38 in this latter group of patients ($P > 0.05$). Figure 5 shows an illustrative example of the changes observed in the levels of CD38 expression on both PB CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocytes from a representative HIV-1⁺ patient before therapy and at weeks +2 and +52 after starting ART, along with a representative plot of the levels of CD38 expression on both PB cell subsets in a healthy donor.

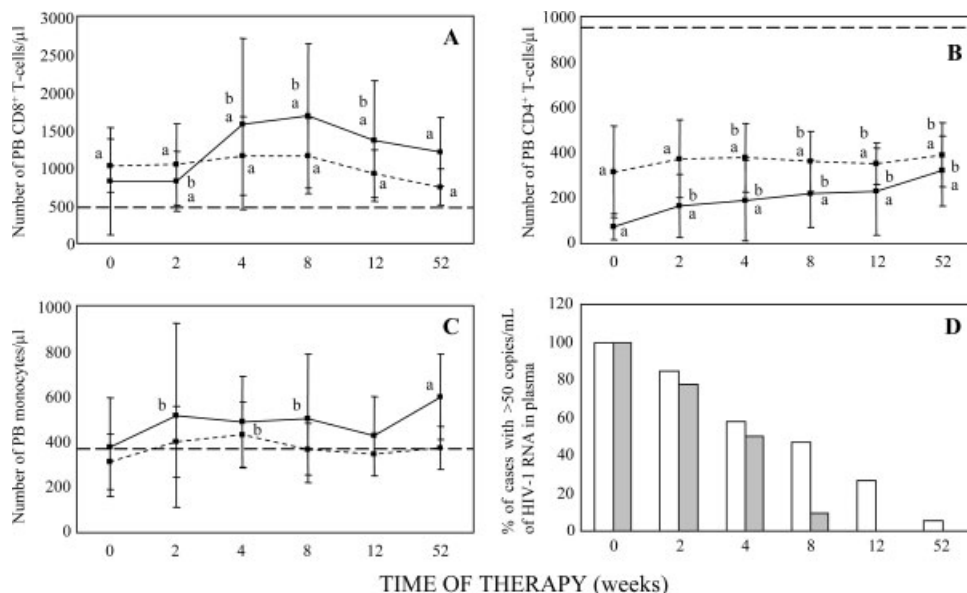


Fig. 3. Distribution of PB T-cell subsets and monocytes and HIV-1 RNA viral load in HIV-1+ individuals prior to therapy (day 0), and at weeks +2, +4, +8, +12, and +52 after starting ART, according to the absolute number of PB CD4⁺ T-cells. Panels **A-C** represent the absolute number of PB CD4⁺ T-cells, CD8⁺ T-cells, and monocytes, respectively. Results are expressed as mean \pm standard deviation; the solid and dotted lines represent HIV-1⁺ patients with extremely low (<200 CD4⁺ T-cells/ μ l) and low (>200 CD4⁺ T-cells/ μ l) PB CD4⁺ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively. Horizontal broken lines represent mean values from healthy control subjects. Panel **D** shows the percentage of HIV-1+ cases with >50 HIV-1 RNA copies/ml of plasma; in this latter panel, white and grey columns represent HIV-1⁺ patients with extremely low (<200 CD4⁺ T-cells/ μ l) and low (>200 CD4⁺ T-cells/ μ l) PB CD4⁺ T-cell counts at the moment of entering the study, respectively. (a) $P \leq 0.05$ vs. AHV; (b) $P \leq 0.05$ vs. time 0.

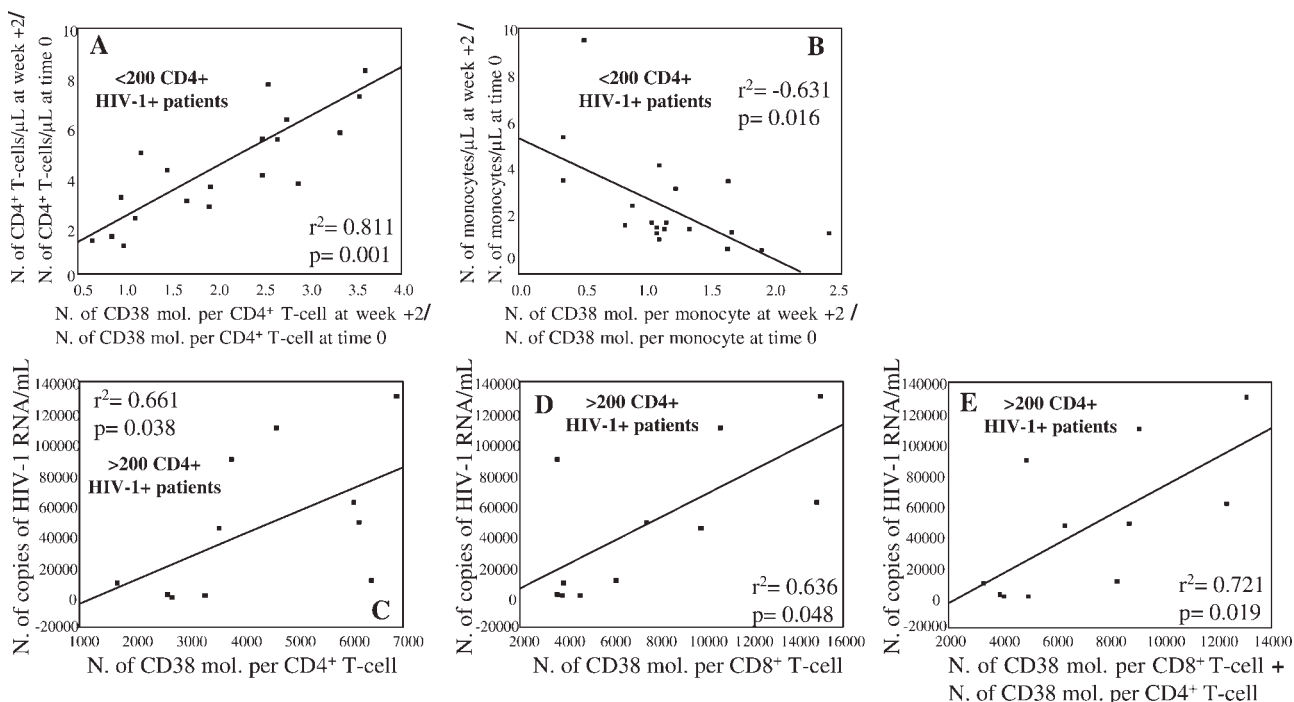


Fig. 4. HIV-1⁺ patients: Correlation between the changes observed early after ART on the PB T-cell and monocyte counts and CD38 expression and between the plasma viral load and CD38 expression prior to therapy, according to the absolute number of PB CD4⁺ T-cells. Panel **A** displays the correlation between ART-induced changes on CD38 expression by CD4⁺ T-lymphocytes and the PB CD4⁺ T-cell counts at week +2 (vs. initial levels) in the <200CD4 patient group. In panel **B**, the correlation between ART-associated changes in the number of PB monocytes and the amount of CD38 molecules expressed per monocyte at week +2 for the <200CD4 patient group is shown. The other three panels show the correlation between HIV-1 RNA load prior to ART and the mean number of CD38 molecules expressed per CD4⁺ T-lymphocyte (Panel **C**), CD8⁺ T-lymphocyte (Panel **D**), or both (Panel **E**), for the >200CD4 HIV-1+ patient group.

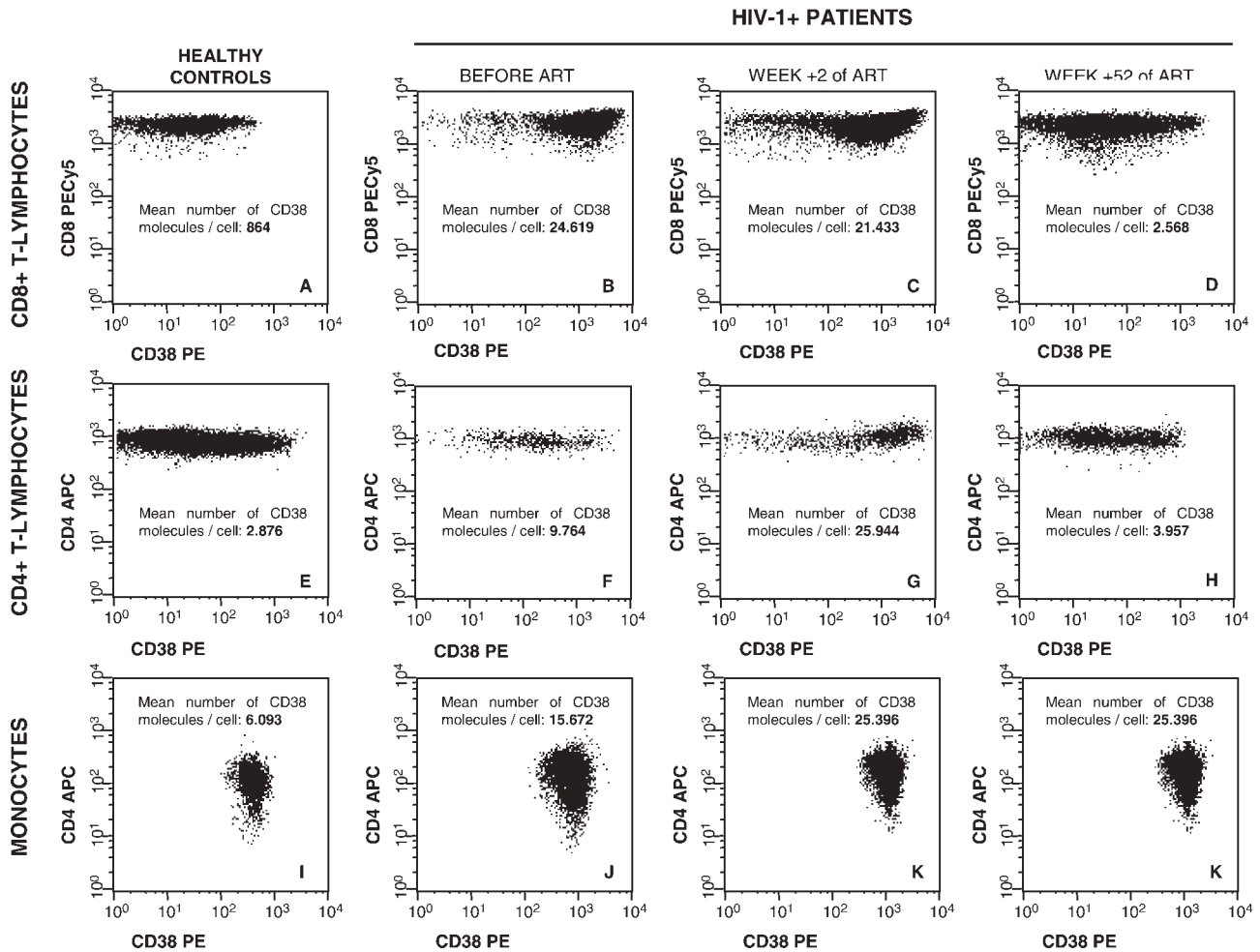


Fig. 5. Sequential analysis of the levels of CD38 expression on PB CD8+ T-lymphocytes (panels B–D), CD4+ T-lymphocytes (panels F–H), and monocytes (panels J–L) before ART and at weeks +2 and +52 of ART for a representative HIV-1+ patient, in comparison to an age- and gender-matched healthy donor (panels A, E, and I).

ART-Induced Changes on the Expression of CD38 by PB Monocytes from HIV-1+ Patients

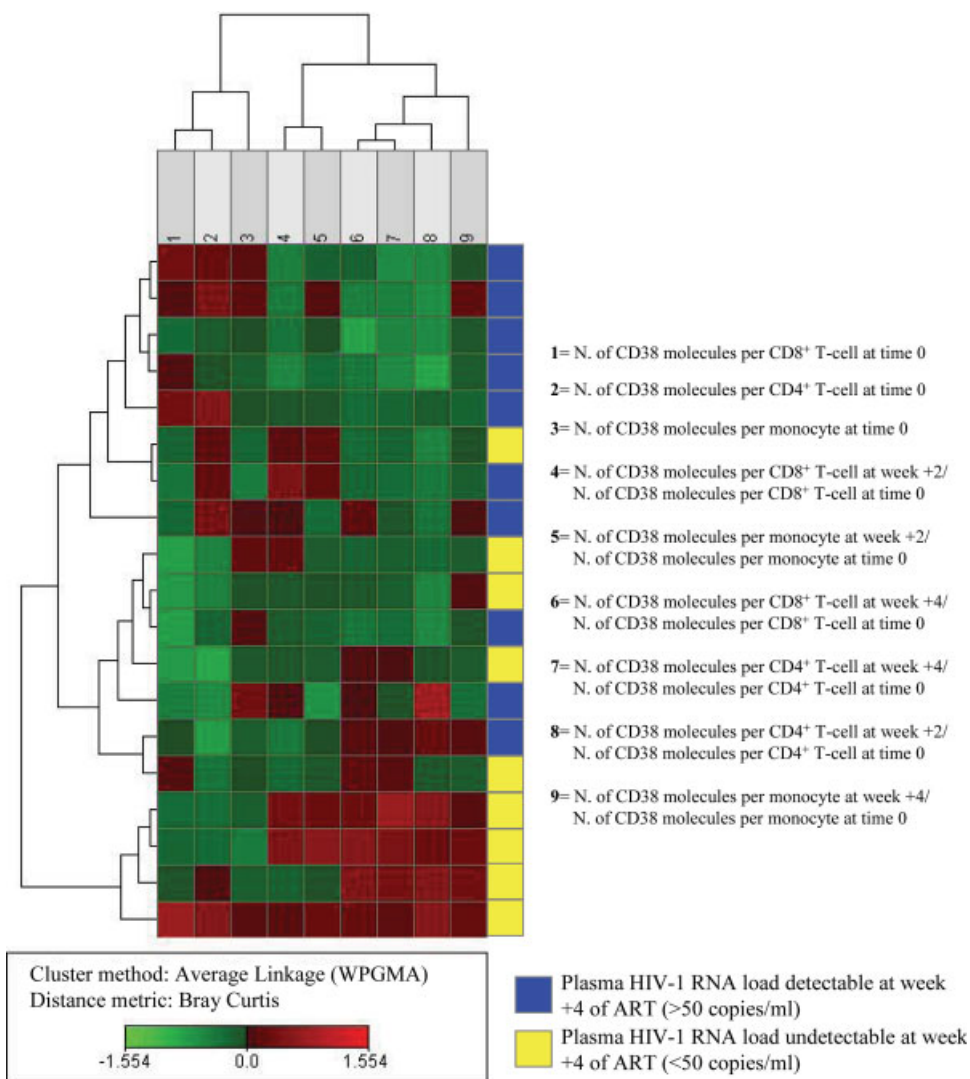
Prior to ART, the absolute mean number of CD38 molecules expressed per PB monocyte was significantly increased in both the <200CD4 and >200CD4 patient groups, when compared to AHV ($P \leq 0.001$) (Fig. 2C). Initiation of ART was associated with an increased mean amount of CD38 molecules expressed per monocyte at week +2 of therapy in both patient groups; such increase was more pronounced for the <200CD4 group and lasted till week +4, and decreasing thereafter (Fig. 2C). In parallel, a slight but significant increase in the absolute mean number of PB monocytes was observed between week +2 and week +8 of ART for the <200CD4 group ($P = 0.05$), and at week +4 for the >200CD4 group ($P = 0.02$) (Fig. 3C). Furthermore, we found that the number of PB monocytes was significantly higher than normal for the <200CD4 HIV-1+ patients at week +52 of therapy ($P = 0.002$) (Fig. 3C). Despite this, a strong negative correlation was found between ART-induced changes in the number of PB monocytes and

the amount of CD38 molecules expressed per monocyte at week +2 for the <200CD4 patient group ($r^2: -0.631$; $P = 0.02$) (Fig. 4B). After one year of therapy, the mean amount of CD38 expressed per monocyte was lower in both the <200CD4 and >200CD4 patient groups as compared to basal levels; however, ART was not able to restore the mean absolute number of CD38 molecules expressed per monocyte toward normal levels even after one year of treatment ($P = 0.03$ for both patient groups) (Fig. 2C). Figures 5J–5L show an illustrative example of CD38 expression on PB monocytes from a representative HIV-1+ patient before and after treatment, together with a representative plot of CD38 expression on this PB cell subset in a healthy donor (Fig. 5I).

Effect of ART on Plasma HIV-1 RNA Load and Correlation with CD38 Expression on PB T-Cells and Monocytes

As expected, ART induced a significant reduction of viral load already at week +2 in both HIV-1+ patient groups (<200CD4: $P = 0.001$; >200CD4: $P = 0.02$),

FIG. 6. Hierarchical clustering analysis of the predictive value of CD38 expression on PB T-cells and monocytes from untreated HIV-1+ patients and its early changes after initiating ART, and response to therapy, as evaluated by a decreased HIV-1 RNA load toward undetectable levels at week +4 of therapy. Rows represent each HIV-1+ patient included in the study, labeled in either blue or yellow color according to the presence or absence of detectable plasma HIV-1 RNA load at week +4 of therapy, respectively; columns correspond to each individual variable included in the analysis. Red and green colors represent a value higher or lower than the mean, respectively; color intensity represents the magnitude of the deviation from the mean. As indicated, the scale extends from ratios of -1.554 to $+1.554$ (\log_2 units).



becoming undetectable from week +8 of ART in all the >200CD4 cases and from week +12 in all but one case from the <200CD4 patient group (Fig. 3D).

Prior to ART, a strong positive correlation was found between HIV-1 RNA load and both the number of CD38 molecules expressed per CD8+ T-lymphocyte (r^2 : 0.636; P = 0.05) (Fig. 4C) and per CD4+ T-lymphocyte (r^2 : 0.661; P = 0.04) (Fig. 4D), or both (r^2 : 0.721; P = 0.02) (Fig. 4E) for the >200CD4 but not for the <200CD4 patients. By contrast, no significant correlation was found between the plasma viral load and CD38 expression by PB monocytes, in none of the two groups of HIV-1+ patients.

Relationship Between CD38 Expression by PB T-Cells and Monocytes, and Response to ART in HIV-1+ Patients

Hierarchical clustering analysis confirmed the existence of an association between CD38 expression on PB T-lymphocytes and monocytes prior to ART, its changes early after starting therapy (week +2 and week

+4), and response to ART as evaluated by the presence or absence of detectable plasma viral load after 4 weeks of therapy. Based on CD38 expression at time 0, and its changes at week +2 and week +4 on both the CD4+ and CD8+ T-cells and the monocytes, HIV-1+ patients could be classified into three major groups (Fig. 6). This included a worse prognostic group of patients from which 88% still had >50 viral RNA copies/ml after 4 weeks of ART, and a good prognostic group with all cases included in it having undetectable plasma viral load at this time point; a third intermediate group composed of seven patients, including both cases with detectable (n = 3) and undetectable (n = 4) plasma viral load at week +4. A detailed analysis of the characteristics of each of these patient groups showed that those HIV-1+ individuals who experienced a more pronounced increase in CD38 expression on both PB CD4+ T-cells and monocytes, early after therapy (2 weeks post-ART), were those more prone to show an earlier disappearance of their plasma viral load.

Table 2
Predictor Model for Clearance of Viral Load After 4 Weeks of Antiretroviral Therapy (ART): Shrunken Centroids for Each Variable Included in the Model for Each of the Two Patient Groups

Variables	Shrunken centroids	
	Plasma HIV-1 RNA load undetectable at week +4 of ART	Plasma HIV-1 RNA load detectable at week +4 of ART
N. of CD38 mol. per CD4+ T-cell at week +4/N. of CD38 mol. per CD4+ T-cell at time 0	0.2291	-0.5307
N. of CD38 mol. per CD8+ T-cell at week +4/N. of CD38 mol. per CD8+ T-cell at time 0	0.3022	-0.4787
N. of CD38 mol. per CD8+ T-cell at week +2/N. of CD38 mol. per CD8+ T-cell at time 0	0.2151	-0.4506
N. of CD38 mol. per monocyte at week +2/N. of CD38 mol. per monocyte at time 0	-0.1021	-0.2379
N. of CD38 mol. per CD4+ T-cell at week +2/N. of CD38 mol. per CD4+ T-cell at time 0	-0.1238	-0.8886
N. of CD38 mol. per monocyte at week +4/N. of CD38 mol. per monocyte at time 0	0.1526	-0.1498
N. of CD38 mol. per CD4+ T-cell at time 0	-0.5963	0.1346
N. of CD38 mol. per monocyte at time 0	-0.2192	-0.0031
N. of CD38 mol. per CD8+ T-cell at time 0	-0.4121	-0.2374

N. = number; mol. = molecules.

Shrunken centroids for the two patient groups (plasma HIV-1 RNA load undetectable at week +4 of ART and plasma HIV-1 RNA load detectable at week +4 of ART) were calculated for each variable, as previously described in detail (33). Shrunken centroids were then used to define the discriminant score for each of the two groups according to the distance to the nearest shrunken centroid of the expression levels for the different variables of each individual sample (33).

Interestingly, it should be noted that other variables under study, such as the absolute number of CD4+ T-cells and plasma HIV-1 viral load before therapy and after 2 weeks of ART, or the presence of HCV co-infection, did not predict the clearance of the viral load at week +4 of treatment (data not shown).

The predictive value of the prognostic factors identified was verified by applying a predictor model detailed in Table 2. This predictive model showed an overall accuracy of 76.9%, the mean probability of correctly classifying samples ranging from 76.6% for patients with plasma HIV-1 RNA load detectable at week +4 of ART (>50 copies/ml) to 77.1% for patients with plasma HIV-1 RNA load undetectable at week +4 of ART (<50 copies/ml). When other conventional parameters, such as the viral load or the absolute numbers of PB CD4+ T-cells, were included in the predictor model, its overall accuracy decreased to 66.4%, with a mean probability of correctly classifying individual samples between 64.9 and 50.7% for patients with plasma HIV-1 RNA load detectable at week +4 of ART, and 67.8 and 50.8% for patients with plasma HIV-1 RNA load undetectable at week +4 of ART, depending on whether the CD38-associated variables were included or excluded from the analysis, respectively.

