
Expresión alterada de receptores de supervivencia (CD127) y de muerte (Fas) en linfocitos T CD8 totales, vírgenes y de memoria de pacientes infectados por el Virus de Inmunodeficiencia Humana: posibles implicaciones para la progresión de la infección.

Miguel Alfonso¹, José Suárez¹, Alexandra Díaz¹, Mario Comegna², Patricia Valenzuela², María Sánchez², Dimas Hernández³ y Alida Hung⁴.

¹Laboratorio de Inmunofisiología Celular, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela, ²Servicio de Infectología, Hospital Vargas, ³Cátedra de Clínica y Terapéutica B y ⁴Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Medicina "José María Vargas", Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

Palabras clave: VIH, CD8, Fas (CD95), IL-7alfa (CD127), apoptosis.

Resumen. En el presente trabajo, estudiamos la expresión *ex vivo* e *in vitro* de los receptores CD95/Fas y CD127 en linfocitos T CD8+ totales, vírgenes y de memoria de pacientes infectados con VIH con diferentes concentraciones sanguíneas de linfocitos T CD4+. Además, a estas células se les determinó la apoptosis espontánea e inducida por antígenos virales (Env) y su capacidad proliferativa específica. Los resultados mostraron que los pacientes con una baja densidad de linfocitos T CD4+ sanguíneos ($CD4 < 250/\mu L$), manifestaban *ex vivo* una alta expresión de CD95/Fas y una baja expresión de CD127 en todas las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ en relación a los pacientes con una densidad mayor de linfocitos T CD4+ en sangre ($CD4 > 250/\mu L$). En ensayos *in vitro* usando el antígeno Env, los linfocitos T CD8+ totales presentaron una expresión similar de ambos receptores con una mayor incidencia de apoptosis espontánea y una disminuida capacidad proliferativa en relación a los controles. Estos resultados señalan como el desarrollo progresivo de la infección por VIH en pacientes no tratados está asociado con una disminución de linfocitos T CD8+ sanguíneos, caracterizados por fallas en su capacidad proliferativa y en la frecuencia de apoptosis, lo cual se evidencia por una expresión alterada de CD127 y CD95/Fas.

Altered expression of survival (CD127) and death (Fas) receptors in total, naïve and memory CD8 T lymphocytes from Human Immunodeficiency Virus infected patients: possible implications for progression of infection.

Invest Clin 2008; 49(2): 151 - 168

Key words: HIV, CD8, Fas (CD95), IL-7alpha (CD127), apoptosis.

Abstract. We studied the *ex vivo* and *in vitro* expression of CD95/Fas and CD127 receptors in total, naïve and memory CD8+ T cells from VIH infected patients with different blood counts of CD4+ T cells. In addition, spontaneous and induced apoptosis were determined *in vitro* using a viral antigen (Env), along with an evaluation of their specific proliferative capacity. The obtained results demonstrated that patients with low counts of CD4+ T cells ($CD4 < 250/\mu L$), showed *ex vivo*, a high expression of CD95/Fas and a low expression of CD127 in all CD8+ T cell subgroups, as compared with patients with bigger counts of CD4+ T cells in blood ($CD4 > 250/\mu L$). *In vitro* analyses using Env antigen showed that CD8+ T cells displayed a similar expression of both receptors, with a higher incidence of spontaneous and induced apoptosis and a diminished proliferative capacity as compared with controls. Results indicate how the progression of VIH infection in non-treated patients is related to a decrease of CD8+ T cells in blood, characterized by failures in their proliferative capacity and apoptosis frequency, which is demonstrated by the altered expression of CD127 and CD95/Fas expression.

Recibido: 21-02-2007. Aceptado: 30-07-2007.

INTRODUCCIÓN

El papel fundamental que juegan los linfocitos T CD8+ en el control de la replicación viral en las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) está bien establecido desde 1986 (1,2). Durante la fase aguda de la infección viral se desarrolla una respuesta vigorosa de linfocitos T CD8 oligoclonal (3, 4), la cual alcanza su valor máximo cuando la viremia primaria comienza a descender (5, 6). Por otra parte, estudios con pacientes no progresores, quienes pueden controlar la infección, mostraron que sus linfocitos T CD8+ poseen una alta capacidad citotóxica frente al VIH (7). Además, la lenta progresión de la enfermedad en estos pacientes se correlacionó

con una respuesta vigorosa anti-VIH de linfocitos T CD4+ y CD8+ (8, 9). La rápida aparición de mutantes virales que escapan de la respuesta citotóxica sugiere la fuerte presión que ejercen los linfocitos T CD8+ sobre el virus (10, 11). Trabajos realizados en primates no humanos infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Simia (SIV) muestran el papel protector de la respuesta citotóxica frente al virus (12, 13).

Sin embargo, a pesar de la presencia de una respuesta citotóxica frente al VIH, en pacientes no tratados se observa una replicación sostenida del virus, la cual inevitablemente conduce a una profunda inmunodeficiencia y muerte. No está claro aún porque los linfocitos T CD8+ a pesar de proveer una protección parcial, son incapaces

de prevenir la progresión a la fase SIDA en estos pacientes. Varios posibles mecanismos han sido planteados, tales como la evasión de la respuesta inmunológica por parte del virus a través de mutaciones de sus proteínas, principalmente Nef (14, 15); la disminución de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase I sobre la superficie leucocitaria (16); la baja densidad y participación de los linfocitos T CD4+ (17); la alta susceptibilidad de los linfocitos T CD8+ a la apoptosis inducida por CD95/Fas debido a la baja expresión de Bcl-2 y Bcl-xL (18), y la presencia de la molécula PD-1 (programmed death) asociada con apoptosis y baja capacidad proliferativa de linfocitos T CD8+ específicos al VIH (19, 20).