DISCUSSION

HIV-1 infection is associated with an abnormally increased expression of CD38 on circulating CD8+ T-cells (5-14) that persists throughout the disease course in untreated patients. More recently, these observations have been also extended to PB CD4+ T-cells (23-26). As for other parameters, increased CD38 expression on T-cells point to HIV-1 disease progression and relate to a state of chronic immune activation (9,12,14,15).

Here, we confirm these findings and extend the observation of an HIV-1-associated increased CD38 expression also to PB monocytes from untreated HIV-1+ patients. Altogether, these results indicate that the CD38-associated hyperactivation of the immune system occurring in HIV-1+ patients is not restricted to the T-cell compartment and extends to inflammatory cells. However, it should be noted that while a correlation was observed between viral load and CD38 expression among untreated HIV-1+ patients with >200 CD4+ PB T-cells, this was restricted to the expression of CD38 on CD4+ and CD8+ T-cells, suggesting that the increased CD38 expression on both T-cell subsets, but not the monocytes, is closely related to active viral replication in less immunocompromised HIV-1+ patients. The marked depletion of circulating CD4+ T-lymphocytes observed in HIV-1+ patients has been related, to a certain extent, to the increased migration of PB CD4+ T-cells to lymph nodes, where active replication is occurring (34-36); this could help to explain the absence of a correlation between CD38 expression on CD4+ T-lymphocytes and viral load in the <200CD4 HIV-1+ patient group, since in these immunocompromised patients most of their circulating activated CD4+ T-lymphocytes with high CD38 expression would be sequestered from PB into lymphoid tissues (27,37); it should be noted that HIV-1+ individuals from this group were asymptomatic patients who were not at the latest stages of the disease. In addition, CD8+ T-cell responses are impaired in HIV-1 infected patients at later stages of the disease (38), presumably because of the lack of appropriate helper signals. Therefore, this could further contribute to explain the absence of a direct correlation between CD38 expression on PB CD8+ T-lymphocytes and plasma HIV-1 RNA load in the <200CD4 HIV-1+ patient group. Regarding monocytes, it should be noted

that, normally, once they have completed their maturation in the bone marrow, they enter the PB circulation where they remain for a few days; afterward, they migrate to lymphoid and other tissues as part of the normal immune-surveillance mechanism (39). HIV-1 infection has been shown to induce an accelerated migration of activated PB monocytes to other tissues (40), which might help to explain the absence of a correlation between CD38 expression on PB monocytes and HIV-1 RNA load, in untreated patients.

In line with previous observations (41–43), ART induced a rapid suppression of viral replication. Despite this, CD38 expression on PB CD8+ T-cells and monocytes from HIV-1+ patients remained significantly increased, even after one year of ART, independent of their initial PB CD4+ T-cell counts. In agreement, expression of CD38 on both PB CD8+ T-cells and monocytes has been shown to remain significantly increased in ART-treated HIV-1+ patients with undetectable plasma viral load (23,25,44), and low-level HIV-1 replication has been detected in recently infected monocytes, from patients receiving ART with prolonged suppression of viremia (45–47). Altogether, these findings would support the notion that residual HIV-1 replication persists in reservoirs such as lymphoid tissues (21,22,25), which could induce a quantitative increased anti-HIV-1 cytotoxic immune response due to partial recovery of the immune surveillance and persistence of the virus. Accordingly, a strong association between the mean amount of CD38 molecules expressed per CD8+ T-cell and the frequency of HIV-1-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocytes has recently been reported in untreated patients (48), and we have observed an increased production of inflammatory cytokines by PB monocytes and CD16+ DC in HIV-1+ patients at advanced stages of the disease with undetectable plasma viral load, even after one year of ART (49). Moreover, in the present study an altered long-term reconstitution of PB T-cell counts was observed, with the absolute number of PB CD4+ T-cells remaining abnormally low while that of CD8+ T-lymphocytes was significantly increased after one year of ART in both groups of HIV-1+ patients. Interestingly, an increased CD8+ T-cell activation has been associated with lower CD4+ T-cell gains in ART-treated HIV-1+ patients with undetectable levels of plasma viral load (24), which could contribute to explain the incomplete recovery of PB CD4+ T-cell counts observed for both groups of HIV-1+ individuals.

A detailed analysis of the ART-associated changes on CD38 expression by PB T-cells and monocytes observed early after initiation of therapy showed different kinetic patterns not only between different cell populations but also between the two groups of patients. In line with previous observations (15–18), ART induced a progressive reduction of CD38 expression on CD8+ T-lymphocytes over time in both the <200CD4 and >200CD4 patient groups; by contrast, initiation of ART led to distinct kinetic changes in the pattern of CD38 expression on CD4+ T-cells for each of the two patient groups. Previous studies show that the increase of PB CD4+ T-cell counts observed early after starting ART could be attributed to a redistribu-

tion into PB of those CD4+ T-cells that had migrated to lymph nodes as a consequence of active viral replication, because of decreased viral load (27,37,50,51). In line with this, we observed an increased CD38 level on CD4+ T-lymphocytes early after initiation of therapy for the <200CD4 group in parallel with an early and rapid increase of CD4+ T-cell numbers at week +2 of ART. Probably because the rate of depletion of CD4+ T-cells in the >200CD4 HIV-1+ untreated patients was moderate, the redistribution phase was less prominent and did not translate into an overall increased CD38 expression early after starting ART, as also supported by the observation of relatively mild recovery of PB CD4+ T-cell numbers. The strong correlation found at week +2 of ART between both the increase on CD38 expression by CD4+ T-cells and the absolute count of PB CD4+ T-lymphocytes for the <200CD4, but not the >200CD4 patients, would further support this hypothesis. Interestingly, hierarchical clustering analysis showed that those HIV-1+ patients who experienced a more pronounced increase in the number of CD38 molecules expressed per CD4+ T-lymphocyte at week +2 of ART had a better response to therapy, as indicated by their earlier clearance of viral load. Accordingly, elevation in CD38 expression on CD4+ T-cells early after starting therapy might be considered as an indicator of good prognosis in the management of HIV-1 infected patients receiving ART.

Regarding PB monocytes, a rapid increase of both CD38 expression and the absolute number of PB monocytes was observed early after initiation of ART, particularly among the <200CD4 HIV-1+ patients. Such changes could be explained by the existence of an altered PB monocyte turnover. After starting ART, a decreased rate of migration of PB monocytes into lymphoid and other tissues could be expected due to a direct effect of ART on HIV-1 replication. If this is true, recently produced monocytes would remain in the circulation for a longer period of time in treated when compared with untreated HIV-1+ patients, and their CD38 expression would increase because of residual viral load/replication. However, we found a negative correlation between ART-induced changes in the number of PB monocytes and the amount of CD38 molecules expressed per monocyte at week +2 of ART versus initial levels for the <200CD4 patient group. Such apparent discrepancy could be related to the fact that the effect of ART on the PB monocyte count could be due not only to a decreased migration of PB monocytes to tissues, but also to an increased rate of production of new cells in the bone marrow, which would show normal CD38 levels, as a consequence of a progressive control of HIV-1 replication. In such case, the increase on CD38 expression by PB monocytes early after initiating ART could be used as a predictive marker of good response to therapy, reflected by both a decreased HIV-1 replication in lymph nodes and other tissues and a partial restoration of hematopoiesis. Actually, as occurred for CD4+ T-lymphocytes, those HIV-1+ patients who were classified into the good prognostic group according to the hierarchical clustering analysis were those showing a higher increase in CD38 expression on PB monocytes, early after starting therapy. To our knowledge,

this is the first report showing that elevations in CD38 expression on both PB CD4⁺ T-cells and monocytes may predict a more rapid viral load clearance in ART-treated HIV-1+ patients, and thus could be used as good prognostic markers when monitoring these individuals. Altogether, these results show the potential utility of the quantitative measurement of CD38 expression not only on PB CD8⁺ T-lymphocytes, but also on PB CD4⁺ T-lymphocytes as well as the monocytes, as an early indicator of response to ART in HIV-1+ patients, since the overall pattern of changes observed on the expression of this activation marker early after starting ART predicts for the kinetics of clearance of plasma viral load.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. Miguel Ángel del Pozo from Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínico de Valladolid and Universidad de Valladolid (Valladolid, Spain) for his kind collaboration with this study by sending samples from HIV-1 infected patients, and Dr. Jesús Iglesias from Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca (Salamanca, Spain) for his contribution with the virologic studies. We also thank C. Teodosio and S. Barrena for their contribution with hierarchical clustering analyses.

LITERATURE CITED

- Lima M, Teixeira MA, Queiros ML, Santos AH, Goncalves C, Correia J, Farinha F, Mendonca F, Soares JM, Almeida J, Orfao A, Justica B. Immunophenotype and TCR-V β repertoire of peripheral blood T-cells in acute infectious mononucleosis. *Blood Cells Mol Dis* 2003;30:1-12.
- Rodrigues DS, Medeiros EA, Weckx LY, Bonnez W, Salomao R, Kallas EG. Immunophenotypic characterization of peripheral T-lymphocytes in Mycobacterium tuberculosis infection and disease. *Clin Exp Immunol* 2002;128:149-154.
- Xu X, Beckman I, Dimopoulos K, Ahern M, Bradley J. Age-related changes in the expression of T-cell activation antigens following phytohemagglutinin stimulation. *Exp Clin Immunogenet* 1991;9:203-211.
- Shirono K, Hattori T, Hata H, Nishimura H, Takatsuki K. Profiles of expression of activated cell antigens on peripheral blood and lymph node cells from different clinical stages of adult T-cell leukaemia. *Blood* 1989;73:1664-1671.
- Giorgi JV, Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol Immunopathol* 1989;52:10-18.
- Almeida M, Cordero M, Almeida J, López A, Orfao A. CD38 on peripheral blood cells: The value of measuring CD38 expression on CD8⁺ T-cells in patients receiving highly-active anti-retroviral therapy. *Clin Appl Immunol Rev* 2002;2:307-320.
- Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Prince HE, Detels R, 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 Retrovirol* 1997;16:83-92.
- Giorgi JV, Liu Z, Hultin LE, Cumberland WG, Hennessey K, Detels R. Elevated levels of CD38⁺ CD8⁺ T-cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4⁺ T-cell levels: Results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993;6:904-912.
- Levacher M, Hulstaert F, Tallet S, Ullery S, Pocard 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.
- Mocroft A, Boffill M, Lipman M, Medina E, Borthwick N, Timms A, Batista L, Winter M, Sabin CA, Johnson M, Lee CA, Phillips A, Janossy G. CD8⁺, CD38⁺ lymphocyte percent: A useful immunological marker for monitoring HIV-1-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997;14:158-162.
- Bofill M, Mocroft A, Lipman M, Medina E, Borthwick NJ, Sabin CA, Timms A, Winter M, Baptista L, Johnson MA, Lee CA, Phillips AN, Janossy G. Increased numbers of primed activated CD8⁺ CD38⁺ CD45RO⁺ T-cells predict the decline of CD4⁺ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS* 1996;10:827-834.
- Liu Z, Cumberland WG, Hultin LE, Kaplan AH, Detels R, Giorgi JV. CD8⁺ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998;18:332-340.
- Grossman Z, Bentwich Z, Herberman RB. From HIV infection to AIDS: Are the manifestations of effective immune resistance misinterpreted? *Clin Immunol Immunopathol* 1993;69:123-135.
- Bouscarat F, Levacher M, Dazza MC, Chau F, Desforges B, Muffat-Joly M, Matheron S, Girard PM, Sinet M. Prospective study of CD8⁺ lymphocyte activation in relation to viral load in HIV-infected patients with > or = 400 CD4⁺ lymphocytes per microliter. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15:1419-1425.
- Burgisser P, Hammann C, Kaufmann D, Battegay M, 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.
- Tilling R, Kinloch S, Goh LE, Cooper D, Perrin L, Lampe F, Zaunders J, Hoehn B, Tsoukas C, Andersson J, Janossy G, Quest Study Group. Parallel decline of CD8⁺/CD38⁺⁺ T-cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS* 2002;16:589-596.
- Zanussi S, Simonelli C, Bortolin MT, D'Andrea M, Crepaldi C, Vaccher E, Nasti G, Politi D, Barzan L, Tirelli U, De Paoli P. Immunological changes in peripheral blood and in lymphoid tissue after treatment of HIV-infected subjects with highly active anti-retroviral therapy (HAART) or HAART + IL-2. *Clin Exp Immunol* 1999;116:486-492.
- Carcelain G, Blanc C, Leibowitch J, Mariot P, Mathez D, Schneider V, Saimot AG, Damond E, Simon F, Debre P, Autran B, Girard PM. T-cell changes after combined nucleoside analogue therapy in HIV primary infection. *AIDS* 1999;13:1077-1081.
- Onlamoon N, Tabprasit S, Suwanagool S, Louisirirochanakul S, Ansari AA, Pattanapanyasat K. Studies on the potential use of CD38 expression as a marker for the efficacy of anti-retroviral therapy in HIV-1-infected patients in Thailand. *Virology* 2005;341:238-247.
- Beran O, Holub M, Spala J, Kalanin J, Stankova M. CD38 expression on CD8⁺ T-cells in Human immunodeficiency virus 1-positive adults treated with HAART. *Acta Virol* 2003;47:121-124.
- Benito JM, Lopez M, Lozano S, Martinez P, Gonzalez-Lahoz J, Soriano V. CD38 expression on CD8 T-lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2004;20:227-233.
- Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T-lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* 1999;179:859-870.
- Carbone J, Gil J, Benito JM, Navarro J, Munoz-Fernandez A, Bartolome J, Zabaly JM, Lopez F, Fernandez-Cruz E. Increased levels of activated subsets of CD4 T-cells add to the prognostic value of low CD4 T cell counts in a cohort of HIV-infected drug users. *AIDS* 2000;14:2823-2829.
- Hunt PW, Martin JN, Sinclair E, Brecht B, Hagos E, Lampiris H, Deeks SG. T-cell activation is associated with lower CD4⁺ T-cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* 2003;187:1534-1543.
- Al-Harthi L, Voris J, Patterson BK, Becker S, Eron J, Smith KY, D'Amico R, Mildvan D, Snidow J, Pobiner B, Yau L, Landay A. Evaluation of the impact of highly active antiretroviral therapy on immune recovery in antiretroviral naive patients. *HIV Med* 2004;5:55-65.
- Valdez H, Connick E, Smith KY, Lederman MM, Bosch RJ, Kim RS, St Clair M, Kuritzkes DR, Kessler H, Fox L, Blanchard-Vargas M, Landay A, AIDS Clinical Trials Group Protocol 375 Team. Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS* 2002;16:1859-1866.
- Hengel RL, Jones BM, Kennedy MS, Hubbard MR, McDougal JS. CD4⁺ T-cells programmed to traffic to lymph nodes account for increases in numbers of CD4⁺ T cells up to 1 year after the initiation of highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 2001;184:93-97.
- Gascon RL, Narvaez AB, Zhang R, Kahn JO, Hecht FM, Herndier BG, McGrath MS. Increased HLA-DR expression on peripheral blood monocytes in subsets of subjects with primary HIV infection is associated with elevated CD4 T-cell apoptosis and CD4 T-cell depletion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;30:146-153.

29. Menéndez P, Prósper F, Bueno C, Arbona C, San Miguel JF, Garcia-Conde J, Sola C, Cortes-Funes H, Orfao A. Sequential analysis of CD34⁺ and CD34⁻ cell subsets in peripheral blood and leukapheresis products from breast cancer patients mobilized with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia* 2001;15:430-439.
30. Iyer SB, Bishop JE, Abrams B, Maino VC, Ward AJ, Christian TP, Davis KA. QuantiBRITE™: A new standard for fluorescence quantitation. Part no. 23-3496 (White paper). San Jose, CA: Becton Dickinson Immunocytometry Systems; 1997.
31. Iyer SB, Hultin LE, Zawadzki JE, Davis KA, Giorgi JV. Quantitation of CD38 expression using QuantiBRITE™ beads. *Cytometry* 1998;33:206-212.
32. Schmitz JL, Czerniewski MA, Edinger M, Plaeger S, Gelman R, Wilkening CL, Zawadzki JA, Wormsley SB, ACTG Advanced Flow Cytometry Focus Group. Multisite comparison of methods for the quantitation of the surface expression of CD38 on CD8⁺ T-lymphocytes. *Cytometry* 2000;42:174-179.
33. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6567-6572.
34. Wang L, Robb CW, Cloyd MW. HIV induces homing of resting T-lymphocytes to lymph nodes. *Virology* 1997;228:141-152.
35. Wang L, Chen JJ, Gelman BB, Konig R, Cloyd MW. A novel mechanism of CD4 lymphocyte depletion involves effects of HIV on resting lymphocytes: Induction of lymph node homing and apoptosis upon secondary signaling through homing receptors. *J Immunol* 1999;162:268-276.
36. Chen JJ, Huang JC, Shirliff M, Briscoe E, Ali S, Cesani F, Para D, Cloyd MW. CD4 lymphocytes in the blood of HIV(+) individuals migrate rapidly to lymph nodes and bone marrow: Support for homing theory of CD4 cell depletion. *J Leukoc Biol* 2002;72:271-278.
37. Bucy RP, Hockett RD, Derdeyn CA, Saag MS, Squires K, Sillers M, Mitsuyasu RT, Kilby JM. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 1999;103:1391-1398.
38. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75.
39. Crowe S, Zhu T, Muller WA. The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc Biol* 2003;74:635-641.
40. Albin A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, Proudfoot AE, Alouani S, Wells TN, Mariani G, Rabin RL, Farber JM, Noonan DM. HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13153-13158.
41. 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.
42. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, DiGiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, Kuo YH, Brookmeyer R, Zeiger MA, Barditch-Crovo P, Siliciano RF. Quantification of latent tissue reservoirs, total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997;387:183-188.
43. Powderly WG, Landay A, Lederman MM. Recovery of the immune system with antiretroviral therapy: The end of opportunism? *JAMA* 1998;280:72-77.
44. Almeida CA, Price P, French MA. Immune activation in patients infected with HIV type 1 and maintaining suppression of viral replication by highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002;18:1351-1355.
45. Crowe SM, Sonza S. HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy: A further obstacle to eradication. *J Leukoc Biol* 2000;68:345-350.
46. Lambotte O, Taoufik Y, de Goer MG, Wallon C, Goujard C, Delfrayssy JF. Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;23:114-119.
47. Zhu T, Muthui D, Holte S, Nickle D, Feng F, Brodie S, Hwangbo Y, Mullins JI, Corey L. Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol* 2002;76:707-716.
48. Chun TW, Justement JS, Sanford C, Hallahan CW, Planta MA, Loutfy M, Kottlilil S, Moir S, Kovacs C, Fauci AS. Relationship between the frequency of HIV-specific CD8⁺ T-cells and the level of CD38+CD8⁺ T cells in untreated HIV-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:2464-2469.
49. Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Persistent abnormalities in peripheral blood dendritic cells and monocytes from HIV-1+ patients after one year of antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006;41:405-415.
50. 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. *Science* 1997;277:112-116.
51. 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.

IV. Discusión

El estudio del papel que desempeñan las CPA, y más concretamente las células dendríticas, en la patogenia de la infección por el VIH-1 ha cobrado gran interés en los últimos años, fundamentalmente por el hecho de que, al expresar los principales receptores y correceptores del VIH-1, y debido a su amplia localización en superficies mucosas –sitios de entrada del virus en el organismo–, diferentes autores han planteado la hipótesis de que las células dendríticas podrían constituir la primera diana del VIH-1 en las fases más tempranas de la infección^{44,45}. La posibilidad de que las células dendríticas puedan infectarse por el VIH-1, unido al papel crucial que desempeñan estas células en el control de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, apoyaría la hipótesis que sostiene su implicación en la patogenia de la infección por el VIH-1, tanto en el establecimiento inicial y propagación de la infección, como en el desarrollo de la respuesta inmunitaria frente a la misma^{412,434,435}. De hecho, en los últimos años numerosos estudios han demostrado que las células dendríticas pueden ser infectadas por el VIH-1 tanto *in vitro*^{39,42,46,173,176,455} como *ex vivo*^{47,175}, si bien persisten algunas discrepancias a este respecto⁴³⁶⁻⁴³⁸. A su vez, la infección de las células dendríticas por el VIH-1 podría condicionar alteraciones en la actividad funcional de las mismas, que podrían contribuir a explicar, al menos parte, anomalías funcionales de los linfocitos T de pacientes VIH-1+. De hecho, los resultados obtenidos a partir del estudio de las células dendríticas en la infección por el VIH-1 han revelado la existencia de alteraciones significativas en la distribución numérica, fenotipo y función de dichas células^{47,150,168,170,440,442,456,458,460}. Respecto a las alteraciones numéricas, se ha demostrado que existe una profunda depleción de células dendríticas mieloides y plasmocitoides en la SP de pacientes infectados por el VIH-1^{169,439-441}, permaneciendo las causas de dicha depleción sin aclararse de forma definitiva. Es más, la disminución del número de células dendríticas circulantes que se observa en individuos VIH-1+, se ha asociado a su vez con la depleción de células T CD4+ de SP, el aumento de la carga viral en plasma, el déficit de la producción de IFN de tipo I y el incremento de la incidencia de infecciones oportunistas en estos pacientes^{168,169,171,441}.

De manera similar a lo que ocurre con la distribución numérica de las células dendríticas de SP de pacientes infectados por el VIH-1 y su posible infección por el virus, los estudios centrados en el análisis fenotípico y/o funcional de las células dendríticas circulantes en individuos VIH-1+ también han generado resultados discrepantes e incluso contradictorios, como se ha expuesto de forma detallada en la Introducción de esta tesis doctoral. A modo de breve recuerdo, algunos autores defienden que la capacidad de las células dendríticas de SP de pacientes infectados por el VIH-1 para estimular tanto linfocitos T alogénicos como respuestas antígeno-específicas a partir de CTL, se encuentra seriamente dañada^{47,456}; por el contrario, otros consideran que ésta es completamente normal^{438,455}. Asimismo, diferentes estudios han descrito la existencia de anomalías significativas en la expresión de moléculas co-estimuladoras o en la producción de citocinas inflamatorias por las células dendríticas de SP estimuladas *in vitro*^{150,456,458-460}, hallazgos que sin embargo, no han podido ser confirmados por otros autores^{175,455,457}. En definitiva, estas discrepancias reflejan el desconocimiento actual acerca del efecto que provoca la infección por el VIH-1 sobre las células dendríticas de SP, motivo que nos llevó a plantear el presente trabajo de tesis doctoral.

Debido a la dificultad que entraña el estudio de las células dendríticas *ex vivo*, la mayoría de los trabajos centrados en el análisis del papel de estas células en la infección por el VIH-1 han empleado MDDC, como modelo de estudio de las células dendríticas mieloides de SP. Sin embargo, merece destacar que el comportamiento fenotípico y funcional de las MDDC y de las células dendríticas mieloides de SP no es superponible, lo que podría contribuir a explicar algunas de las discrepancias anteriormente mencionadas. Además, en la actualidad no se dispone de un buen modelo que permita estudiar *in vitro* la subpoblación de células dendríticas plasmocitoides. Por todas estas razones, se hace imprescindible realizar estudios *ex vivo*, que puedan acercarse más a lo que realmente ocurre *in vivo* en pacientes infectados por el VIH-1. Si bien es verdad que hasta la fecha se han llevado a cabo algunos estudios *ex vivo* que se acercan más al modelo de lo que ocurriría *in vivo*, éstos son escasos y no han tenido en cuenta posibles diferencias entre las cohortes de pacientes VIH-1+ que se han comparado, que pueden condicionar los resultados obtenidos, sobre todo si tenemos en cuenta que en estos individuos es habitual la presencia de infecciones concomitantes. Así, en la

actualidad son escasos los estudios centrados en el análisis del efecto de la co-infección por el VHC –o por otros agentes infecciosos– sobre el sistema inmune de individuos infectados por el VIH-1⁴⁷³⁻⁴⁷⁵, lo que limita los conocimientos actuales acerca del posible papel de la co-infección por éste, u otros microorganismos, sobre las alteraciones observadas en el compartimiento de células dendríticas de SP de pacientes VIH-1⁺.

Por otro lado, son también relativamente escasos los estudios centrados en analizar el efecto que provoca la administración del TAR sobre las células dendríticas circulantes de pacientes VIH-1⁺, y nuevamente con resultados contradictorios. Así, mientras que algunos estudios defienden que la recuperación del número de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP tras la administración de TAR es incompleta^{440,441,469}, otros han observado una recuperación selectiva del número de células dendríticas mieloides⁴⁷⁰, o no han encontrado diferencias significativas con respecto a la situación basal previa al comienzo del tratamiento¹⁷⁰. Ante estos hallazgos, se hace imprescindible la realización de estudios prospectivos encaminados a investigar el efecto que provoca el TAR sobre las células dendríticas de SP, con el objeto de determinar si las anomalías asociadas a la infección por el VIH-1 son irreversibles, o pueden llegar a restaurarse con el tratamiento.

Finalmente, es sabido que la activación crónica del sistema inmunitario representa una de las principales características de la infección por el VIH-1, constituyendo uno de los factores críticos que conducen al estado de inmunodeficiencia típica de la enfermedad^{85,258,259}. El análisis de la expresión del antígeno CD38 en diferentes poblaciones linfoides se ha utilizado ampliamente, entre otros marcadores, con el fin de evaluar la capacidad del TAR para reducir la activación excesiva del sistema inmunitario en pacientes infectados por el VIH-1^{269-271,276,277}. Aún así, los estudios acerca de los cambios inducidos por el TAR sobre la expresión de CD38 en células T CD4⁺ y monocitos de pacientes VIH-1⁺ han generado resultados contradictorios^{128,278,279}, o son prácticamente inexistentes.

Ante estos antecedentes, en el presente trabajo de tesis doctoral nos hemos propuesto profundizar en el conocimiento del papel que desempeñan diferentes poblaciones celulares del sistema inmunitario en la patogenia de la infección por el VIH-1, a través del análisis *ex vivo* y detallado de la distribución numérica y de las características fenotípicas y funcionales de

diferentes subpoblaciones de células linfoides y de CPA de pacientes infectados por el VIH-1+, y de la evaluación del efecto del TAR sobre las mismas.

A continuación discutiremos de forma general, aunque separadamente, los resultados obtenidos en relación con cada uno de los objetivos planteados en este trabajo doctoral, reflejo de lo descrito anteriormente en la sección de Material, Métodos y Resultados.

1.- Distribución numérica y características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+.

Numerosos trabajos corroboran la implicación de las células dendríticas de SP en la patogenia de la infección por el VIH-1, ya sea porque estas células resultan infectadas al contactar con el virus, o porque su capacidad para desencadenar respuestas específicas a partir de células T se encuentra notablemente alterada. Pese a ello, el papel que desempeñan las células dendríticas en la infección por el VIH-1 sigue sin aclararse, y seguimos sin disponer de estudios centrados en el análisis sistemático *ex vivo* de la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas de SP de pacientes VIH-1+. El primer objetivo del presente trabajo doctoral se centró en analizar la distribución numérica, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas y la capacidad de producir citocinas inflamatorias de forma espontánea –en ausencia de estimulantes exógenos–, de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP de un grupo de pacientes “progresores” infectados por el VIH-1 (VIH-1+P); seleccionamos exclusivamente pacientes que no habían recibido TAR con anterioridad a su inclusión en el estudio, con el objeto de evitar la posible influencia de los fármacos antirretrovirales en los resultados obtenidos. Además, teniendo en cuenta que la co-infección por los virus VIH-1+ y VHC es bastante común, y que diferentes trabajos han demostrado la existencia de graves alteraciones en la maduración y capacidad funcional de las células dendríticas de pacientes VHC+⁴⁷⁶⁻⁴⁷⁸, incluimos como controles, además de adultos sanos, un grupo de pacientes VIH-1-/VHC+. Finalmente, incluimos también como grupo control, pacientes VIH-1+NPLP –caracterizados por tener un número estable de linfocitos T CD4+ en SP, niveles

bajos de carga viral en plasma, y no desarrollar SIDA tras 10 o más años de infección^{479,480}—, con el objeto de identificar aquellos factores potencialmente relacionados con la progresión retardada de la infección.

En cuanto a la distribución numérica de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP, nuestros resultados demuestran claramente la existencia de una profunda depleción de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP en pacientes VIH-1+P, de acuerdo con lo publicado previamente por otros autores^{169,439-441}. En la actualidad se desconoce si la depleción de las células dendríticas mieloides y plasmocitoides es consecuencia directa de su infección por el VIH-1 y su consiguiente destrucción y muerte, o si refleja el secuestro de ambas subpoblaciones de CPA en los órganos linfoides secundarios, donde tiene lugar la replicación activa del virus. Respecto a los otros grupos de pacientes analizados, observamos que el número absoluto de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP era normal (p. ej.: en individuos VIH-1+ NPLP), o estaba incluso significativamente incrementado (p. ej.: en el caso de las células dendríticas mieloides de pacientes VIH-1-/VHC+). En contraposición con la depleción de células dendríticas mieloides y plasmocitoides, el número absoluto de células dendríticas CD16+ de sujetos VIH-1+P era normal, encontrándose incluso incrementado de manera significativa tanto entre los pacientes VIH-1-/VHC+ como en sujetos VIH-1+ NPLP, contribuyendo al aumento global del número absoluto de células dendríticas observado en estos dos últimos grupos de pacientes. El hecho de que el número de células dendríticas CD16+ no esté disminuido en pacientes VIH-1+P, y esté incluso incrementado significativamente en sujetos VIH-1+ NPLP, podría estar relacionado con el hecho de que las células dendríticas CD16+ puedan ser menos susceptibles a la infección por el VIH-1. En este sentido, recientemente se ha descrito que estas células constituyen la única subpoblación de células dendríticas de SP que expresa la molécula de membrana DC-SIGN¹⁵²; dado que la entrada del VIH-1 a la célula diana puede ser bloqueada mediante la unión de DC-SIGN a la gp-120 del virus²³, las células dendríticas CD16+ estarían protegidas frente a la infección por el VIH-1 y su número no estaría reducido, confiriéndoles a la vez un papel crucial en la transmisión del VIH-1 a los linfocitos T¹⁵².

Una vez establecida la presencia de alteraciones numéricas en las poblaciones celulares de SP antes referidas, analizamos la posible existencia de anomalías fenotípicas adicionales que afectarían al patrón de expresión de receptores de quimiocinas en células dendríticas y monocitos de SP de individuos VIH-1+P, y que pudiesen contribuir a esclarecer la mayor o menor susceptibilidad de estas poblaciones celulares a la infección por el VIH-1. En este sentido, nuestros resultados pusieron de manifiesto la existencia de alteraciones evidentes en el patrón de expresión de receptores de quimiocinas en las células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP de pacientes VIH-1+P, sin que se detectaran cambios significativos respecto al patrón de expresión observado entre AS en el caso de las células dendríticas CD16+ y monocitos de SP. Así, encontramos una expresión significativamente disminuida de CXCR2, CCR5 y CXCR4 en las células dendríticas mieloides, en las células dendríticas plasmocitoides, y en ambas subpoblaciones de células dendríticas, respectivamente. Diversos estudios han demostrado que la unión de una quimiocina a su receptor induce la internalización de dicho receptor, para dar comienzo a la cascada de señales que desencadenan la respuesta correspondiente^{140,142,481}. La expresión disminuida de CXCR2 que se observa en las células dendríticas mieloides de individuos VIH-1+P podría reflejar la internalización de dicho receptor tras su interacción con la IL-8. A su vez, la expresión reducida de CCR5 en las células dendríticas plasmocitoides de pacientes VIH-1+P podría estar directamente relacionada con la infección por el VIH-1, ya que previamente se ha demostrado que en el caso de los linfocitos T CD4+, la infección por el VIH-1 conlleva una disminución de la expresión de CD4 y CCR5 en estas células⁴⁸², de forma similar a lo que podría suceder con las células dendríticas plasmocitoides de SP. En la actualidad se conoce que la proteína viral Nef induce la internalización del receptor CD4 y su posterior degradación⁴⁸³, aunque el mecanismo por el que se produciría la alteración de la expresión de CCR5 sigue sin identificarse. En este sentido, cabe la posibilidad de que la expresión reducida de CCR5 en células dendríticas plasmocitoides refleje la maduración de estas células tras su interacción con el VIH-1, ya que ésta se ha asociado con la disminución de la expresión de CCR5 en la membrana citoplasmática⁴⁸⁴. Sin embargo, merece destacar que la proporción de células dendríticas plasmocitoides que expresaba CCR5 se encontraba reducida de manera significativa, no

solamente en los pacientes VIH-1+P, sino también en individuos VIH-1+ NPLP. Con respecto a CXCR4, observamos que la expresión de este receptor estaba significativamente reducida en las células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP de todos los grupos de pacientes analizados –VIH-1+P, VIH-1/VHC+ y VIH-1+ NPLP–. Aunque se ha demostrado una disminución de la expresión de CXCR4 en los linfocitos T CD4+ tras su infección con una variante linfotrópica del VIH-2⁴⁸⁵, esto no ha podido confirmarse para el VIH-1⁴⁸². No obstante, se ha constatado que en la infección por el VIH-1, la secreción de citocinas de tipo Th1 induce una disminución de la expresión de CXCR4 en células dendríticas maduras⁴⁸⁶, lo que podría contribuir, al menos en parte, a la reducción de la expresión de CXCR4 observada en nuestra serie, tanto en células dendríticas mieloides como plasmocitoides. Merece destacar que la fuerte correlación negativa que hemos observado entre la carga viral en plasma y el porcentaje de células dendríticas mieloides y plasmocitoides CXCR4+, para los pacientes VIH-1+P con >200 células T CD4+/μl de SP, sugiere que la expresión reducida de CXCR4 en ambas poblaciones celulares podría deberse al propio VIH-1. Por lo tanto, el hecho de que las células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP expresen los dos correceptores necesarios para la entrada del VIH-1 en la célula, CXCR4 y CCR5, junto con su número reducido en pacientes VIH-1+P, apoyaría la hipótesis de la existencia en estos pacientes de una interacción directa entre el virus y ambas poblaciones celulares^{168,170,440,442}. Dado que las células dendríticas desempeñan un papel crucial en el inicio y mantenimiento de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa, y constituyen las células más potentes en la estimulación de linfocitos T vírgenes, la depleción de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de la circulación podría estar implicada en las alteraciones de la capacidad funcional de los linfocitos T que se observan en pacientes VIH-1+P^{47,487}.

A diferencia de CCR5, ausente en la membrana de las células dendríticas CD16+ de SP, estas células sí expresaban el correceptor CXCR4, lo que las hace por tanto también susceptibles a la infección por cepas linfotrópicas del VIH-1³⁹. Sin embargo, se ha demostrado que la afinidad de la gp-120 del VIH-1 por la molécula DC-SIGN es mayor que su afinidad por CD4²³, por lo que la unión de DC-SIGN a gp-120 evitaría la interacción entre gp-120-CD4-CXCR4, lo que protegería a las células dendríticas CD16+ frente a la infección por el VIH-1.

Este hallazgo es especialmente relevante, si tenemos en cuenta que, de este modo, la población de células dendríticas CD16+ podría constituir un reservorio celular no infectado, con capacidad de activar respuestas específicas más eficaces.

Precisamente, con el objeto de conocer el estado funcional de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP de individuos VIH-1+P, hemos analizado la capacidad de estas células para producir citocinas inflamatorias de manera espontánea –en ausencia de estimulantes exógenos–, lo que podríamos considerar como un reflejo de lo que ocurriría *in vivo* en estos pacientes. Las citocinas inflamatorias son importantes moléculas efectoras en el inicio, mantenimiento y regulación de las respuestas inmunitaria e inflamatoria, constituyendo un componente esencial en la comunicación entre las CPA y los linfocitos T^{488,489}. Por lo tanto, una alteración en la producción de citocinas inflamatorias, en una enfermedad en la que de por sí ya existe un grave deterioro de la inmunidad celular causado por el VIH-1, podría contribuir a empeorar, aún más, el estado de inmunodeficiencia propio de estos pacientes. En este sentido, numerosos trabajos han descrito la existencia de alteraciones significativas en la producción de citocinas inflamatorias por las células del sistema inmunitario en la infección por el VIH-1²⁶⁶⁻²⁶⁸, incluyendo una producción incrementada de citocinas inflamatorias por células dendríticas aisladas de pacientes VIH-1+, o expuestas *in vitro* a dosis elevadas de VIH-1 o a proteínas víricas^{150,434,457,490}.

En el presente trabajo, comprobamos que tanto los monocitos como las diferentes subpoblaciones de células dendríticas de SP de AS e individuos VIH-1+ NPLP no producían citocinas inflamatorias en ausencia de estimulación. Por el contrario, en los pacientes VIH-1+P, y en menor medida, en los individuos VIH-1-/VHC+, existía producción espontánea de cantidades significativas de todas las citocinas inflamatorias analizadas, lo que podría reflejar la existencia de una activación del sistema inmunitario *in vivo* en los pacientes VIH-1+P no sometidos a TAR, que no se produciría en sujetos VIH-1+ NPLP. De acuerdo con estos hallazgos, podríamos especular que la menor expresión de CXCR4 observada en células dendríticas mieloides, y de CXCR4 y CCR5 en células dendríticas plasmocitoides de individuos VIH-1+ NPLP, podría ocurrir de forma natural *in vivo*, lo que contribuiría a proteger a estas células frente a la infección por cepas linfotrópicas y macrofagotrópicas del VIH-1; por el

contrario, en sujetos VIH-1+P, la expresión disminuida de CXCR4 y CCR5 en ambas subpoblaciones de células dendríticas podría deberse directamente al VIH-1, o a mecanismos mediados por las citocinas inflamatorias secretadas. Merece destacar que, al clasificar a los individuos VIH-1+P en función del número absoluto de linfocitos T CD4+ de SP (<200 vs >200 células CD4+/ μ l de SP) detectamos un estado de hiperactivación más acusado –de acuerdo a su capacidad de secreción espontánea de citocinas inflamatorias– en los pacientes con >200 células T CD4+/ μ l de SP, especialmente en el caso de las células dendríticas plasmocitoides, lo que podría reflejar una mayor capacidad de respuesta del sistema inmunitario frente a la infección por el VIH-1, en pacientes menos inmunodeprimidos. Además, es importante señalar que la producción espontánea de citocinas inflamatorias por las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP de individuos VIH-1+P era independiente de la coinfección por el VHC, ya que al clasificarlos en función de la presencia o ausencia de coinfección por este virus, no detectamos diferencias significativas en cuanto a la secreción de citocinas, en ausencia de estímulo exógeno. Es más, en los individuos VIH-1+P la secreción espontánea de citocinas inflamatorias se asoció con una disminución del número absoluto de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP, y una expresión reducida del receptor de quimiocinas CCR5, características que no se observaban en sujetos VIH-1-/VHC+. Independientemente de su significado, estos hallazgos reflejan la existencia de patrones de alteraciones claramente diferentes para ambos grupos de pacientes –VIH-1+P y VIH-1-/VHC+–, lo que apoyaría la existencia de diferentes mecanismos fisiopatológicos en cada uno de los dos modelos de infección. Por otro lado, se ha demostrado que, en pacientes infectados por el VIH-1, la secreción de determinadas citocinas inflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α , favorece la replicación viral en linfocitos T CD4+^{150,151,491}, mientras que el tratamiento con inmunosupresores bloquea la replicación del VIH-1 mediante la inhibición de la secreción de citocinas⁴⁹²; además, se conoce que la capacidad de las células dendríticas para presentar antígenos a los linfocitos T disminuye tras su exposición a TNF- α ³⁶¹. Todos estos hallazgos indican que la secreción excesiva de citocinas inflamatorias que se produciría *in vivo* en pacientes VIH-1+P podría contribuir a la génesis de las alteraciones funcionales de las células dendríticas de SP que se observan en estos pacientes.

En definitiva, hemos observado alteraciones significativas en la distribución, fenotipo y función de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+P no tratados con TAR. De acuerdo con estos hallazgos, nos planteamos como segundo objetivo, analizar el efecto del TAR sobre la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas y monocitos de SP en individuos VIH-1+P, con el objeto de comprobar si las anomalías causadas por el virus son irreversibles o bien pueden llegar a restaurarse tras la administración del tratamiento.

2.- Efecto del TAR sobre la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+.

El TAR ha constituido hasta la fecha, el mayor éxito como estrategia terapéutica enfocada a la inhibición de la replicación vírica y la reducción de la carga viral en pacientes infectados por el VIH-1, permitiendo así la reconstitución parcial de los niveles de linfocitos T CD4+ y la disminución de los índices de morbi-mortalidad asociados a esta enfermedad⁵⁻⁸. Sin embargo, es sabido que ninguno de los tratamientos empleados hasta la fecha ha sido capaz de erradicar el virus del organismo, ni de restaurar completamente la capacidad funcional del sistema inmunitario de los individuos infectados por el VIH-1⁹⁻¹¹. Con el fin de profundizar en el conocimiento acerca del grado de recuperación funcional del sistema inmunitario tras tratamiento antirretroviral, y de los factores que contribuyen a la misma, el segundo objetivo de este trabajo doctoral se centró en analizar el efecto del TAR a corto y largo plazo sobre la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de cada población celular objeto del estudio.

De acuerdo con hallazgos previos de otros autores^{279,493,494}, comprobamos que el tratamiento antirretroviral provocaba una rápida disminución de la carga viral hasta niveles indetectables, en todos los pacientes. Sin embargo, el TAR no consiguió una reconstitución completa del compartimiento de células T, de manera que el número absoluto de linfocitos T CD4+ se mantenía por debajo de los valores normales, y el de células T CD8+ seguía significativamente incrementado respecto a AS, incluso después de un año de TAR. Estos

hallazgos podrían reflejar la existencia de replicación viral indetectable mediante métodos convencionales, y por tanto, la persistencia del VIH-1 en el organismo, así como la generación de respuestas citotóxicas específicas frente a él. Otra posible explicación al hecho de que la reconstitución del compartimiento de células T observada al año de TAR no sea completa sería que ésta simplemente fuera reflejo de una homeostasis de células T constantemente alterada, característica de la infección por el VIH-1. Cabe destacar que las anomalías que hemos detectado en la distribución de los linfocitos T CD4+ y CD8+ de SP tras un año de TAR, eran más acusadas en el grupo de individuos VIH-1+ inicialmente más inmunodeprimidos (con <200 células T CD4+/ μ l en SP), lo que apoyaría la hipótesis de que la reconstitución del sistema inmunitario sería más efectiva cuanto antes se inicie el TAR⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁸.

Como hemos referido anteriormente, numerosos estudios han puesto de manifiesto la implicación de las células dendríticas de SP en la patogenia de la infección por el VIH-1^{39,42,46,47}. Sin embargo, a pesar del papel que desempeñan estas células en la infección por el VIH-1, y de la existencia de importantes alteraciones en su número y función, son todavía escasos los estudios en los que se han evaluado los efectos del TAR sobre su distribución y funcionalidad en pacientes infectados por el VIH-1, así como la posible implicación de estas células en la recuperación incompleta del sistema inmunitario, tras la administración de TAR^{170,177,440,441}.

Nuestros resultados demuestran que la administración de TAR se asocia con una recuperación total del número absoluto de células dendríticas mieloides y plasmocitoides de SP de pacientes VIH-1+, alcanzándose niveles normales al año de tratamiento. No obstante, merece destacar que la recuperación del número absoluto de células dendríticas plasmocitoides fue más tardía que la de las células dendríticas mieloides, que alcanzó niveles normales hacia la segunda semana de tratamiento, tanto para los pacientes con <200 células T CD4+/ μ l en SP como para los que presentaban >200 células T CD4+/ μ l en SP. Esta diferencia en la cinética de recuperación de ambas poblaciones de células dendríticas podría reflejar la existencia de distintos mecanismos de depleción de la circulación sanguínea para cada una de ellas, durante la fase de replicación activa del VIH-1. Por el contrario, pese a que en situación basal el número absoluto de células dendríticas CD16+ y de monocitos de SP era normal en

los pacientes VIH-1+P, al año de tratamiento ambas poblaciones celulares se encontraban incrementadas de forma significativa en SP en los pacientes más inmunodeprimidos. En la actualidad, desconocemos si el incremento específico del número absoluto de células dendríticas CD16+ y de monocitos de SP que se observa tras el tratamiento, en pacientes VIH-1+ con niveles más bajos de linfocitos T CD4+ en SP, puede ser debido a un efecto directo del VIH-1 sobre ambas poblaciones celulares, a la activación generalizada del sistema inmunitario característica de la infección, o bien a un efecto tardío del TAR, por lo que se requiere de estudios adicionales que ayuden a dilucidar estas cuestiones. En cualquier caso, hay que tener en cuenta que la expansión específica de células dendríticas CD16+ en SP no es exclusiva de la infección por el VIH-1, dado que su incremento se ha descrito también en otras enfermedades sistémicas de naturaleza inflamatoria^{499,500}.

Por otra parte, nuestros resultados ponen también de manifiesto la normalización de la expresión del receptor CCR5 en células dendríticas plasmocitoides de SP de pacientes infectados por el VIH-1, tras el TAR. De acuerdo con estos hallazgos, y según lo descrito anteriormente en relación con la internalización de los receptores de quimiocinas tras la unión a su ligando correspondiente, Giovannetti y cols⁵⁰¹ han demostrado que la secreción excesiva de las quimiocinas RANTES y SDF-1 –que son los ligandos naturales de CCR5 y CXCR4, respectivamente–, disminuye tras la administración de TAR, hasta alcanzar niveles prácticamente normales. Así, al disminuir la secreción de RANTES tras el comienzo del tratamiento, disminuiría también la internalización de CCR5, como consecuencia de su unión a dicha quimiocina. En contraposición con lo referido en relación a la expresión de CCR5, el patrón de expresión de receptores de quimiocinas de tipo CXC permanecía seriamente alterado, incluso después de un año de TAR. Así, tras un año de TAR observamos una expresión significativamente incrementada de CXCR1 y CXCR2 en los monocitos de SP de los pacientes VIH-1+ más inmunodeprimidos –individuos con <200 células T CD4+/ μ l en SP–, junto con una expresión significativamente disminuida de CXCR2 y CXCR4 en las células dendríticas mieloides de SP para ambos grupos de pacientes VIH-1+. Esta expresión alterada de receptores de quimiocinas podría deberse a la persistencia de replicación viral en órganos linfoides secundarios, y a un reclutamiento constante de CPA –incluidos monocitos–, a los

sitios de inflamación. En definitiva, se requiere de estudios adicionales, con el fin de poder esclarecer si las alteraciones de la expresión de receptores de quimiocinas representan una característica irreversible de los estadios avanzados de la infección por el VIH-1, o bien pueden revertir tras la administración de TAR durante períodos prolongados de tiempo, en ausencia de replicación viral.

Respecto al efecto del TAR sobre la producción espontánea de citocinas inflamatorias, en ausencia de estimulantes exógenos, comprobamos que tras el inicio del tratamiento, la producción espontánea de citocinas por las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+P fue disminuyendo progresivamente, hasta desaparecer por completo al año de haber iniciado el TAR, en el grupo de pacientes que inicialmente presentaba niveles más elevados de linfocitos T CD4+ en SP. La desaparición de la producción espontánea de citocinas inflamatorias tras la administración de TAR en estos individuos, apoyaría la existencia de una disminución del estado de activación *in vivo* de las células inflamatorias, lo que a su vez podría reflejar una disminución de la replicación viral y una reconstitución parcial de las células del sistema inmunitario. Por el contrario, si bien los pacientes más inmunodeprimidos –individuos con <200 células T CD4+/ μ l en SP– experimentaron una disminución de la carga viral en plasma hasta niveles indetectables, sus células presentadoras de antígeno seguían produciendo citocinas inflamatorias en ausencia de estímulos exógenos, incluso un año después de iniciado el TAR. Es más, en los individuos VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μ l en SP, observamos una fuerte correlación inversa entre la producción espontánea de IL-6 y TNF- α por los monocitos y las células dendríticas CD16+, y el porcentaje de células dendríticas mieloides que expresaban CXCR2 y CXCR4; estos hallazgos sugieren además que la secreción espontánea de citocinas inflamatorias observada *ex vivo*, podría contribuir *in vivo* a las alteraciones del patrón de expresión de receptores de quimiocinas que se observan al año de TAR. La secreción de citocinas inflamatorias se ha asociado con el aumento de la replicación viral en linfocitos T CD4+ de pacientes VIH-1+^{150,151}, así como con el reclutamiento de células T CD4+ en reposo a sitios de inflamación, lo que contribuye a la propagación de la infección¹⁵²⁻¹⁵⁴. Teniendo en cuenta que en los individuos VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μ l, el número absoluto de células dendríticas CD16+ y de monocitos de SP

estaba aumentado de forma significativa al año de TAR, ello podría contribuir a empeorar, aún más, los efectos negativos de la secreción persistente de citocinas inflamatorias, en este grupo de pacientes.

De acuerdo con estos resultados, podríamos especular que el efecto que provoca el TAR sobre la producción *in vivo* de citocinas inflamatorias por las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP, podría estar más relacionado con el grado de reconstitución del sistema inmunitario, que con la disminución de la replicación viral. De este modo, la reconstitución del sistema inmunitario afectaría a la funcionalidad de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP, y por tanto, a su capacidad para responder frente a un estímulo externo. Ante esta posibilidad, nuestro interés se centró de inmediato en evaluar la capacidad de respuesta de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP de pacientes infectados por el VIH-1, frente a estímulos externos como LPS e IFN- γ .

En los últimos años, se ha demostrado ampliamente que la producción de citocinas inflamatorias por las células del sistema inmunitario se encuentra profundamente alterada en la infección por el VIH-1²⁶⁶⁻²⁶⁸. Pese a ello, siguen sin aclararse cuales son los efectos concretos que provoca la infección por el VIH-1, directa o indirectamente, sobre la capacidad funcional de las células dendríticas de SP; así, a modo de ejemplo, los resultados referidos en la literatura en cuanto a la capacidad de las células dendríticas de SP –aisladas de pacientes VIH-1+ o tras su exposición *in vitro* a dosis elevadas del virus– para producir citocinas inflamatorias tras estimulación con CD154 (CD40L) y/o LPS^{150,455,457-460}, son contradictorios. Como hemos referido anteriormente, esto podría ser debido a la existencia de diferencias significativas en el estado de madurez y/o grado de pureza de las subpoblaciones de células dendríticas analizadas, al diferente grado de infección celular alcanzado tras la exposición de las células dendríticas al VIH-1, o a la heterogeneidad de las cohortes de pacientes estudiadas. Merece destacar que la mayoría de los trabajos centrados en el estudio de las células dendríticas en la infección por el VIH-1 han empleado células dendríticas diferenciadas *in vitro* a partir de monocitos, tras su exposición a concentraciones elevadas de GM-CSF e IL-4, lo que podría modificar la funcionalidad de las células dendríticas analizadas. En el presente trabajo, hemos

analizado la producción de citocinas inflamatorias por las diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP tras su estimulación con LPS e IFN- γ *ex vivo*; además, obtuvimos información individualizada para cada célula, lo que probablemente constituye un mejor reflejo de lo que ocurriría *in vivo* en pacientes VIH-1+, a la vez que permite un análisis individualizado de la cinética de producción de citocinas inflamatorias para cada subpoblación celular. En términos generales, en situación basal detectamos una producción incrementada de citocinas inflamatorias por parte de las células dendríticas de SP de origen mieloide –células dendríticas CD33+++ y células dendríticas CD16+–, tras su estimulación *in vitro* con LPS e IFN- γ , en aquellos pacientes VIH-1+ que presentaban >200 células T CD4+/ μ l en SP. Por el contrario, la producción de citocinas inflamatorias por los monocitos de SP se encontraba dentro de los niveles normales, independientemente del recuento de células T CD4+ en SP. Estos resultados apoyan lo referido en estudios previos, en los que se ha descrito una secreción incrementada de IL-12 a partir de células de SP estimuladas con LPS en pacientes VIH-1+ asintomáticos⁵⁰², o a partir de MDDC –infectadas *in vitro* o tras su exposición a gp-120–, estimuladas con CD154 (CD40L)^{458,503}. Por el contrario, nuestros datos estarían en contra de aquellos autores que defienden que las células dendríticas de SP podrían contribuir al déficit de IL-12 que se observa en individuos VIH-1+⁴⁵⁹.

Aunque se ha descrito que la administración del TAR disminuye la secreción excesiva de citocinas inflamatorias por las células mononucleadas de SP en general, y por los monocitos en particular^{266,475}, los conocimientos actuales acerca del efecto del TAR sobre la capacidad de las diferentes subpoblaciones de células dendríticas de SP de individuos VIH-1+ para producir citocinas inflamatorias tras su estimulación *in vitro*, siguen siendo muy limitados. En este sentido, resultan especialmente interesantes nuestros hallazgos, ya que, a corto plazo, muestran la ausencia de cambios significativos en la producción de citocinas inflamatorias por parte de las células dendríticas y monocitos de SP de pacientes infectados por el VIH-1, tras estimulación *in vitro*; por el contrario, al año de tratamiento, detectamos un patrón de secreción de IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF- α variable, en función del número absoluto de linfocitos T CD4+/ μ l presentes en SP. Así, la producción de citocinas inflamatorias estaba significativamente incrementada en los individuos más inmunodeprimidos (<200 células T CD4+/ μ l en SP),

mientras que se encontraba disminuida en los más inmunocompetentes (>200 células T CD4+/ μ l en SP). Ante estos hallazgos observados al año de tratamiento, cabía determinar si el nivel de reconstitución del número de linfocitos T CD4+ en SP tras un año de TAR, o la presencia de co-infección por el VHC, se asociaban con la recuperación funcional de las células presentadoras de antígeno. De nuevo, nuestros resultados mostraron que, dentro de los pacientes más inmunodeprimidos (<200 células T CD4+/ μ l en SP), únicamente aquellos individuos con buena recuperación del número de células T CD4+ en SP al año de TAR, mostraban un incremento de su capacidad de respuesta frente a LPS e IFN- γ . De acuerdo con estos hallazgos, recientemente se ha asociado la observación de una producción aumentada de citocinas inflamatorias por células de SP tras estimulación con LPS con una progresión más lenta de la infección, y una disminución de los índices de mortalidad de pacientes infectados por el VIH-1⁵⁰⁴. Así, la producción incrementada de citocinas inflamatorias observada en aquellos pacientes VIH-1+ que al año de TAR presentaban una mayor recuperación del número de células T CD4+ en SP, podría asociarse a una reconstitución y/o restablecimiento y mejora de la capacidad funcional de las células dendríticas de origen mieloide y de los monocitos de SP. A su vez, el descenso de la producción de citocinas inflamatorias observado en los pacientes VIH-1+ con >200 células T CD4+/ μ l en SP, se asociaba claramente a la presencia de co-infección por el VHC, siendo normal el patrón de secreción de citocinas inflamatorias en los individuos con >200 células T CD4+/ μ l en SP que eran VHC-. Dado que la infección por el VHC induce una hiperactivación del sistema inmunitario⁵⁰⁵, y el TAR no inhibe la replicación del VHC⁵⁰⁶, cabría esperar que este estado de activación se mantuviese en los individuos VIH-1+ co-infectados por el VHC y sometidos a TAR. Dicho estado de hiperactivación continua podría conducir a un agotamiento o saturación de las células del sistema inmunitario, que se reflejaría en una disminución de su capacidad de respuesta frente a estímulos externos, incluidos el LPS e IFN- γ . Esto contribuiría a explicar, al menos en parte, la menor proporción de células productoras de citocinas inflamatorias observada al año de TAR en los individuos VIH-1+/VHC+ con >200 células T CD4+/ μ l en SP, tras su estimulación *in vitro* con LPS e IFN- γ ; es más, en este grupo de pacientes, en ausencia de tratamiento específico para la infección por el VHC, observamos un nivel incrementado de ARN de este virus en plasma al año de TAR. El hecho

de que estos pacientes tengan niveles plasmáticos más elevados de ARN del VHC, en ausencia de tratamiento específico para la co-infección por este virus, junto al efecto inhibitor del TAR sobre la replicación del VIH-1, contribuiría a explicar por qué los efectos de la co-infección por el VHC sobre la funcionalidad de las células dendríticas de origen mieloide y los monocitos de SP, únicamente se hicieron evidentes tras el comienzo del TAR. En este sentido, se requiere la realización de estudios adicionales que incluyan pacientes VIH-1+/VHC+ que reciban tratamiento para ambas infecciones, con el objeto de esclarecer el efecto que provoca la infección por el VHC sobre la producción de citocinas inflamatorias por CPA estimuladas *in vitro* con LPS e IFN- γ . Dado que en pacientes VIH-1+/VHC- con >200 células T CD4+/ μ l en SP, la producción de citocinas inflamatorias por las células dendríticas de origen mieloide y monocitos de SP era normal al año de tratamiento, cabe pensar que se acusarán más los efectos de la co-infección por el VHC en aquellos pacientes en los que el TAR logra un mayor grado de restablecimiento de los efectos de la infección por el VIH-1 –como ocurriría en los pacientes más inmunocompetentes–.

Merece destacar el comportamiento de la IL-12, que fue diferente al del resto de las citocinas inflamatorias analizadas. Así, tras el comienzo del TAR, la proporción de células dendríticas de origen mieloide –células CD33+++ y células CD16+– que producían IL-12 tras estimulación *in vitro* con LPS e IFN- γ , aumentaba de forma progresiva a medida que avanzaba el tratamiento, manteniéndose significativamente incrementada tras un año de TAR, independientemente del número de células T CD4+ en SP. Este hallazgo podría reflejar una mejora de la capacidad funcional del sistema inmunitario de los pacientes VIH-1+ tras el tratamiento, dado que la presencia de IL-12 podría, a su vez, contribuir a facilitar la puesta en marcha de una respuesta inmunitaria de tipo Th1, esencial en la defensa frente a infecciones intracelulares. Es más, se ha descrito que la IL-12 podría estar implicada de forma indirecta en la alteración de la expresión de CCR5 en los linfocitos T, mediante la inducción de la secreción de quimiocinas⁵⁰⁷. Por todo ello, la presencia de niveles elevados de IL-12 podría contribuir a prevenir la infección de los linfocitos T por cepas macrofagotrópicas del VIH-1. De acuerdo con esta hipótesis, durante el tratamiento observamos una alta correlación directa entre la concentración de IL-12 en plasma y la proporción de células dendríticas CD16+ de SP que

producían IL-12 tras estimulación en individuos VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μl en SP, evidenciando la posible importancia de las células dendríticas CD16+ en la producción de IL-12 en los individuos VIH-1+ más inmunocomprometidos, sometidos a TAR. Por otra parte, merece destacar que, aunque al año de TAR la proporción de células dendríticas de origen mieloide que producían IL-12 tras estimulación estaba significativamente incrementada en los pacientes con >200 células T CD4+/ μl en SP, la cantidad media de IL-12 producida por célula se encontraba considerablemente reducida en comparación con el grupo de AS. De forma similar a lo que ocurría con las otras citocinas inflamatorias analizadas, este hallazgo se asoció con la presencia de co-infección por el VHC, sugiriendo que en el grupo de pacientes VIH-1+ con >200 células T CD4+/ μl en SP co-infectados por el VHC, el sistema inmunitario es capaz de responder frente a un estímulo exógeno mediante el aumento de la proporción de células productoras de IL-12; sin embargo, la magnitud de dicha respuesta –evaluada como la cantidad media de IL-12 producida por célula– no resulta adecuada.

Respecto a las células dendríticas plasmocitoides de SP, nuestros resultados demuestran la ausencia de diferencias significativas entre la producción espontánea y estimulada de citocinas inflamatorias *in vitro*, lo que refleja que el uso combinado de LPS e IFN- γ no constituye un estímulo apropiado para inducir la secreción de citocinas inflamatorias en estas células. De hecho, se ha demostrado que las células dendríticas plasmocitoides no responden adecuadamente a IFN- γ , mientras que incrementan su supervivencia en respuesta a otros estímulos, como IL-3 y “oligodesoxinucleótidos” (ODNs) de origen vírico/bacteriano⁴⁰¹.

3.- Expresión de CD38 en linfocitos T y monocitos de SP de pacientes VIH-1+.

De acuerdo con lo referido anteriormente, la activación crónica del sistema inmunitario constituye una de las principales características de la infección por el VIH-1, siendo uno de los factores críticos que contribuyen al estado de inmunodeficiencia típico de esta enfermedad^{85,258,259}. En este sentido, la infección por el VIH-1 se ha asociado clásicamente con una expresión incrementada del antígeno CD38, entre otros marcadores de activación, en los linfocitos T CD8+ de SP; este incremento de la expresión de CD38 persiste a lo largo del curso de la infección, en pacientes que no reciben TAR^{260-265,508}. Hoy sabemos que el incremento de la expresión de CD38 no es exclusivo de los linfocitos T CD8+ de SP, ya que los linfocitos T CD4+ circulantes de pacientes VIH-1+ también sobre-expresan CD38 en su membrana²⁷⁶⁻²⁷⁹. La expresión incrementada de CD38 en linfocitos T de sujetos VIH-1+ constituye un reflejo del estado de activación crónica del sistema inmunitario típico de la infección, habiéndose asociado con una progresión más acelerada de la enfermedad en pacientes VIH-1+ no tratados con TAR^{261,263,264,284}. De acuerdo con hallazgos previos de otros autores^{260-262,265,276,277}, nuestros resultados demuestran que los linfocitos T de SP –tanto CD8+ como CD4+– de pacientes infectados por el VIH-1, expresan una cantidad de moléculas CD38 significativamente superior a la observada en su contrapartida normal. Además, nuestros hallazgos demuestran, por primera vez, la existencia de una expresión anormalmente elevada de CD38 en los monocitos de SP de individuos VIH-1+ no tratados con TAR, hecho que sugiere que el estado de hiperactivación asociado a la expresión incrementada de CD38 en pacientes infectados por el VIH-1 no se restringe al compartimiento de células T de SP, sino que se extiende también a células inflamatorias circulantes. Además, el elevado grado de correlación observado en situación basal para los pacientes VIH-1+ con >200 células T CD4+/ μ l en SP, entre los niveles de carga viral en plasma y la cantidad de moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T CD8+ y CD4+ de SP, sugiere que la expresión incrementada de CD38 en el compartimiento de células T de SP –pero no en el de monocitos–, podría estar estrechamente asociada con la replicación activa del VIH-1, en el caso de los pacientes VIH-1+ más inmunocompetentes. Por el contrario, no encontramos una correlación significativa entre los niveles de carga viral en

plasma y la expresión de CD38 en los linfocitos T CD8+ y CD4+ de SP para los pacientes más inmunodeprimidos (<200 células T CD4+/ μ l en SP), como tampoco hallamos una asociación clara entre la carga viral y la expresión de CD38 en los monocitos de SP para ninguno de los dos grupos de pacientes VIH-1+ analizados.

Este hallazgo podría deberse a diferentes motivos. En primer lugar, merece destacar que diferentes estudios han asociado la marcada depleción de linfocitos T CD4+ de la circulación sanguínea que se observa en pacientes VIH-1+, con el incremento de la migración de estas células a los órganos linfoides secundarios, donde tiene lugar la replicación activa del VIH-1⁵⁰⁹⁻⁵¹¹. Esto explicaría la ausencia de una correlación entre el número de moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T CD4+ de SP y la carga viral plasmática en pacientes con <200 células T CD4+/ μ l en SP, dado que en estos individuos más inmunocomprometidos la mayoría de sus linfocitos T CD4+ activados –aquellos que expresarían una cantidad elevada de moléculas de CD38– habrían migrado desde la SP hacia los órganos linfoides secundarios^{128,129}. Merece destacar que los individuos VIH-1+ que hemos incluido en este estudio eran asintomáticos, y ninguno de ellos se encontraba en fase avanzada de la enfermedad. Por otra parte, los pacientes VIH-1+ en fases avanzadas de la infección presentan graves alteraciones a la hora de generar respuestas inmunitarias a partir de los linfocitos T CD8+ de SP, probablemente debido a la falta de las señales adecuadas²²⁰. Esto contribuiría a explicar la ausencia de una correlación directa entre el número de moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T CD8+ de SP y la carga viral en plasma en los pacientes VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μ l en SP. Finalmente, hoy se conoce que en condiciones fisiológicas, una vez que los monocitos han completado su proceso de maduración en la médula ósea, éstos entran en la circulación sanguínea, para al cabo de unos días migrar hacia los órganos linfoides y otros tejidos, como parte de los mecanismos de vigilancia del sistema inmunitario⁴¹⁸. En la infección por el VIH-1 existe una migración incrementada de monocitos activados desde la SP a otros tejidos⁵¹², lo que explicaría la ausencia de una correlación directa entre el número de moléculas CD38 expresadas en los monocitos de SP y los niveles de carga viral en plasma, en los pacientes VIH-1+ que no han recibido TAR.

Respecto al efecto del TAR sobre la expresión de CD38, de acuerdo con trabajos previos de otros autores^{115,513}, en el presente estudio comprobamos que el inicio del tratamiento provocaba una rápida disminución de la replicación viral hasta niveles indetectables en todos los pacientes VIH-1+. Sin embargo, la expresión de CD38 (en términos de cantidad de moléculas en la superficie celular) en los linfocitos T CD8+ y monocitos de SP permanecía significativamente incrementada en los dos grupos de individuos VIH-1+ analizados, incluso después de un año de TAR. De manera similar a lo que hemos observado, diferentes autores han demostrado que la expresión de CD38 permanece incrementada de forma anormal en pacientes VIH-1+ con carga viral indetectable, a pesar de la administración de TAR^{276,278,514}. Es más, se ha detectado la existencia de un bajo nivel de replicación viral en monocitos recientemente infectados en aquellos pacientes VIH-1+ en los que el TAR había logrado suprimir la carga viral en plasma durante períodos de tiempo relativamente largos^{10,422,515}. En conjunto, todos estos hallazgos sugieren la posible existencia de replicación viral residual en reservorios del organismo –como los órganos linfoides secundarios– en pacientes VIH-1+ sometidos a TAR^{274,275,278}; esto podría inducir un aumento de la respuesta citotóxica específica frente al VIH-1, debido a la persistencia del virus en el organismo y la recuperación parcial de los sistemas de vigilancia del sistema inmunitario. De acuerdo con esta hipótesis, diversos autores han encontrado una asociación significativa entre el número de CTL específicos frente al VIH-1 y la cantidad media de moléculas CD38 expresadas por los linfocitos T CD8+⁵¹⁶, y entre la hiperactivación de células T CD8+ y una recuperación incompleta del número de células T CD4+ en SP²⁷⁷. Nuestros resultados demuestran además, la existencia de una recuperación incompleta de los niveles de linfocitos T CD4+ y CD8+ en pacientes infectados por el VIH-1 con carga viral plasmática indetectable, incluso después de un año de TAR. Asimismo, de acuerdo con esta posibilidad, en el presente trabajo hemos observado que las células dendríticas CD16+ y los monocitos de SP de pacientes VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μ l en SP mantienen una producción espontánea de citocinas inflamatorias elevada, incluso al año de iniciarse el TAR.

Al analizar detalladamente los cambios inducidos por el TAR sobre la expresión de CD38 en linfocitos T CD8+, linfocitos T CD4+ y monocitos de SP, observamos un patrón

diferente en función del tipo de población celular y del grupo de pacientes analizado. Así, en línea con otras observaciones previas^{269-271,284}, nuestros resultados demuestran que la administración de TAR induce un descenso significativo del número de moléculas CD38 en la membrana de los linfocitos T CD8+ de SP de pacientes VIH-1+, independientemente del número de células T CD4+ presentes en SP; no obstante, este marcador permanecía elevado, incluso después de un año de tratamiento. Por el contrario, en el caso de los linfocitos T CD4+ de SP, el inicio del TAR se asoció con un patrón de cambios en la expresión de CD38 muy diferente para cada grupo de pacientes VIH-1+: mientras que en los pacientes VIH-1+ más inmunocomprometidos (<200 células CD4+/ μ l en SP) existía un incremento significativo del número de moléculas CD38 entre la segunda y cuarta semanas desde el inicio del tratamiento, en los individuos VIH-1+ con >200 células CD4+/ μ l en SP, el tratamiento provocó una disminución significativa y rápida de la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4+. Estudios previos de otros autores han demostrado que el aumento del número absoluto de linfocitos T CD4+ que se observa en SP tras el inicio del TAR se debe a la redistribución de las células T CD4+ que habían migrado a los órganos linfoides como consecuencia de la replicación viral¹²⁸⁻¹³¹. De acuerdo con estas observaciones, nuestros resultados demuestran la existencia de una fuerte correlación directa entre el incremento del número absoluto de moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T CD4+ de SP y el aumento del número absoluto de células T CD4+ en SP que se observa hacia la segunda semana de tratamiento para los pacientes VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μ l en SP. Por el contrario, tras iniciar el tratamiento, no detectamos correlación entre el incremento de la expresión de CD38 y el del número de linfocitos T CD4+ de SP, en pacientes VIH-1+ con >200 células T CD4+/ μ l en SP; estos hallazgos podrían reflejar que, en este último grupo de individuos, la depleción de células T CD4+ de la circulación sanguínea es más moderada, por lo que a su vez, la fase de redistribución linfocitaria que sigue al inicio del tratamiento sería menos acusada, no reflejándose por este motivo en un aumento generalizado de la expresión de CD38 al poco de tiempo de iniciarse el TAR. Merece destacar que el análisis jerárquico de *clusters* llevado a cabo en este estudio, demostró que aquellos pacientes VIH-1+ que presentaban un aumento más pronunciado de la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4+ de SP al poco tiempo del

comienzo del TAR (2 semanas), tendían a experimentar una desaparición más rápida de la carga viral en plasma, indicativo por tanto de buena respuesta al tratamiento. En este sentido, el incremento de la expresión de CD38 en los linfocitos T CD4+ de SP al poco tiempo de comenzar el tratamiento podría constituir un marcador de buen pronóstico a la hora de monitorizar la respuesta al TAR en sujetos VIH-1+, en el caso de que se confirmen estos hallazgos en series más amplias.

Con respecto al efecto del TAR sobre la expresión de CD38 en monocitos de SP de pacientes VIH-1+, observamos que tras el inicio del tratamiento, se producía un aumento rápido y significativo del número de moléculas CD38, asociado a un incremento del número absoluto de monocitos en SP, especialmente acusado en el caso de los individuos VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μ l en SP. Como consecuencia de la inhibición de la replicación del VIH-1 tras el inicio del TAR, cabe esperar una disminución del grado de migración de los monocitos de SP hacia órganos linfoides y otros tejidos, que podría contribuir a este incremento rápido del número de monocitos de SP. A su vez, el incremento de la expresión de CD38 en los monocitos de SP que observamos hacia la segunda semana de tratamiento, podría producirse como consecuencia de la existencia de replicación viral residual. Sin embargo, al contrario de lo que sucedía en el caso de los linfocitos T CD4+ de SP, nuestros resultados demuestran la existencia de una correlación inversa entre el incremento del número absoluto de moléculas CD38 expresadas en los monocitos y el aumento del número absoluto de monocitos que se observa en SP hacia la segunda semana de tratamiento entre los pacientes VIH-1+ con <200 células T CD4+/ μ l en SP. Esta aparente contradicción podría reflejar que tras el comienzo del TAR se produciría no solamente una disminución de la migración de los monocitos desde la circulación sanguínea a otros tejidos, sino también un incremento de la generación de monocitos en la médula ósea, que contribuiría a restaurar los niveles normales de expresión de CD38 como consecuencia del control progresivo de la infección y de la recuperación parcial de la hematopoyesis. En este sentido, y de forma similar a lo descrito para los linfocitos T CD4+ de SP, aquellos pacientes VIH-1+ que tenían un aumento más pronunciado de la expresión de CD38 en los monocitos de SP al poco tiempo del comienzo del TAR (2 semanas), tendían a presentar una cinética más rápida de desaparición de la carga viral en plasma. Hasta donde

alcanza nuestro conocimiento, éste es el primer estudio en el que se demuestra que el incremento del número de moléculas CD38 expresadas en los linfocitos T CD4+ y los monocitos de SP al poco tiempo del comienzo del TAR, es capaz de predecir la cinética de desaparición de la carga viral en el plasma de individuos VIH-1+, y que, si finalmente se confirman estos hallazgos en otros estudios, podría ser utilizado como indicador de la respuesta al tratamiento en la monitorización de pacientes infectados por el VIH-1.

V. Conclusiones

En relación con el primer objetivo, centrado en el análisis de la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de diferentes subpoblaciones de células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+:

1. Las células dendríticas mieloides y plasmocitoides de pacientes VIH-1⁺P muestran alteraciones significativas, tanto en su distribución en SP, como en la expresión de los correceptores del virus CXCR4 y CCR5, produciendo espontáneamente, junto a los monocitos, citocinas inflamatorias, lo que apoya la existencia de una activación del sistema inmune *in vivo* en estos pacientes.
2. El patrón de alteraciones numéricas, fenotípicas y funcionales detectadas en las células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1⁺P es diferente a lo observado en individuos VIH-1⁺NPLP y VHC⁺/VIH-1⁻, lo que sugiere la importancia de estas subpoblaciones celulares en la patogenia de la infección por el VIH-1.

En relación con el efecto del TAR sobre la distribución numérica y las características fenotípicas y funcionales de las células dendríticas y monocitos de SP de pacientes VIH-1+, y la identificación de posibles factores implicados en la recuperación funcional de estas poblaciones celulares.

3. La administración del TAR tiene importantes efectos beneficiosos sobre el sistema inmune de los pacientes VIH-1+. No obstante, las alteraciones numéricas observadas en los compartimientos de linfocitos T, células dendríticas y monocitos de SP de sujetos VIH-1+ persisten incluso después de un año de iniciado el TAR, asociándose a anomalías fenotípicas y funcionales de diferentes subpoblaciones de células presentadoras de antígeno, especialmente en aquellos pacientes que se encuentran en fases más avanzadas de la infección.

4. Previamente a la administración del TAR, la capacidad de producción de citocinas inflamatorias en respuesta a un estímulo exógeno por parte de los monocitos y las células dendríticas de origen mieloide de SP de individuos infectados por el VIH-1 se encuentra significativamente alterada, dependiendo las anomalías detectadas de las subpoblaciones celulares en cuestión.
5. Tras la administración del TAR, la recuperación parcial de la capacidad funcional de las células inflamatorias circulantes, se asocia con el grado de reconstitución de los niveles de linfocitos T CD4+ de SP en los pacientes más inmunodeprimidos, y con la presencia de co-infección por el VHC, en el caso de los individuos menos inmunodeprimidos.

En relación con el tercer objetivo, enfocado a analizar el efecto del TAR sobre la expresión de la molécula CD38 en los linfocitos T y los monocitos de SP de pacientes VIH-1+, y la posible utilidad de este marcador a la hora de monitorizar la respuesta al tratamiento:

6. La evaluación cuantitativa de la expresión del antígeno CD38 en los linfocitos T y los monocitos de SP de pacientes VIH-1+ constituye un indicador precoz de la respuesta al TAR, asociándose el incremento en la expresión de este marcador a las pocas semanas de iniciarse el tratamiento, con un aclaramiento más rápido de la carga viral en plasma.

VI. Bibliografía

1. Barre-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
2. Gallo, R.C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-867 (1983).
3. Jaffar, S., Grant, A.D., Whitworth, J., Smith, P.G. & Whittle, H. The natural history of HIV-1 and HIV-2 infections in adults in Africa: a literature review. *Bull. World Health Organ* **82**, 462-469 (2004).
4. ONUSIDA/OMS. AIDS epidemic update 2007. UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV-AIDS). Disponible en: <http://www.unaids.org/en/KnowledgeCentre/HIVData/EpiUpdate/EpiUpdateArchive/2007/default.asp>. 2007.
5. Palella, F.J., Jr. *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **338**, 853-860 (1998).
6. Hammer, S.M. *et al.* A controlled trial of two nucleoside analogues plus didanosine in persons with human immunodeficiency virus infection and CD4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. AIDS Clinical Trials Group 320 Study Team. *N Engl J Med* **337**, 725-733 (1997).
7. Mezzaroma, I. *et al.* Clinical and immunologic response without decrease in virus load in patients with AIDS after 24 months of highly active antiretroviral therapy. *Clin. Infect Dis* **29**, 1423-1430 (1999).
8. Bernstein, W.B., Little, R.F., Wilson, W.H. & Yarchoan, R. Acquired immunodeficiency syndrome-related malignancies in the era of highly active antiretroviral therapy. *Int J Hematol.* **84**, 3-11 (2006).
9. Furtado, M.R. *et al.* Persistence of HIV-1 transcription in peripheral-blood mononuclear cells in patients receiving potent antiretroviral therapy. *N Engl J Med* **340**, 1614-1622 (1999).
10. Zhu, T. *et al.* Evidence for human immunodeficiency virus type 1 replication in vivo in CD14(+) monocytes and its potential role as a source of virus in patients on highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* **76**, 707-716 (2002).
11. Valentin, A. *et al.* Persistent HIV-1 infection of natural killer cells in patients receiving highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 7015-7020 (2002).
12. Calza, L., Manfredi, R. & Chiodo, F. Dyslipidaemia associated with antiretroviral therapy in HIV-infected patients. *J Antimicrob. Chemother.* **53**, 10-14 (2004).
13. Carr, A. Toxicity of antiretroviral therapy and implications for drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 624-634 (2003).
14. Bisson, G. *et al.* Monitoring of long-term toxicities of HIV treatments: an international perspective. *AIDS* **17**, 2407-2417 (2003).
15. Kolber, M.A., Campo, R.E. & Dickinson, G.M. Development of anti-retroviral resistance of HIV-1 infected individuals on therapy: is it inevitable? *IUBMB Life* **56**, 301-307 (2004).
16. Perno, C.F. *et al.* HIV fitness and resistance as covariates associated with the appearance of mutations under antiretroviral treatment. *Scand. J Infect Dis Suppl* **35 Suppl 106**, 37-40 (2003).
17. Rubbert A, Behrens G & Ostrowski M. Pathogenesis of HIV-1 infection. In: HIV Medicine 2006. Flying Publisher, (2006).

18. Martin, J.C. & Bandres, J.C. Cells of the monocyte-macrophage lineage and pathogenesis of HIV-1 infection. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.* **22**, 413-429 (1999).
19. Nájera R. Los retrovirus humanos. Manual del SIDA. 3ª Edición. Idepsa Madrid, (1999).
20. Alcamí J. Virología del VIH-1. Manual de SIDA. 3ª Edición. Idepsa, Madrid, (1999).
21. Kamps BS & Hoffmann C. HIV Medicine 2006. Flying Publisher, (2006).
22. Servet, C., Zitvogel, L. & Hosmalin, A. Dendritic cells in innate immune responses against HIV. *Curr. Mol. Med* **2**, 739-756 (2002).
23. Geijtenbeek, T.B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587-597 (2000).
24. van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T.B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 697-709 (2003).
25. Teleshova, N., Frank, I. & Pope, M. Immunodeficiency virus exploitation of dendritic cells in the early steps of infection. *J Leukoc. Biol.* **74**, 683-690 (2003).
26. McDonald, D. *et al.* Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* **300**, 1295-1297 (2003).
27. Izmailova, E. *et al.* HIV-1 Tat reprograms immature dendritic cells to express chemoattractants for activated T cells and macrophages. *Nat. Med* **9**, 191-197 (2003).
28. Maddon, P.J. *et al.* The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333-348 (1986).
29. Dalgleish, A.G. *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-767 (1984).
30. Deng, H. *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666 (1996).
31. Doranz, B.J. *et al.* A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**, 1149-1158 (1996).
32. Dragic, T. *et al.* HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**, 667-673 (1996).
33. Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E. & Berger, E.A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877 (1996).
34. Moore, J.P., Kitchen, S.G., Pugach, P. & Zack, J.A. The CCR5 and CXCR4 coreceptors—central to understanding the transmission and pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**, 111-126 (2004).
35. Weber, J., Piontkivska, H. & Quinones-Mateu, M.E. HIV type 1 tropism and inhibitors of viral entry: clinical implications. *AIDS Rev.* **8**, 60-77 (2006).
36. Dragic, T. An overview of the determinants of CCR5 and CXCR4 co-receptor function. *J Gen. Virol.* **82**, 1807-1814 (2001).
37. Wyatt, R. & Sodroski, J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-1888 (1998).

38. Rubbert,A. *et al.* Dendritic cells express multiple chemokine receptors used as coreceptors for HIV entry. *J Immunol.* **160**, 3933-3941 (1998).
39. Granelli-Piperno,A. *et al.* Efficient interaction of HIV-1 with purified dendritic cells via multiple chemokine coreceptors. *J Exp Med* **184**, 2433-2438 (1996).
40. O'Doherty,U. *et al.* Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. *J Exp. Med* **178**, 1067-1076 (1993).
41. Sallusto,F. *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J Immunol.* **28**, 2760-2769 (1998).
42. Granelli-Piperno,A., Delgado,E., Finkel,V., Paxton,W. & Steinman,R.M. Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells. *J Virol.* **72**, 2733-2737 (1998).
43. Lin,C.L. *et al.* Macrophage-tropic HIV induces and exploits dendritic cell chemotaxis. *J Exp Med* **192**, 587-594 (2000).
44. Sewell,A.K. & Price,D.A. Dendritic cells and transmission of HIV-1. *Trends Immunol.* **22**, 173-175 (2001).
45. Knight,S.C. Dendritic cells and HIV infection; immunity with viral transmission versus compromised cellular immunity? *Immunobiology* **204**, 614-621 (2001).
46. MacDougall,T.H., Shattock,R.J., Madsen,C., Chain,B.M. & Katz,D.R. Regulation of primary HIV-1 isolate replication in dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* **127**, 66-71 (2002).
47. Donaghy,H., Gazzard,B., Gotch,F. & Patterson,S. Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* **101**, 4505-4511 (2003).
48. Huang,Y. *et al.* The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med* **2**, 1240-1243 (1996).
49. Samson,M. *et al.* Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* **382**, 722-725 (1996).
50. Liu,R. *et al.* Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* **86**, 367-377 (1996).
51. Fauci,A.S. Resistance to HIV-1 infection: it's in the genes. *Nat. Med* **2**, 966-967 (1996).
52. Dean,M. *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* **273**, 1856-1862 (1996).
53. Smith,M.W. *et al.* Contrasting genetic influence of CCR2 and CCR5 variants on HIV-1 infection and disease progression. Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC), ALIVE Study. *Science* **277**, 959-965 (1997).
54. Paroli,M. *et al.* The immunology of HIV-infected long-term non-progressors--a current view. *Immunol. Lett.* **79**, 127-129 (2001).

55. Liu, H. *et al.* Polymorphism in RANTES chemokine promoter affects HIV-1 disease progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 4581-4585 (1999).
56. Winkler, C. *et al.* Genetic restriction of AIDS pathogenesis by an SDF-1 chemokine gene variant. ALIVE Study, Hemophilia Growth and Development Study (HGDS), Multicenter AIDS Cohort Study (MACS), Multicenter Hemophilia Cohort Study (MHCS), San Francisco City Cohort (SFCC). *Science* **279**, 389-393 (1998).
57. Verani, A. & Lusso, P. Chemokines as natural HIV antagonists. *Curr. Mol. Med* **2**, 691-702 (2002).
58. Alcami, J. *et al.* Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J* **14**, 1552-1560 (1995).
59. Bermejo, M., Sanchez-Palomino, S., Usan, L. & Alcami, J. Dynamics of HIV replication in lymphocytes and the efficacy of protease inhibitors. *J Med Virol.* **73**, 502-507 (2004).
60. Finzi, D. *et al.* Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**, 1295-1300 (1997).
61. Siliciano, J.D. *et al.* Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat. Med* **9**, 727-728 (2003).
62. Pomerantz, R.J. Reservoirs of human immunodeficiency virus type 1: the main obstacles to viral eradication. *Clin. Infect Dis* **34**, 91-97 (2002).
63. Emerman, M. & Malim, M.H. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. *Science* **280**, 1880-1884 (1998).
64. Kalland, K.H., Szilvay, A.M., Langhoff, E. & Haukenes, G. Subcellular distribution of human immunodeficiency virus type 1 Rev and colocalization of Rev with RNA splicing factors in a speckled pattern in the nucleoplasm. *J Virol.* **68**, 1475-1485 (1994).
65. von Schwedler, U.K. *et al.* The protein network of HIV budding. *Cell* **114**, 701-713 (2003).
66. Cullen, B.R. HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* **93**, 685-692 (1998).
67. Zhang, F., Perez-Caballero, D., Hatzioannou, T. & Bieniasz, P.D. No effect of endogenous TRIM5alpha on HIV-1 production. *Nat. Med.* **14**, 235-236 (2008).
68. Hatzioannou, T., Perez-Caballero, D., Yang, A., Cowan, S. & Bieniasz, P.D. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 10774-10779 (2004).
69. Marin, M., Rose, K.M., Kozak, S.L. & Kabat, D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* **9**, 1398-1403 (2003).
70. Neil, S.J., Zang, T. & Bieniasz, P.D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425-430 (2008).
71. Brass, A.L. *et al.* Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* **319**, 921-926 (2008).
72. Stevenson, M. Basic science highlights. *Top. HIV Med.* **15**, 21-25 (2007).
73. Reyes-Teran, G. & Alcocer, V.J. [Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection]. *Rev. Invest Clin* **46**, 113-147 (1994).

74. Via, C.S., Morse, H.C., III & Shearer, G.M. Altered immunoregulation and autoimmune aspects of HIV infection: relevant murine models. *Immunol. Today* **11**, 250-255 (1990).
75. Shearer, G.M. HIV-induced immunopathogenesis. *Immunity* **9**, 587-593 (1998).
76. Douek, D.C., Picker, L.J. & Koup, R.A. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 265-304 (2003).
77. McCune, J.M. The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**, 974-979 (2001).
78. Smith, R.D. The pathobiology of HIV infection. A review. *Arch. Pathol. Lab Med* **114**, 235-239 (1990).
79. Hsia, K. & Spector, S.A. Human immunodeficiency virus DNA is present in a high percentage of CD4+ lymphocytes of seropositive individuals. *J Infect Dis* **164**, 470-475 (1991).
80. Schattner, E. & Laurence, J. HIV-induced T-lymphocyte depletion. *Clin Lab Med* **14**, 221-238 (1994).
81. Andrews, C.A. & Koup, R.A. The immunopathology of HIV infection. *J Antimicrob. Chemother.* **37 Suppl B**, 13-25 (1996).
82. Douek, D.C. *et al.* HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* **417**, 95-98 (2002).
83. Pantaleo, G., Graziosi, C. & Fauci, A.S. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* **328**, 327-335 (1993).
84. Yue, F.Y. *et al.* Preferential apoptosis of HIV-1-specific CD4+ T cells. *J Immunol.* **174**, 2196-2204 (2005).
85. Lawn, S.D., Butera, S.T. & Folks, T.M. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 753-77, table (2001).
86. Lederman MM, Rodriguez B & Sieg S. HIV InSite Knowledge Base. Peiperl L, Coffey S, Bacon O & Volberding P (eds.)2004).
87. Veazey, R.S. *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* **280**, 427-431 (1998).
88. Brenchley, J.M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp. Med* **200**, 749-759 (2004).
89. Mehandru, S. *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp. Med* **200**, 761-770 (2004).
90. Li, Q. *et al.* Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* **434**, 1148-1152 (2005).
91. Mattapallil, J.J. *et al.* Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**, 1093-1097 (2005).
92. Brenchley, J.M., Price, D.A. & Douek, D.C. HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat. Immunol.* **7**, 235-239 (2006).
93. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W.E. & Picker, L.J. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med* **12**, 289-295 (2006).
94. Derdeyn, C.A. & Silvestri, G. Viral and host factors in the

- pathogenesis of HIV infection. *Curr. Opin. Immunol.* **17**, 366-373 (2005).
95. Doms, R.W. Chemokine receptors and HIV entry. *AIDS* **15 Suppl 1**, S34-S35 (2001).
96. Picker, L.J. *et al.* Insufficient production and tissue delivery of CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp. Med* **200**, 1299-1314 (2004).
97. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 745-763 (2004).
98. Picker, L.J. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 399-405 (2006).
99. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A.E., Victorino, R.M. & Paul, W.E. CD4+ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med* **8**, 319-323 (2002).
100. Silvestri, G. & Feinberg, M.B. Turnover of lymphocytes and conceptual paradigms in HIV infection. *J Clin. Invest* **112**, 821-824 (2003).
101. Pantaleo, G. *et al.* Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 9838-9842 (1991).
102. Fauci, A.S. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science* **262**, 1011-1018 (1993).
103. Pantaleo, G. *et al.* HIV infection is active and progressive in lymphoid tissue during the clinically latent stage of disease. *Nature* **362**, 355-358 (1993).
104. Haase, A.T. *et al.* Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science* **274**, 985-989 (1996).
105. Arrighi, J.F. *et al.* DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells. *J Exp. Med* **200**, 1279-1288 (2004).
106. Geijtenbeek, T.B. & van Kooyk, Y. DC-SIGN: a novel HIV receptor on DCs that mediates HIV-1 transmission. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **276**, 31-54 (2003).
107. Simon, V. & Ho, D.D. HIV-1 dynamics in vivo: implications for therapy. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 181-190 (2003).
108. Brenchley, J.M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med* **12**, 1365-1371 (2006).
109. Brenchley, J.M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med* **12**, 1365-1371 (2006).
110. Meier, A. *et al.* MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol.* **81**, 8180-8191 (2007).
111. Funderburg, N. *et al.* Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS ONE.* **3**, e1915 (2008).
112. Grivel, J.C. & Margolis, L.B. CCR5- and CXCR4-tropic HIV-1 are equally cytopathic for their T-cell targets in human lymphoid tissue. *Nat. Med* **5**, 344-346 (1999).
113. Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A. & Mackay, C.R. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and

- regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 1925-1930 (1997).
114. Glushakova, S. *et al.* Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nat. Med* **4**, 346-349 (1998).
115. Ho, D.D. *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126 (1995).
116. Alimonti, J.B., Ball, T.B. & Fowke, K.R. Mechanisms of CD4+ T lymphocyte cell death in human immunodeficiency virus infection and AIDS. *J Gen. Virol.* **84**, 1649-1661 (2003).
117. Paranjape, R.S. Immunopathogenesis of HIV infection. *Indian J Med Res.* **121**, 240-255 (2005).
118. Yuan, J. & Horvitz, H.R. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis. *Cell* **116**, S53-6, 1 (2004).
119. Finkel, T.H. *et al.* Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. *Nat. Med* **1**, 129-134 (1995).
120. Gougeon, M.L. *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.* **156**, 3509-3520 (1996).
121. Fowke, K.R. *et al.* Immunologic and virologic evaluation after influenza vaccination of HIV-1-infected patients. *AIDS* **11**, 1013-1021 (1997).
122. Cloyd, M.W., Chen, J.J., Adegboyega, P. & Wang, L. How does HIV cause depletion of CD4 lymphocytes? A mechanism involving virus signaling through its cellular receptors. *Curr. Mol. Med* **1**, 545-550 (2001).
123. Ferri, K.F. *et al.* Apoptosis control in syncytia induced by the HIV type 1-envelope glycoprotein complex: role of mitochondria and caspases. *J Exp. Med* **192**, 1081-1092 (2000).
124. Gil J, Bermejo M & Alcamí J. HIV and apoptosis: a complex interaction between cell death and virus survival. *Prog Mol Subcell Biol.* **36**, 117-149 (2004).
125. Jacotot, E. *et al.* The HIV-1 viral protein R induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *J Exp. Med* **191**, 33-46 (2000).
126. Ameisen, J.C. Apoptosis subversion: HIV-Nef provides both armor and sword. *Nat. Med* **7**, 1181-1182 (2001).
127. McMichael, A.J. & Rowland-Jones, S.L. Cellular immune responses to HIV. *Nature* **410**, 980-987 (2001).
128. Hengel, R.L., Jones, B.M., Kennedy, M.S., Hubbard, M.R. & McDougal, J.S. CD4+ T cells programmed to traffic to lymph nodes account for increases in numbers of cd4+ T cells up to 1 year after the initiation of highly active antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **184**, 93-97 (2001).
129. Bucy, R.P. *et al.* Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* **103**, 1391-1398 (1999).
130. Autran, B. *et al.* Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**, 112-116 (1997).

131. Li, T.S. *et al.* Long-lasting recovery in CD4 T-cell function and viral-load reduction after highly active antiretroviral therapy in advanced HIV-1 disease. *Lancet* **351**, 1682-1686 (1998).
132. Fry, T.J. & Mackall, C.L. What limits immune reconstitution in HIV infection? Divergent tools converge on thymic function. *AIDS* **15**, 1881-1882 (2001).
133. Hazenberg, M.D., Hamann, D., Schuitemaker, H. & Miedema, F. T cell depletion in HIV-1 infection: how CD4+ T cells go out of stock. *Nat. Immunol.* **1**, 285-289 (2000).
134. Alcamí J. Avances en la inmunopatología de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **22**, 486-496 (2004).
135. Gauduin, M.C., Weir, R., Fung, M.S. & Koup, R.A. Involvement of the complement system in antibody-mediated post-exposure protection against human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 205-211 (1998).
136. Chen, K. *et al.* Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells. *J Virol.* **80**, 7645-7657 (2006).
137. Chang, T.L. & Klotman, M.E. Defensins: natural anti-HIV peptides. *AIDS Rev.* **6**, 161-168 (2004).
138. Center, D.M., Kornfeld, H., Ryan, T.C. & Cruikshank, W.W. Interleukin 16: implications for CD4 functions and HIV-1 progression. *Immunol. Today* **21**, 273-280 (2000).
139. Walker, C.M., Moody, D.J., Stites, D.P. & Levy, J.A. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* **234**, 1563-1566 (1986).
140. Alkhatib, G., Locati, M., Kennedy, P.E., Murphy, P.M. & Berger, E.A. HIV-1 coreceptor activity of CCR5 and its inhibition by chemokines: independence from G protein signaling and importance of coreceptor downmodulation. *Virology* **234**, 340-348 (1997).
141. Cocchi, F. *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-1815 (1995).
142. Signoret, N. *et al.* Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol.* **139**, 651-664 (1997).
143. Kedzierska, K., Crowe, S.M., Turville, S. & Cunningham, A.L. The influence of cytokines, chemokines and their receptors on HIV-1 replication in monocytes and macrophages. *Rev. Med Virol.* **13**, 39-56 (2003).
144. Valenzuela-Fernandez, A. *et al.* Optimal inhibition of X4 HIV isolates by the CXC chemokine stromal cell-derived factor 1 alpha requires interaction with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol. Chem.* **276**, 26550-26558 (2001).
145. Chang, T.L., Francois, F., Mosoian, A. & Klotman, M.E. CAF-mediated human immunodeficiency virus (HIV) type 1 transcriptional inhibition is distinct from alpha-defensin-1 HIV inhibition. *J Virol.* **77**, 6777-6784 (2003).
146. Mackewicz, C.E., Blackburn, D.J. & Levy, J.A. CD8+ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 2308-2312 (1995).
147. Agace, W.W. *et al.* Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and

- propagation. *Curr. Biol.* **10**, 325-328 (2000).
148. Barcellini, W. *et al.* Cytokines and soluble receptor changes in the transition from primary to early chronic HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 325-331 (1996).
149. Graziosi, C. *et al.* Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 4386-4391 (1996).
150. Lore, K. *et al.* HIV-1 exposed dendritic cells show increased pro-inflammatory cytokine production but reduced IL-1ra following lipopolysaccharide stimulation. *AIDS* **13**, 2013-2021 (1999).
151. Chun, T.W., Engel, D., Mizell, S.B., Ehler, L.A. & Fauci, A.S. Induction of HIV-1 replication in latently infected CD4+ T cells using a combination of cytokines. *J Exp. Med* **188**, 83-91 (1998).
152. Engering, A., van Vliet, S.J., Geijtenbeek, T.B. & van Kooyk, Y. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* **100**, 1780-1786 (2002).
153. Loetscher, P. *et al.* CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* **391**, 344-345 (1998).
154. Ostrowski, M.A. *et al.* Expression of chemokine receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-infected and uninfected individuals. *J Immunol.* **161**, 3195-3201 (1998).
155. Lodoen, M.B. & Lanier, L.L. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 391-398 (2006).
156. Smyth, M.J. *et al.* Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* **42**, 501-510 (2005).
157. Weinhold, K.J. Anti-HIV-1 ADCC: clinical and therapeutic implications. *Biotechnol. Ther.* **2**, 147-157 (1991).
158. Scott-Algara, D. *et al.* Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *J Immunol.* **171**, 5663-5667 (2003).
159. Kottlilil, S. *et al.* Innate immunity in human immunodeficiency virus infection: effect of viremia on natural killer cell function. *J Infect Dis* **187**, 1038-1045 (2003).
160. Fogli, M. *et al.* Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur. J Immunol.* **34**, 2313-2321 (2004).
161. Shortman, K. & Heath, W.R. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2**, 988-989 (2001).
162. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* **5**, 1219-1226 (2004).
163. Cella, M. *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med* **5**, 919-923 (1999).
164. Gendelman, H.E. *et al.* Regulation of HIV replication in infected monocytes by IFN-alpha. Mechanisms for viral restriction. *J Immunol.* **145**, 2669-2676 (1990).
165. Lapenta, C. *et al.* Type I interferon is a powerful inhibitor of in vivo HIV-1 infection and preserves human CD4(+) T cells from virus-induced depletion in SCID mice transplanted with human cells. *Virology* **263**, 78-88 (1999).
166. Tough, D.F. Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell

- stimulation. *Leuk. Lymphoma* **45**, 257-264 (2004).
167. Steinman, R.M. *et al.* The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr. Top. Microbiol Immunol.* **276**, 1-30 (2003).
168. Soumelis, V. *et al.* Depletion of circulating natural type 1 interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* **98**, 906-912 (2001).
169. Donaghy, H. *et al.* Loss of blood CD11c(+) myeloid and CD11c(-) plasmacytoid dendritic cells in patients with HIV-1 infection correlates with HIV-1 RNA virus load. *Blood* **98**, 2574-2576 (2001).
170. Chehimi, J. *et al.* Persistent decreases in blood plasmacytoid dendritic cell number and function despite effective highly active antiretroviral therapy and increased blood myeloid dendritic cells in HIV-infected individuals. *J Immunol.* **168**, 4796-4801 (2002).
171. Finke, J.S., Shodell, M., Shah, K., Siegal, F.P. & Steinman, R.M. Dendritic cell numbers in the blood of HIV-1 infected patients before and after changes in antiretroviral therapy. *J Clin. Immunol.* **24**, 647-652 (2004).
172. Feldman, S. *et al.* Decreased interferon-alpha production in HIV-infected patients correlates with numerical and functional deficiencies in circulating type 2 dendritic cell precursors. *Clin. Immunol.* **101**, 201-210 (2001).
173. Patterson, S., Rae, A., Hockey, N., Gilmour, J. & Gotch, F. Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type 1 infection and release infectious virus. *J Virol.* **75**, 6710-6713 (2001).
174. Yonezawa, A. *et al.* Natural alpha interferon-producing cells respond to human immunodeficiency virus type 1 with alpha interferon production and maturation into dendritic cells. *J Virol.* **77**, 3777-3784 (2003).
175. Smed-Sorensen, A. *et al.* Differential susceptibility to human immunodeficiency virus type 1 infection of myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Virol.* **79**, 8861-8869 (2005).
176. Fong, L., Mengozzi, M., Abbey, N.W., Herndier, B.G. & Engleman, E.G. Productive infection of plasmacytoid dendritic cells with human immunodeficiency virus type 1 is triggered by CD40 ligation. *J Virol.* **76**, 11033-11041 (2002).
177. Pacanowski, J. *et al.* Early plasmacytoid dendritic cell changes predict plasma HIV load rebound during primary infection. *J Infect Dis* **190**, 1889-1892 (2004).
178. Thiebaut, R. *et al.* Immunological markers after long-term treatment interruption in chronically HIV-1 infected patients with CD4 cell count above 400 x 10(6) cells/l. *AIDS* **19**, 53-61 (2005).
179. Zhang, Z. & Wang, F.S. Plasmacytoid dendritic cells act as the most competent cell type in linking antiviral innate and adaptive immune responses. *Cell Mol. Immunol.* **2**, 411-417 (2005).
180. Zolla-Pazner, S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 199-210 (2004).
181. Poignard, P. *et al.* Neutralizing antibodies have limited effects on the control of established HIV-1 infection in vivo. *Immunity* **10**, 431-438 (1999).
182. Check, E. AIDS vaccines: back to 'plan A'. *Nature* **423**, 912-914 (2003).
183. Johnson, W.E., Lifson, J.D., Lang, S.M., Johnson, R.P. &

- Desrosiers, R.C. Importance of B-cell responses for immunological control of variant strains of simian immunodeficiency virus. *J Virol.* **77**, 375-381 (2003).
184. Nabel, G.J. & Sullivan, N.J. Antibodies and resistance to natural HIV infection. *N Engl J Med* **343**, 1263-1265 (2000).
185. Burton, D.R. *et al.* HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat. Immunol.* **5**, 233-236 (2004).
186. Mascola, J.R. *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. Med* **6**, 207-210 (2000).
187. Kwong, P.D. *et al.* HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-682 (2002).
188. Wei, X. *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-312 (2003).
189. Robinson, H.L. *et al.* Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med* **5**, 526-534 (1999).
190. Connor, R.I. *et al.* Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *J Virol.* **72**, 1552-1576 (1998).
191. Graham, B.S. *et al.* Analysis of intercurrent human immunodeficiency virus type 1 infections in phase I and II trials of candidate AIDS vaccines. AIDS Vaccine Evaluation Group, and the Correlates of HIV Immune Protection Group. *J Infect Dis* **177**, 310-319 (1998).
192. Murali-Krishna, K. *et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**, 177-187 (1998).
193. Butz, E.A. & Bevan, M.J. Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection. *Immunity* **8**, 167-175 (1998).
194. Letvin, N.L. & Walker, B.D. Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections. *Nat. Med* **9**, 861-866 (2003).
195. Tsomides, T.J., Walker, B.D. & Eisen, H.N. An optimal viral peptide recognized by CD8+ T cells binds very tightly to the restricting class I major histocompatibility complex protein on intact cells but not to the purified class I protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 11276-11280 (1991).
196. Brander, C. & Walker, B.D. T lymphocyte responses in HIV-1 infection: implications for vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 451-459 (1999).
197. Rosenberg, E.S. *et al.* Immune control of HIV-1 after early treatment of acute infection. *Nature* **407**, 523-526 (2000).
198. Schmitz, J.E. *et al.* Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**, 857-860 (1999).
199. Jin, X. *et al.* Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp. Med* **189**, 991-998 (1999).
200. Metzner, K.J. *et al.* Effects of in vivo CD8(+) T cell depletion on virus replication in rhesus macaques

- immunized with a live, attenuated simian immunodeficiency virus vaccine. *J Exp. Med* **191**, 1921-1931 (2000).
201. Contini, P. *et al.* Apoptosis of antigen-specific T lymphocytes upon the engagement of CD8 by soluble HLA class I molecules is Fas ligand/Fas mediated: evidence for the involvement of p56lck, calcium calmodulin kinase II, and Calcium-independent protein kinase C signaling pathways and for NF-kappaB and NF-AT nuclear translocation. *J Immunol.* **175**, 7244-7254 (2005).
202. Yang, O.O. *et al.* Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8+ cells: evidence for HLA class I-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J Virol.* **71**, 3120-3128 (1997).
203. Wagner, L. *et al.* Beta-chemokines are released from HIV-1-specific cytolytic T-cell granules complexed to proteoglycans. *Nature* **391**, 908-911 (1998).
204. Zhang, L. *et al.* Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science* **298**, 995-1000 (2002).
205. Benito, J.M., Lopez, M. & Soriano, V. The role of CD8+ T-cell response in HIV infection. *AIDS Rev.* **6**, 79-88 (2004).
206. Koup, R.A. *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol.* **68**, 4650-4655 (1994).
207. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M. & Oldstone, M.B. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* **68**, 6103-6110 (1994).
208. Borrow, P. *et al.* Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med* **3**, 205-211 (1997).
209. Price, D.A. *et al.* Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 1890-1895 (1997).
210. Pantaleo, G. *et al.* Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* **370**, 463-467 (1994).
211. Ogg, G.S. *et al.* Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**, 2103-2106 (1998).
212. Betts, M.R. *et al.* Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol.* **75**, 11983-11991 (2001).
213. Addo, M.M. *et al.* Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J Virol.* **77**, 2081-2092 (2003).
214. Gloster, S.E. *et al.* Association of strong virus-specific CD4 T cell responses with efficient natural control of primary HIV-1 infection. *AIDS* **18**, 749-755 (2004).
215. Kalams, S.A. *et al.* Association between virus-specific cytotoxic T-lymphocyte and helper responses in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* **73**, 6715-6720 (1999).

216. Pitcher, C.J. *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* **5**, 518-525 (1999).
217. McNeil, A.C. *et al.* High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13878-13883 (2001).
218. Goepfert, P.A. *et al.* A significant number of human immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes detected by tetramer binding do not produce gamma interferon. *J Virol.* **74**, 10249-10255 (2000).
219. Zhang, D. *et al.* Most antiviral CD8 T cells during chronic viral infection do not express high levels of perforin and are not directly cytotoxic. *Blood* **101**, 226-235 (2003).
220. Appay, V. *et al.* HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp. Med* **192**, 63-75 (2000).
221. Migueles, S.A. *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol.* **3**, 1061-1068 (2002).
222. Kostense, S. *et al.* Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood* **99**, 2505-2511 (2002).
223. Champagne, P. *et al.* Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**, 106-111 (2001).
224. Kaslow, R.A. *et al.* Influence of combinations of human major histocompatibility complex genes on the course of HIV-1 infection. *Nat. Med* **2**, 405-411 (1996).
225. Migueles, S.A. *et al.* HLA B*5701 is highly associated with restriction of virus replication in a subgroup of HIV-infected long term nonprogressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 2709-2714 (2000).
226. Carrington, M. *et al.* HLA and HIV-1: heterozygote advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* **283**, 1748-1752 (1999).
227. Gao, X. *et al.* Effect of a single amino acid change in MHC class I molecules on the rate of progression to AIDS. *N Engl J Med* **344**, 1668-1675 (2001).
228. Telenti, A. Lessons from the first host-genome analysis in HIV. *Future HIV Ther* **2**, 97-98 (2008).
229. Rosenberg, E.S. *et al.* Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* **278**, 1447-1450 (1997).
230. McKay, P.F. *et al.* Global dysfunction of CD4 T-lymphocyte cytokine expression in simian-human immunodeficiency virus/SIV-infected monkeys is prevented by vaccination. *J Virol.* **77**, 4695-4702 (2003).
231. Lederman, M.M. *et al.* Immunologic responses associated with 12 weeks of combination antiretroviral therapy consisting of zidovudine, lamivudine, and ritonavir: results of AIDS Clinical Trials Group Protocol 315. *J Infect Dis* **178**, 70-79 (1998).
232. Wahren, B. *et al.* Characteristics of the specific cell-mediated immune response in human immunodeficiency virus infection. *J Virol.* **61**, 2017-2023 (1987).
233. Krowka, J.F. *et al.* Lymphocyte proliferative responses to human immunodeficiency virus antigens in vitro. *J Clin Invest* **83**, 1198-1203 (1989).

234. Palmer, B.E., Boritz, E., Blyveis, N. & Wilson, C.C. 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* **76**, 5925-5936 (2002).
235. Koning, F.A. *et al.* Low-level CD4+ T cell activation is associated with low susceptibility to HIV-1 infection. *J Immunol* **175**, 6117-6122 (2005).
236. Hellerstein, M.K. *et al.* Subpopulations of long-lived and short-lived T cells in advanced HIV-1 infection. *J Clin Invest* **112**, 956-966 (2003).
237. Galati, D. *et al.* Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **188**, 1483-1491 (2003).
238. Haynes, B.F. *et al.* Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest* **103**, 921 (1999).
239. Dion, M.L. *et al.* HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* **21**, 757-768 (2004).
240. Allen, T.M. *et al.* Tat-specific cytotoxic T lymphocytes select for SIV escape variants during resolution of primary viraemia. *Nature* **407**, 386-390 (2000).
241. Phillips, R.E. *et al.* Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**, 453-459 (1991).
242. Goulder, P.J. *et al.* Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med* **3**, 212-217 (1997).
243. Ali, A. *et al.* Broadly increased sensitivity to cytotoxic T lymphocytes resulting from Nef epitope escape mutations. *J Immunol* **171**, 3999-4005 (2003).
244. Goulder, P.J. *et al.* Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature* **412**, 334-338 (2001).
245. Barouch, D.H. *et al.* Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **415**, 335-339 (2002).
246. MacDonald, K.S. *et al.* Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **181**, 1581-1589 (2000).
247. Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. & Heard, J.M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med* **2**, 338-342 (1996).
248. Park, E.J., Vujcic, L.K., Anand, R., Theodore, T.S. & Quinnan, G.V., Jr. Mutations in both gp120 and gp41 are responsible for the broad neutralization resistance of variant human immunodeficiency virus type 1 MN to antibodies directed at V3 and non-V3 epitopes. *J Virol* **72**, 7099-7107 (1998).
249. Garcia-Blanco, M.A. & Cullen, B.R. Molecular basis of latency in pathogenic human viruses. *Science* **254**, 815-820 (1991).
250. Bailey, J., Blankson, J.N., Wind-Rotolo, M. & Siliciano, R.F. Mechanisms of HIV-1 escape from immune responses and antiretroviral drugs. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 470-476 (2004).
251. Pomerantz, R.J. HIV-1 reservoirs. *Clin Lab Med* **22**, 651-80, vi (2002).

252. Pomerantz, R.J. Reservoirs, sanctuaries, and residual disease: the hiding spots of HIV-1. *HIV Clin Trials* **4**, 137-143 (2003).
253. Pomerantz, R.J. HIV: cross-talk and viral reservoirs. *Nature* **424**, 136-137 (2003).
254. Blankson, J.N., Persaud, D. & Siliciano, R.F. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med* **53**, 557-593 (2002).
255. Zhang, H. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 in the semen of men receiving highly active antiretroviral therapy. *N Engl J Med* **339**, 1803-1809 (1998).
256. Stevenson, M. HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med* **9**, 853-860 (2003).
257. Grundstrom, S. & Andersson, J. Studies of HIV-associated immune responses in lymphoid compartments. *Curr. HIV/AIDS Rep.* **3**, 32-38 (2006).
258. Hazenberg, M.D. *et al.* T-cell division in human immunodeficiency virus (HIV)-1 infection is mainly due to immune activation: a longitudinal analysis in patients before and during highly active antiretroviral therapy (HAART). *Blood* **95**, 249-255 (2000).
259. Sousa, A.E., Carneiro, J., Meier-Schellersheim, M., Grossman, Z. & Victorino, R.M. CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load. *J Immunol.* **169**, 3400-3406 (2002).
260. Giorgi, J.V. & Detels, R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin Immunol. Immunopathol.* **52**, 10-18 (1989).
261. Levacher, M. *et al.* The significance of activation markers on CD8 lymphocytes in human immunodeficiency syndrome: staging and prognostic value. *Clin Exp. Immunol.* **90**, 376-382 (1992).
262. Bofill, M. *et al.* Increased numbers of primed activated CD8+CD38+CD45RO+ T cells predict the decline of CD4+ T cells in HIV-1-infected patients. *AIDS* **10**, 827-834 (1996).
263. Liu, Z. *et al.* CD8+ T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* **18**, 332-340 (1998).
264. Bouscarat, F. *et al.* Prospective study of CD8+ lymphocyte activation in relation to viral load in HIV-infected patients with > or = 400 CD4+ lymphocytes per microliter. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 1419-1425 (1999).
265. Liu, Z. *et al.* 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. Retrovirol.* **16**, 83-92 (1997).
266. Amirayan-Chevillard, N. *et al.* Impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on cytokine production and monocyte subsets in HIV-infected patients. *Clin Exp. Immunol.* **120**, 107-112 (2000).
267. Emilie, D. & Galanaud, P. Cytokines and chemokines in HIV infection: implications for therapy. *Int Rev. Immunol.* **16**, 705-726 (1998).
268. Kedzierska, K. & Crowe, S.M. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir. Chem. Chemother.* **12**, 133-150 (2001).

269. Tilling, R. *et al.* Parallel decline of CD8+/CD38++ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS* **16**, 589-596 (2002).
270. Zanussi, S. *et al.* Immunological changes in peripheral blood and in lymphoid tissue after treatment of HIV-infected subjects with highly active anti-retroviral therapy (HAART) or HAART + IL-2. *Clin Exp. Immunol.* **116**, 486-492 (1999).
271. Carcelain, G. *et al.* T cell changes after combined nucleoside analogue therapy in HIV primary infection. *AIDS* **13**, 1077-1081 (1999).
272. Onlamoon, N. *et al.* Studies on the potential use of CD38 expression as a marker for the efficacy of anti-retroviral therapy in HIV-1-infected patients in Thailand. *Virology* **341**, 238-247 (2005).
273. Beran, O., Holub, M., Spala, J., Kalanin, J. & Stankova, M. CD38 expression on Cd8+ T cells in Human immunodeficiency virus 1-positive adults treated with HAART. *Acta Virol.* **47**, 121-124 (2003).
274. Benito, J.M. *et al.* CD38 expression on CD8 T lymphocytes as a marker of residual virus replication in chronically HIV-infected patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**, 227-233 (2004).
275. Giorgi, J.V. *et al.* Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis* **179**, 859-870 (1999).
276. Carbone, J. *et al.* Increased levels of activated subsets of CD4 T cells add to the prognostic value of low CD4 T cell counts in a cohort of HIV-infected drug users. *AIDS* **14**, 2823-2829 (2000).
277. Hunt, P.W. *et al.* T cell activation is associated with lower CD4+ T cell gains in human immunodeficiency virus-infected patients with sustained viral suppression during antiretroviral therapy. *J Infect Dis* **187**, 1534-1543 (2003).
278. Al Harthi, L. *et al.* Evaluation of the impact of highly active antiretroviral therapy on immune recovery in antiretroviral naive patients. *HIV Med* **5**, 55-65 (2004).
279. Valdez, H. *et al.* Limited immune restoration after 3 years' suppression of HIV-1 replication in patients with moderately advanced disease. *AIDS* **16**, 1859-1866 (2002).
280. Jiang, J.D. *et al.* Concentrations of soluble CD95 and CD8 antigens in the plasma and levels of CD8+CD95+, CD8+CD38+, and CD4+CD95+ T cells are markers for HIV-1 infection and clinical status. *J Clin Immunol.* **17**, 185-192 (1997).
281. Plaeger, S. *et al.* The prognostic significance in HIV infection of immune activation represented by cell surface antigen and plasma activation marker changes. *Clin Immunol.* **90**, 238-246 (1999).
282. Liu, Z. *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* **26**, 1-7 (1996).
283. Froebel, K.S. *et al.* A single measurement of CD38CD8 cells in HIV+, long-term surviving injecting drug users distinguishes those who will progress to AIDS from those who will remain stable. *Clin Exp Immunol.* **122**, 72-78 (2000).
284. Burgisser, P., Hammann, C., Kaufmann, D., Battegay, M. &

- Rutschmann, O.T. 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 (1999).
285. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252 (1998).
286. Hart, D.N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287 (1997).
287. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch* 325-337 (1868).
288. Steinman RM & Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1142-1162 (1973).
289. Steinman RM & Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vivo. *J Exp Med* **139**, 380-397 (1974).
290. Steinman RM, Lusting DS & Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vivo. *J Exp Med* **139**, 1431-1445 (1974).
291. Steinman RM & Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 5132-5136 (1979).
292. Witmer, M.D. & Steinman, R.M. The anatomy of peripheral lymphoid organs with emphasis on accessory cells: light-microscopic immunocytochemical studies of mouse spleen, lymph node, and Peyer's patch. *Am. J Anat.* **170**, 465-481 (1984).
293. Inaba, K., Witmer, M.D. & Steinman, R.M. Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro. *J Exp Med* **160**, 858-876 (1984).
294. Hart, D.N. & McKenzie, J.L. Interstitial dendritic cells. *Int Rev. Immunol.* **6**, 127-138 (1990).
295. Young, J.W. & Steinman, R.M. Dendritic cells stimulate primary human cytolytic lymphocyte responses in the absence of CD4+ helper T cells. *J Exp Med* **171**, 1315-1332 (1990).
296. Levin, D., Constant, S., Pasqualini, T., Flavell, R. & Bottomly, K. Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. *J Immunol.* **151**, 6742-6750 (1993).
297. Paglia, P., Girolomoni, G., Robbiati, F., Granucci, F. & Ricciardi-Castagnoli, P. Immortalized dendritic cell line fully competent in antigen presentation initiates primary T cell responses in vivo. *J Exp. Med* **178**, 1893-1901 (1993).
298. Palucka, K. & Banchereau, J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol.* **19**, 12-25 (1999).
299. Adams, S., O'Neill, D.W. & Bhardwaj, N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol.* **25**, 177-188 (2005).
300. Stockwin, L.H., McGonagle, D., Martin, I.G. & Blair, G.E. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunol. Cell Biol.* **78**, 91-102 (2000).
301. Banchereau, J. *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767-811 (2000).

302. Del Hoyo, G.M. *et al.* Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* **415**, 1043-1047 (2002).
303. Hart, D.N. & Fabre, J.W. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med* **154**, 347-361 (1981).
304. Hart, D.N. & Fabre, J.W. Major histocompatibility complex antigens in rat kidney, ureter, and bladder. Localization with monoclonal antibodies and demonstration of Ia-positive dendritic cells. *Transplantation* **31**, 318-325 (1981).
305. Pelletier, M. *et al.* Characterization of human thymic dendritic cells in culture. *Immunology* **58**, 263-270 (1986).
306. Olweus, J. *et al.* Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 12551-12556 (1997).
307. Metlay, J.P. *et al.* The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* **171**, 1753-1771 (1990).
308. Steinman, R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**, 271-296 (1991).
309. Steinman, R.M., Pack, M. & Inaba, K. Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs. *Immunol. Rev.* **156**, 25-37 (1997).
310. Caux, C. *et al.* In vitro regulation of development and function of dendritic cells. *Hematol. Cell Ther.* **38**, 463 (1996).
311. Rafiq, K., Bergtold, A. & Clynes, R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest* **110**, 71-79 (2002).
312. Albert, M.L. *et al.* Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **188**, 1359-1368 (1998).
313. Bonifaz, L. *et al.* Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* **196**, 1627-1638 (2002).
314. Kraal, G., Breel, M., Janse, M. & Bruin, G. Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* **163**, 981-997 (1986).
315. Jiang, W. *et al.* The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-155 (1995).
316. Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T. & Srivastava, P.K. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* **14**, 303-313 (2001).
317. Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 123-128 (2002).
318. Delneste, Y. *et al.* Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**, 353-362 (2002).
319. Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301-305 (2002).
320. Skoberne, M., Beignon, A.S. & Bhardwaj, N. Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol Med* **10**, 251-257 (2004).

321. Cheng, F. *et al.* A critical role for Stat3 signaling in immune tolerance. *Immunity* **19**, 425-436 (2003).
322. Chow, A., Toomre, D., Garrett, W. & Mellman, I. Dendritic cell maturation triggers retrograde MHC class II transport from lysosomes to the plasma membrane. *Nature* **418**, 988-994 (2002).
323. Fujimoto, Y. *et al.* CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell* **108**, 755-767 (2002).
324. Lechmann, M., Berchtold, S., Hauber, J. & Steinkasserer, A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol.* **23**, 273-275 (2002).
325. Austyn, J.M. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **183**, 1287-1292 (1996).
326. Granucci, F., Foti, M. & Ricciardi-Castagnoli, P. Dendritic cell biology. *Adv. Immunol.* **88**, 193-233 (2005).
327. Caux, C. *et al.* Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp. Med* **180**, 1263-1272 (1994).
328. Heufler, C. *et al.* Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur. J Immunol.* **26**, 659-668 (1996).
329. Lane, P.J. & Brocker, T. Developmental regulation of dendritic cell function. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 308-313 (1999).
330. Morelli, A.E. & Thomson, A.W. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 610-621 (2007).
331. Steinman, R.M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **21**, 685-711 (2003).
332. Shortman, K. & Naik, S.H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 19-30 (2007).
333. Inaba, M. *et al.* Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J Exp. Med* **173**, 549-559 (1991).
334. Suss, G. & Shortman, K. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp. Med* **183**, 1789-1796 (1996).
335. Steinman, R.M. Dendritic cells and immune-based therapies. *Exp Hematol.* **24**, 859-862 (1996).
336. Akbulut, H. *et al.* Antitumor immune response induced by i.t. injection of vector-activated dendritic cells and chemotherapy suppresses metastatic breast cancer. *Mol Cancer Ther.* **5**, 1975-1985 (2006).
337. McCormick, S., Santosuosso, M., Zhang, X.Z. & Xing, Z. Manipulation of dendritic cells for host defence against intracellular infections. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 283-286 (2006).
338. Reid, C.D., Stackpole, A., Meager, A. & Tikerpae, J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow. *J Immunol.* **149**, 2681-2688 (1992).
339. Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**, 459-473 (1995).
340. Rademakers, L.H., de Weger, R.A. & Roholl, P.J. Identification of alkaline phosphatase positive cells in

- human germinal centres as follicular dendritic cells. *Adv. Exp Med Biol.* **237**, 165-169 (1988).
341. Ruco, L.P. *et al.* Expression of ICAM-1, VCAM-1 and ELAM-1 in angiofollicular lymph node hyperplasia (Castleman's disease): evidence for dysplasia of follicular dendritic reticulum cells. *Histopathology* **19**, 523-528 (1991).
342. Strunk, D., Egger, C., Leitner, G., Hanau, D. & Stingl, G. A skin homing molecule defines the langerhans cell progenitor in human peripheral blood. *J Exp Med* **185**, 1131-1136 (1997).
343. Caux, C. *et al.* CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* **184**, 695-706 (1996).
344. Wu, L., Li, C.L. & Shortman, K. Thymic dendritic cell precursors: relationship to the T lymphocyte lineage and phenotype of the dendritic cell progeny. *J Exp Med* **184**, 903-911 (1996).
345. Wu, L., Nichogiannopoulou, A., Shortman, K. & Georgopoulos, K. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* **7**, 483-492 (1997).
346. Zhou, L.J. & Tedder, T.F. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 2588-2592 (1996).
347. Shortman, K. & Liu, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 151-161 (2002).
348. LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Reis e Sousa, Acha-Orbea, H. & Reith, W. MHC class II expression is differentially regulated in plasmacytoid and conventional dendritic cells. *Nat. Immunol.* **5**, 899-908 (2004).
349. Rissoan, M.C. *et al.* Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **100**, 3295-3303 (2002).
350. Saunders, D. *et al.* Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **184**, 2185-2196 (1996).
351. Grouard, G. *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* **185**, 1101-1111 (1997).
352. Traver, D. *et al.* Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-2154 (2000).
353. Wu, L. *et al.* Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* **98**, 3376-3382 (2001).
354. Martin, P. *et al.* Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* **96**, 2511-2519 (2000).
355. Karsunky, H., Merad, M., Cozzio, A., Weissman, I.L. & Manz, M.G. Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **198**, 305-313 (2003).
356. D'Amico, A. & Wu, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* **198**, 293-303 (2003).

357. Zuniga,E.I., McGavern,D.B., Pruneda-Paz,J.L., Teng,C. & Oldstone,M.B. Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat. Immunol.* **5**, 1227-1234 (2004).
358. Ishikawa,F. *et al.* The developmental program of human dendritic cells is operated independently of conventional myeloid and lymphoid pathways. *Blood* (2007).
359. Corcoran,L. *et al.* The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol.* **170**, 4926-4932 (2003).
360. O'Keeffe,M. *et al.* Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med* **196**, 1307-1319 (2002).
361. Sallusto,F. & Lanzavecchia,A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118 (1994).
362. Osugi,Y., Vuckovic,S. & Hart,D.N. Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood* **100**, 2858-2866 (2002).
363. Robinson,S.P. *et al.* Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J Immunol.* **29**, 2769-2778 (1999).
364. Dzionek,A. *et al.* BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol.* **165**, 6037-6046 (2000).
365. Macdonald,K.P. *et al.* Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* **100**, 4512-4520 (2002).
366. Piccioli,D. *et al.* Functional specialization of human circulating CD16 and CD1c myeloid dendritic-cell subsets. *Blood* **109**, 5371-5379 (2007).
367. Lindstedt,M., Lundberg,K. & Borrebaeck,C.A. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells. *J Immunol.* **175**, 4839-4846 (2005).
368. Bonasio,R. & von Andrian,U.H. Generation, migration and function of circulating dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 503-511 (2006).
369. Katz,S.I., Tamaki,K. & Sachs,D.H. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* **282**, 324-326 (1979).
370. Pugh,C.W., MacPherson,G.G. & Steer,H.W. Characterization of nonlymphoid cells derived from rat peripheral lymph. *J Exp Med* **157**, 1758-1779 (1983).
371. Volc-Platzer,B., Stingl,G., Wolff,K., Hinterberg,W. & Schnedl,W. Cytogenetic identification of allogeneic epidermal Langerhans cells in a bone-marrow-graft recipient. *N Engl J Med* **310**, 1123-1124 (1984).
372. Kampgen,E. *et al.* Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *J Exp. Med* **179**, 1767-1776 (1994).
373. Thomas,R., Davis,L.S. & Lipsky,P.E. Isolation and characterization of human peripheral blood dendritic cells. *J Immunol.* **150**, 821-834 (1993).
374. Caux C, Lebecque S, Liu YJ & Banchereau J. Dendritic cells. Biology and clinical applications.

- Lotze MT & Thomson AW (eds.), pp. 63-92 (Academic Press, New York, 1999).
375. Schuler, G. & Steinman, R.M. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp. Med* **161**, 526-546 (1985).
376. Streilein, J.W., Grammer, S.F., Yoshikawa, T., Demidem, A. & Vermeer, M. Functional dichotomy between Langerhans cells that present antigen to naive and to memory/effector T lymphocytes. *Immunol. Rev.* **117**, 159-183 (1990).
377. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**, 389-400 (1995).
378. Almeida, J. *et al.* Extensive characterization of the immunophenotype and pattern of cytokine production by distinct subpopulations of normal human peripheral blood MHC II+/lineage-cells. *Clin Exp. Immunol.* **118**, 392-401 (1999).
379. Almeida, J. *et al.* Comparative analysis of the morphological, cytochemical, immunophenotypical, and functional characteristics of normal human peripheral blood lineage(-)/CD16(+)/HLA-DR(+)/CD14(-/lo) cells, CD14(+) monocytes, and CD16(-) dendritic cells. *Clin Immunol.* **100**, 325-338 (2001).
380. Grage-Griebenow, E. *et al.* Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64(+) / CD16(+) blood monocytes. *Eur. J Immunol.* **31**, 48-56 (2001).
381. Schakel, K. *et al.* A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J Immunol.* **28**, 4084-4093 (1998).
382. Fagnoni, F.F. *et al.* Circulating CD33+ large mononuclear cells contain three distinct populations with phenotype of putative antigen-presenting cells including myeloid dendritic cells and CD14+ monocytes with their CD16+ subset. *Cytometry* **45**, 124-132 (2001).
383. Rivas-Carvalho, A. *et al.* CD16+ human monocyte-derived dendritic cells matured with different and unrelated stimuli promote similar allogeneic Th2 responses: regulation by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Int Immunol.* **16**, 1251-1263 (2004).
384. Siedlar, M., Frankenberger, M., Ziegler-Heitbrock, L.H. & Belge, K.U. The M-DC8-positive leukocytes are a subpopulation of the CD14+ CD16+ monocytes. *Immunobiology* **202**, 11-17 (2000).
385. Passlick, B., Flieger, D. & Ziegler-Heitbrock, H.W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* **74**, 2527-2534 (1989).
386. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc. Biol.* **81**, 584-592 (2007).
387. Bueno, C. *et al.* Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry* **46**, 33-40 (2001).
388. Akagawa, K.S. *et al.* Generation of CD1+RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from

- human monocytes. *Blood* **88**, 4029-4039 (1996).
389. Ito, T. *et al.* A CD1a⁺/CD11c⁺ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells. *J Immunol.* **163**, 1409-1419 (1999).
390. Thomson A. *The Cytokine Handbook.* Academic Press, San Diego, CA (1998).
391. Cao, W. & Liu, Y.J. Innate immune functions of plasmacytoid dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 24-30 (2007).
392. Liu, Y.J. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 275-306 (2005).
393. Asselin-Paturel, C. & Trinchieri, G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* **202**, 461-465 (2005).
394. Facchetti, F., Wolf-Peeters, C., van den Oord, J.J., De Vos, R. & Desmet, V.J. Plasmacytoid monocytes (so-called plasmacytoid T-cells) in Kikuchi's lymphadenitis. An immunohistologic study. *Am. J Clin Pathol.* **92**, 42-50 (1989).
395. Colonna, M., Krug, A. & Cella, M. Interferon-producing cells: on the front line in immune responses against pathogens. *Curr. Opin. Immunol.* **14**, 373-379 (2002).
396. O'Doherty, U. *et al.* Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* **82**, 487-493 (1994).
397. Thomas, R. & Lipsky, P.E. Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol.* **153**, 4016-4028 (1994).
398. Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y. & Liu, Y.J. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* **192**, 219-226 (2000).
399. Galy, A. *et al.* Distinct signals control the hematopoiesis of lymphoid-related dendritic cells. *Blood* **95**, 128-137 (2000).
400. Siegal, F.P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835-1837 (1999).
401. McKenna, K., Beignon, A.S. & Bhardwaj, N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol.* **79**, 17-27 (2005).
402. Muller-Trutwin, M. & Hosmalin, A. Role for plasmacytoid dendritic cells in anti-HIV innate immunity. *Immunol. Cell Biol.* **83**, 578-583 (2005).
403. Shortman, K. & Caux, C. Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants. *Stem Cells* **15**, 409-419 (1997).
404. Kronin, V. *et al.* A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol.* **157**, 3819-3827 (1996).
405. Rissoan, M.C. *et al.* Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186 (1999).
406. Bendriss-Vermare, N. *et al.* Virus overrides the propensity of human CD40L-activated plasmacytoid dendritic cells to produce Th2 mediators through synergistic induction of IFN- γ and Th1 chemokine production. *J Leukoc. Biol.* **78**, 954-966 (2005).
407. Bronte, V. *et al.* Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* **96**, 3838-3846 (2000).

408. Rossner, S. *et al.* Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur. J Immunol.* **35**, 3533-3544 (2005).
409. Liu, Y.J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262 (2001).
410. Salio, M., Palmowski, M.J., Atzberger, A., Hermans, I.F. & Cerundolo, V. CpG-matured murine plasmacytoid dendritic cells are capable of in vivo priming of functional CD8 T cell responses to endogenous but not exogenous antigens. *J Exp. Med* **199**, 567-579 (2004).
411. Herbeuval, J.P. & Shearer, G.M. HIV-1 immunopathogenesis: how good interferon turns bad. *Clin Immunol.* **123**, 121-128 (2007).
412. Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L. & Viora, M. The immunoregulatory effects of HIV-1 Nef on dendritic cells and the pathogenesis of AIDS. *FASEB J* **20**, 2198-2208 (2006).
413. Kanto, T. & Hayashi, N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity. *Intern. Med* **45**, 183-191 (2006).
414. Yewdell, J.W. & Haeryfar, S.M. Understanding presentation of viral antigens to CD8+ T cells in vivo: the key to rational vaccine design. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 651-682 (2005).
415. Collman, R.G., Perno, C.F., Crowe, S.M., Stevenson, M. & Montaner, L.J. HIV and cells of macrophage/dendritic lineage and other non-T cell reservoirs: new answers yield new questions. *J Leukoc. Biol.* **74**, 631-634 (2003).
416. Cassol, E., Alfano, M., Biswas, P. & Poli, G. Monocyte-derived macrophages and myeloid cell lines as targets of HIV-1 replication and persistence. *J Leukoc. Biol.* **80**, 1018-1030 (2006).
417. Noursadeghi, M., Katz, D.R. & Miller, R.F. HIV-1 infection of mononuclear phagocytic cells: the case for bacterial innate immune deficiency in AIDS. *Lancet Infect Dis* **6**, 794-804 (2006).
418. Crowe, S., Zhu, T. & Muller, W.A. The contribution of monocyte infection and trafficking to viral persistence, and maintenance of the viral reservoir in HIV infection. *J Leukoc. Biol.* **74**, 635-641 (2003).
419. Donaghy, H., Wilkinson, J. & Cunningham, A.L. HIV interactions with dendritic cells: has our focus been too narrow? *J Leukoc. Biol.* **80**, 1001-1012 (2006).
420. Conti, L., Fantuzzi, L., Del Corno, M., Belardelli, F. & Gessani, S. Immunomodulatory effects of the HIV-1 gp120 protein on antigen presenting cells: implications for AIDS pathogenesis. *Immunobiology* **209**, 99-115 (2004).
421. Smith, P.D., Meng, G., Salazar-Gonzalez, J.F. & Shaw, G.M. Macrophage HIV-1 infection and the gastrointestinal tract reservoir. *J Leukoc. Biol.* **74**, 642-649 (2003).
422. Crowe, S.M. & Sonza, S. HIV-1 can be recovered from a variety of cells including peripheral blood monocytes of patients receiving highly active antiretroviral therapy: a further obstacle to eradication. *J Leukoc. Biol.* **68**, 345-350 (2000).
423. Gorantla, S., Che, M. & Gendelman, H.E. Isolation, propagation, and HIV-1 infection of monocyte-derived macrophages and recovery of virus from brain and cerebrospinal fluid. *Methods Mol Biol.* **304**, 35-48 (2005).
424. Aquaro, S. *et al.* Macrophages and HIV infection: therapeutical approaches toward this strategic

- virus reservoir. *Antiviral Res.* **55**, 209-225 (2002).
425. Biggs, B.A., Hewish, M., Kent, S., Hayes, K. & Crowe, S.M. HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*. *J Immunol.* **154**, 6132-6139 (1995).
426. Kedzierska, K. *et al.* Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol.* **26**, 247-263 (2003).
427. Yoo, J. *et al.* Altered cytokine production and accessory cell function after HIV-1 infection. *J Immunol.* **157**, 1313-1320 (1996).
428. Clerici, M. *et al.* Multiple patterns of alloantigen presenting/stimulating cell dysfunction in patients with AIDS. *J Immunol.* **146**, 2207-2213 (1991).
429. Dudhane, A. *et al.* Monocytes in HIV type 1-infected individuals lose expression of costimulatory B7 molecules and acquire cytotoxic activity. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 885-892 (1996).
430. Kumar, A. *et al.* Dysregulation of B7.2 (CD86) expression on monocytes of HIV-infected individuals is associated with altered production of IL-2. *Clin Exp Immunol.* **117**, 84-91 (1999).
431. Pietrella, D. *et al.* HIV type 1 envelope glycoprotein gp120 induces development of a T helper type 2 response to *Cryptococcus neoformans*. *AIDS* **13**, 2197-2207 (1999).
432. Zembala, M. *et al.* Modulation of antigen-presenting capacity of human monocytes by HIV-1 GP120 molecule fragments. *Immunol. Invest* **23**, 189-199 (1994).
433. Kedzierska, K. & Crowe, S.M. The role of monocytes and macrophages in the pathogenesis of HIV-1 infection. *Curr. Med Chem.* **9**, 1893-1903 (2002).
434. Pope, M. *et al.* Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* **78**, 389-398 (1994).
435. Pope, M., Gezelter, S., Gallo, N., Hoffman, L. & Steinman, R.M. Low levels of HIV-1 infection in cutaneous dendritic cells promote extensive viral replication upon binding to memory CD4+ T cells. *J Exp Med* **182**, 2045-2056 (1995).
436. Cameron, P.U., Forsum, U., Teppler, H., Granelli-Piperno, A. & Steinman, R.M. During HIV-1 infection most blood dendritic cells are not productively infected and can induce allogeneic CD4+ T cells clonal expansion. *Clin Exp Immunol.* **88**, 226-236 (1992).
437. Cameron, P., Pope, M., Granelli-Piperno, A. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the replication of HIV-1. *J Leukoc. Biol.* **59**, 158-171 (1996).
438. Sapp, M. *et al.* Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunol. Lett.* **66**, 121-128 (1999).
439. Jones, G.J. *et al.* Comparative loss and maturation of peripheral blood dendritic cell subpopulations in African and non-African HIV-1-infected patients. *AIDS* **15**, 1657-1663 (2001).
440. Pacanowski, J. *et al.* Reduced blood CD123+ (lymphoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cell numbers in primary HIV-1 infection. *Blood* **98**, 3016-3021 (2001).
441. Barron, M.A., Blyveis, N., Palmer, B.E., MaWhinney, S. & Wilson, C.C. Influence of plasma viremia on defects in number and

- immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* **187**, 26-37 (2003).
442. Grassi, F. *et al.* Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients. *AIDS* **13**, 759-766 (1999).
443. Belsito, D.V., Sanchez, M.R., Baer, R.L., Valentine, F. & Thorbecke, G.J. Reduced Langerhans' cell Ia antigen and ATPase activity in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **310**, 1279-1282 (1984).
444. Zimmer, M.I. *et al.* Disrupted homeostasis of Langerhans cells and interdigitating dendritic cells in monkeys with AIDS. *Blood* **99**, 2859-2868 (2002).
445. Lore, K. *et al.* Accumulation of DC-SIGN+CD40+ dendritic cells with reduced CD80 and CD86 expression in lymphoid tissue during acute HIV-1 infection. *AIDS* **16**, 683-692 (2002).
446. Behbahani, H. *et al.* Normalization of immune activation in lymphoid tissue following highly active antiretroviral therapy. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.* **25**, 150-156 (2000).
447. Schmidt, B. *et al.* Low-level HIV infection of plasmacytoid dendritic cells: onset of cytopathic effects and cell death after PDC maturation. *Virology* **329**, 280-288 (2004).
448. Knight, S.C. & Patterson, S. Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus, and immunopathology. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 593-615 (1997).
449. Thiebot, H. *et al.* Early and persistent bone marrow hematopoiesis defect in simian/human immunodeficiency virus-infected macaques despite efficient reduction of viremia by highly active antiretroviral therapy during primary infection. *J Virol.* **75**, 11594-11602 (2001).
450. Thiebot, H. *et al.* Impact of bone marrow hematopoiesis failure on T-cell generation during pathogenic simian immunodeficiency virus infection in macaques. *Blood* **105**, 2403-2409 (2005).
451. Zambruno, G. *et al.* Detection of HIV-1 in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients using the polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol.* **96**, 979-982 (1991).
452. Simonitsch, I., Geusau, A., Chott, A. & Jurecka, W. Cutaneous dendritic cells are main targets in acute HIV-1-infection. *Mod. Pathol.* **13**, 1232-1237 (2000).
453. Spiegel, H., Herbst, H., Niedobitek, G., Foss, H.D. & Stein, H. Follicular dendritic cells are a major reservoir for human immunodeficiency virus type 1 in lymphoid tissues facilitating infection of CD4+ T-helper cells. *Am. J Pathol.* **140**, 15-22 (1992).
454. Fujiwara, M., Tsunoda, R., Shigeta, S., Yokota, T. & Baba, M. Human follicular dendritic cells remain uninfected and capture human immunodeficiency virus type 1 through CD54-CD11a interaction. *J Virol.* **73**, 3603-3607 (1999).
455. Chougnet, C. *et al.* Normal immune function of monocyte-derived dendritic cells from HIV-infected individuals: implications for immunotherapy. *J Immunol.* **163**, 1666-1673 (1999).
456. Majumder, B. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vpr impairs dendritic cell maturation and T-cell activation: implications for viral immune escape. *J Virol.* **79**, 7990-8003 (2005).

457. Quaranta, M.G., Tritarelli, E., Giordani, L. & Viora, M. HIV-1 Nef induces dendritic cell differentiation: a possible mechanism of uninfected CD4(+) T cell activation. *Exp Cell Res.* **275**, 243-254 (2002).
458. Kawamura, T. *et al.* Decreased stimulation of CD4+ T cell proliferation and IL-2 production by highly enriched populations of HIV-infected dendritic cells. *J Immunol.* **170**, 4260-4266 (2003).
459. Fantuzzi, L., Purificato, C., Donato, K., Belardelli, F. & Gessani, S. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 induces abnormal maturation and functional alterations of dendritic cells: a novel mechanism for AIDS pathogenesis. *J Virol.* **78**, 9763-9772 (2004).
460. Smed-Sorensen, A., Lore, K., Walther-Jallow, L., Andersson, J. & Spetz, A.L. HIV-1-infected dendritic cells up-regulate cell surface markers but fail to produce IL-12 p70 in response to CD40 ligand stimulation. *Blood* **104**, 2810-2817 (2004).
461. Sanders, R.W. *et al.* Differential transmission of human immunodeficiency virus type 1 by distinct subsets of effector dendritic cells. *J Virol.* **76**, 7812-7821 (2002).
462. Turville, S.G. *et al.* Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**, 2170-2179 (2004).
463. Geijtenbeek, T.B. *et al.* DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat. Immunol.* **1**, 353-357 (2000).
464. Geijtenbeek, T.B. *et al.* Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575-585 (2000).
465. Kwon, D.S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W.A. & Littman, D.R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**, 135-144 (2002).
466. Turville, S.G. *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* **3**, 975-983 (2002).
467. Groot, F., van Capel, T.M., Kapsenberg, M.L., Berkhout, B. & de Jong, E.C. Opposing roles of blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1 infection of T cells: transmission facilitation versus replication inhibition. *Blood* **108**, 1957-1964 (2006).
468. Lore, K., Smed-Sorensen, A., Vasudevan, J., Mascola, J.R. & Koup, R.A. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J Exp. Med* **201**, 2023-2033 (2005).
469. Schmidt, B., Fujimura, S.H., Martin, J.N. & Levy, J.A. Variations in plasmacytoid dendritic cell (PDC) and myeloid dendritic cell (MDC) levels in HIV-infected subjects on and off antiretroviral therapy. *J Clin Immunol.* **26**, 55-64 (2006).
470. Zhang, Z. *et al.* Differential restoration of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in HIV-1-infected children after treatment with highly active antiretroviral therapy. *J Immunol.* **176**, 5644-5651 (2006).
471. Siegal, F.P., Fitzgerald-Bocarsly, P., Holland, B.K. & Shodell, M. Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *AIDS* **15**, 1603-1612 (2001).
472. Kamga, I. *et al.* Type I interferon production is profoundly and transiently impaired in primary HIV-1 infection. *J Infect Dis* **192**, 303-310 (2005).

473. Greub,G. *et al.* Clinical progression, survival, and immune recovery during antiretroviral therapy in patients with HIV-1 and hepatitis C virus coinfection: the Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* **356**, 1800-1805 (2000).
474. Stebbing,J. *et al.* Studies on the allostimulatory function of dendritic cells from HCV-HIV-1 co-infected patients. *Cell Res.* **14**, 251-256 (2004).
475. Stylianou,E. *et al.* Raised serum levels of interleukin-18 is associated with disease progression and may contribute to virological treatment failure in HIV-1-infected patients. *Clin Exp Immunol.* **132**, 462-466 (2003).
476. Anthony,D.D. *et al.* Selective impairments in dendritic cell-associated function distinguish hepatitis C virus and HIV infection. *J Immunol.* **172**, 4907-4916 (2004).
477. Kanto,T. *et al.* Impaired allostimulatory capacity of peripheral blood dendritic cells recovered from hepatitis C virus-infected individuals. *J Immunol.* **162**, 5584-5591 (1999).
478. Kanto,T. *et al.* Reduced numbers and impaired ability of myeloid and plasmacytoid dendritic cells to polarize T helper cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* **190**, 1919-1926 (2004).
479. Barker,E. *et al.* Virological and immunological features of long-term human immunodeficiency virus-infected individuals who have remained asymptomatic compared with those who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* **92**, 3105-3114 (1998).
480. Buchbinder,S.P., Katz,M.H., Hessel,N.A., O'Malley,P.M. & Holmberg,S.D. Long-term HIV-1 infection without immunologic progression. *AIDS* **8**, 1123-1128 (1994).
481. Chuntharapai,A. & Kim,K.J. Regulation of the expression of IL-8 receptor A/B by IL-8: possible functions of each receptor. *J Immunol.* **155**, 2587-2594 (1995).
482. Chenine,A.L., Sattentau,Q. & Moulard,M. Selective HIV-1-induced downmodulation of CD4 and coreceptors. *Arch Virol.* **145**, 455-471 (2000).
483. Aiken,C., Konner,J., Landau,N.R., Lenburg,M.E. & Trono,D. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**, 853-864 (1994).
484. Canque,B. *et al.* The susceptibility to X4 and R5 human immunodeficiency virus-1 strains of dendritic cells derived in vitro from CD34(+) hematopoietic progenitor cells is primarily determined by their maturation stage. *Blood* **93**, 3866-3875 (1999).
485. Endres,M.J. *et al.* CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**, 745-756 (1996).
486. Zoetewij,J.P., Golding,H., Mostowski,H. & Blauvelt,A. Cytokines regulate expression and function of the HIV coreceptor CXCR4 on human mature dendritic cells. *J Immunol.* **161**, 3219-3223 (1998).
487. Knight,S.C., Macatonia,S.E. & Patterson,S. HIV I infection of dendritic cells. *Int Rev. Immunol.* **6**, 163-175 (1990).
488. Paul,W.E. & Seder,R.A. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* **76**, 241-251 (1994).
489. Reid,S.D., Penna,G. & Adorini,L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 114-121 (2000).
490. Ghanekar,S. *et al.* Cytokine expression by human peripheral

- blood dendritic cells stimulated in vitro with HIV-1 and herpes simplex virus. *J Immunol.* **157**, 4028-4036 (1996).
491. Vicenzi, E. & Poli, G. Regulation of HIV expression by viral genes and cytokines. *J Leukoc. Biol.* **56**, 328-334 (1994).
492. Almawi, W.Y., Beyhum, H.N., Rahme, A.A. & Rieder, M.J. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc. Biol.* **60**, 563-572 (1996).
493. Kaufmann, G.R., Bloch, M., Zaunders, J.J., Smith, D. & Cooper, D.A. Long-term immunological response in HIV-1-infected subjects receiving potent antiretroviral therapy. *AIDS* **14**, 959-969 (2000).
494. Gulick, R.M. *et al.* 3-year suppression of HIV viremia with indinavir, zidovudine, and lamivudine. *Ann. Intern. Med.* **133**, 35-39 (2000).
495. Al Harthi, L. *et al.* Maximum suppression of HIV replication leads to the restoration of HIV-specific responses in early HIV disease. *AIDS* **14**, 761-770 (2000).
496. Kaufmann, G.R. *et al.* Rapid restoration of CD4 T cell subsets in subjects receiving antiretroviral therapy during primary HIV-1 infection. *AIDS* **14**, 2643-2651 (2000).
497. Malhotra, U. *et al.* Effect of combination antiretroviral therapy on T-cell immunity in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* **181**, 121-131 (2000).
498. Lori, F. *et al.* Treatment of human immunodeficiency virus infection with hydroxyurea, didanosine, and a protease inhibitor before seroconversion is associated with normalized immune parameters and limited viral reservoir. *J Infect Dis* **180**, 1827-1832 (1999).
499. Emminger, W., Zlabinger, G.J., Fritsch, G. & Urbanek, R. CD14(dim)/CD16(bright) monocytes in hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Eur. J Immunol.* **31**, 1716-1719 (2001).
500. Okamoto, H., Mizuno, K. & Horio, T. Circulating CD14+ CD16+ monocytes are expanded in sarcoidosis patients. *J Dermatol.* **30**, 503-509 (2003).
501. Giovannetti, A. *et al.* CCR5 and CXCR4 chemokine receptor expression and beta-chemokine production during early T cell repopulation induced by highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol.* **118**, 87-94 (1999).
502. Longman, R.S., Talal, A.H., Jacobson, I.M., Albert, M.L. & Rice, C.M. Presence of functional dendritic cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Blood* **103**, 1026-1029 (2004).
503. Williams, M.A., Trout, R. & Spector, S.A. HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J Hematother. Stem Cell Res.* **11**, 829-847 (2002).
504. Ostrowski, S.R., Gerstoft, J., Pedersen, B.K. & Ullum, H. Impaired production of cytokines is an independent predictor of mortality in HIV-1-infected patients. *AIDS* **17**, 521-530 (2003).
505. Macias, J. *et al.* Minimal liver injury in chronic hepatitis C virus infection is associated with low levels of soluble TNF-alpha/Fas receptors and acquisition in childhood. *Liver* **21**, 410-414 (2001).
506. Puoti, M. *et al.* Liver damage and kinetics of hepatitis C virus and human immunodeficiency virus

- replication during the early phases of combination antiretroviral treatment. *J Infect Dis* **181**, 2033-2036 (2000).
507. Wang, J., Guan, E., Roderiquez, G. & Norcross, M.A. Inhibition of CCR5 expression by IL-12 through induction of beta-chemokines in human T lymphocytes. *J Immunol.* **163**, 5763-5769 (1999).
508. Giorgi, J.V. *et al.* Elevated levels of CD38+ CD8+ T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+ T cell levels: results of 6 years of follow-up. The Los Angeles Center, Multicenter AIDS Cohort Study. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.* **6**, 904-912 (1993).
509. Wang, L., Robb, C.W. & Cloyd, M.W. HIV induces homing of resting T lymphocytes to lymph nodes. *Virology* **228**, 141-152 (1997).
510. Wang, L., Chen, J.J., Gelman, B.B., Konig, R. & Cloyd, M.W. A novel mechanism of CD4 lymphocyte depletion involves effects of HIV on resting lymphocytes: induction of lymph node homing and apoptosis upon secondary signaling through homing receptors. *J Immunol.* **162**, 268-276 (1999).
511. Chen, J.J. *et al.* CD4 lymphocytes in the blood of HIV(+) individuals migrate rapidly to lymph nodes and bone marrow: support for homing theory of CD4 cell depletion. *J Leukoc. Biol.* **72**, 271-278 (2002).
512. Albin, A. *et al.* HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 13153-13158 (1998).
513. Chun, T.W. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**, 183-188 (1997).
514. Almeida, C.A., Price, P. & French, M.A. Immune activation in patients infected with HIV type 1 and maintaining suppression of viral replication by highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**, 1351-1355 (2002).
515. Lambotte, O. *et al.* Detection of infectious HIV in circulating monocytes from patients on prolonged highly active antiretroviral therapy. *J Acquir. Immune Defic. Syndr.* **23**, 114-119 (2000).
516. Chun, T.W. *et al.* Relationship between the frequency of HIV-specific CD8+ T cells and the level of CD38+CD8+ T cells in untreated HIV-infected individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**, 2464-2469 (2004).

VII. Anexo 1

ANEXO 1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN PARA LOS DIFERENTES GRUPOS DE INDIVIDUOS ANALIZADOS

1. PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH-1 (VIH-1⁺):
 - 1.1. Criterios de inclusión
 - 1.1.1. Edad superior a 18 años
 - 1.1.2. Consentimiento informado para participar en el estudio
 - 1.1.3. Infección por VIH-1 con viremia detectable
 - 1.1.4. Ausencia de TAR previo o concomitante
 - 1.1.5. Indicación de TAR según las recomendaciones de práctica clínica establecidas en el momento de inclusión (Grupo de estudio del SIDA, www.gesida.seimc.org)
 - 1.1.6. En pacientes femeninas en edad fértil, ausencia de gestación y compromiso de evitar embarazo durante el tiempo de estudio
 - 1.1.7. Ausencia de trastorno mental que presupusiera falta de apego al tratamiento y/o contraindicación relativa para el uso de efavirenz, según criterio del investigador
 - 1.1.8. Ausencia de uso de drogas por vía parenteral
 - 1.2. Criterios de exclusión
 - 1.2.1. No cumplir alguno de los criterios de inclusión

2. PACIENTES INFECTADOS POR EL VHC NO INFECTADOS POR EL VIH-1 (VHC⁺/VIH-1⁻):
 - 2.1. Criterios de inclusión
 - 2.1.1. Edad superior a 18 años
 - 2.1.2. Consentimiento informado para participar en el estudio
 - 2.1.3. Infección por VHC con viremia detectable
 - 2.1.4. Ausencia de tratamiento previo o concomitante con interferón α 2
 - 2.1.5. Categoría clínica Child-Pugh A/B
 - 2.1.6. En pacientes femeninas en edad fértil, ausencia de gestación y compromiso de evitar embarazo durante el tiempo de estudio
 - 2.1.7. Ausencia de uso de drogas por vía parenteral
 - 2.2. Criterios de exclusión
 - 2.2.1. No cumplir alguno de los criterios de inclusión

3. PACIENTES VIH-1⁺ QUE NO PROGRESAN A LARGO PLAZO (NPLP):
 - 3.1. Criterios de inclusión
 - 3.1.1. Edad superior a 18 años
 - 3.1.2. Consentimiento informado para participar en el estudio

- 3.1.3. Infección por VIH-1 con viremia detectable
- 3.1.4. Ausencia de TAR previo o concomitante
- 3.1.5. Mantenimiento de un recuento de linfocitos T CD4+ superior a 500 células/ μ l tras infección por el VIH-1, documentada durante al menos 10 años, en fase clínica A
- 3.2. Criterios de exclusión
 - 3.2.1. No cumplir alguno de los criterios de inclusión

- 4. POBLACIÓN SANA: donantes sanos voluntarios reclutados de acuerdo a las características poblacionales de la cohorte diana.
 - 4.1. Criterios de inclusión
 - 4.1.1. Edad superior a 18 años
 - 4.1.2. Consentimiento informado para participar en el estudio
 - 4.1.3. Ausencia de infección por VIH-1, VIH-2 y/o VHC, definida mediante serología y/o viremia detectable.
 - 4.2. Criterios de exclusión
 - 4.2.1. No cumplir alguno de los criterios de inclusión