La homeostasis de las células T de memoria es mediada por un balance entre un bajo nivel de proliferación de estas células con su supervivencia y una baja tasa de muerte apoptótica (21-23). Se conoce que la renovación y supervivencia de las células T CD8 memoria no requieren ni de antígenos ni del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) (21, 24-27), aunque las interacciones del complejo TCR/CPH son necesarias para mantener la función de las células T de memoria (25). En los últimos años se ha demostrado que la citocina IL-7 es un factor importante de supervivencia de los linfocitos T, tanto de las células memoria como las vírgenes. Se conoce que la IL-7 juega un papel crítico en el control de la homeostasis de los linfocitos T CD8 (28). Esta citocina es capaz de actuar sobre linfocitos T aumentando su supervivencia y su proliferación homeostática (29-31), mediante la inducción de la síntesis de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (32, 33), la cual juega un papel muy importante sobre la linfopoyesis, la regulación de la respuesta inmunitaria y la apoptosis (34). Todos estos efectos de la IL-7 dependen de la expresión de su receptor sobre la célula blanco, el

cual presenta en su estructura proteica una subunidad no compartida con otros receptores de citocinas, la denominada cadena alfa (CD127/IL-7alfa), expresada en la mayoría de los linfocitos T (35, 36).

La homeostasis de las células T se pierde durante la infección con el VIH. Este virus es capaz de producir un aumento de la destrucción de los linfocitos T, una disminución de la producción de los mismos y graves defectos en la inmunidad mediada por células (37, 38). El papel que juega la IL-7 y su receptor en la inmunopatogénesis de la infección VIH está aún bajo investigación. Se han encontrado altos niveles plasmáticos de IL-7 en pacientes VIH+, y en algunos estudios esto se correlaciona con la pérdida de los linfocitos T CD4 (30, 39, 40). Además, se ha observado una reducción de la expresión de la molécula CD127 en linfocitos T CD8 en pacientes infectados (41-43). Sin embargo, se conoce poco como se encuentra la expresión de esta molécula CD127 en las subpoblaciones memoria y vírgenes de los linfocitos T CD8 en la infección VIH y sus posibles implicaciones en la supervivencia de estas células.

En este contexto, nuestro trabajo se enfocó en el estudio simultáneo de la expresión de la molécula CD127 y la molécula CD95 (Fas) (ensayos *ex vivo* e *in vitro*) en las subpoblaciones vírgenes y de memoria de linfocitos T CD8 provenientes de pacientes infectados con VIH. Estos pacientes fueron divididos en dos grupos: grupo 1 pacientes VIH+ con > 250 células T CD4/ μ L sangre, y grupo 2 con < 250 células T CD4/ μ L sangre. El grupo control consistió en donadores sanos. También analizamos la capacidad de proliferación específica al VIH de estas subpoblaciones de linfocitos T CD8 y la frecuencia de apoptosis espontánea e inducida por antígenos virales en estas células mediante ensayos *in vitro*. Nuestros resultados en los ensayos *ex vivo* indican una disminución drástica de la expresión de

la molécula CD127 y un aumento significativo de la expresión de Fas en las subpoblaciones vírgenes y de memoria de linfocitos T CD8, en ambos grupos de pacientes, pero observándose mayores cambios en el grupo de los pacientes VIH+ con menos células CD4 sanguíneas (< 250 CD4/ μ L sangre). Sin embargo, esta expresión alterada de ambas moléculas CD127 y Fas, no dependen de los niveles sanguíneos de células T CD4 en los pacientes infectados, sugiriendo otros factores involucrados en este fenómeno. Igualmente, esta misma alteración de la expresión de ambas moléculas fueron encontradas en los ensayos *in vitro*, tanto en ausencia de estimulación como en presencia de antígenos del VIH. Finalmente, se detectó una disminución en la capacidad de proliferación en estas células en presencia de antígenos del VIH y de PHA (*phytohemagglutinin*), y un aumento de la apoptosis espontánea e inducida por antígenos virales. Todos estos resultados sugieren un desequilibrio en la homeostasis de las células T CD8 en pacientes VIH+ por alteraciones de su capacidad de proliferación y de su frecuencia de apoptosis, posiblemente causados por cambios en la expresión de las moléculas CD127 y Fas en su superficie celular, ocasionando un mayor compromiso con el sistema inmunológico de los pacientes infectados con VIH.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en este estudio dos grupos de pacientes crónicamente infectados con VIH evaluados en el Servicio de Infectología del Hospital Vargas de Caracas, Venezuela. El primer grupo ($n = 11$) presentaba un número menor a 250 células T CD4/ μ L sangre (11-247 CD4/ μ L sangre) y el segundo ($n = 9$) estaba conformado por pacientes con un número mayor a 250 células T

CD4/ μ L de sangre (258-797 CD4/ μ L sangre), ambos sin tratamiento antiretroviral y sin ningún tipo de sintomatología de infecciones oportunistas. Donantes sanos, no infectados con VIH, fueron incluidos en el protocolo como controles ($n = 14$). El estudio fue aprobado por la comisión de Bioética del instituto hospitalario y los pacientes dieron su consentimiento por escrito de participar en el mismo.

Cuantificación del ARN-VIH-1

Los niveles plasmáticos de ARN-VIH fueron medidos mediante la técnica de la RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) con un kit comercial (Roche). Estas mediciones fueron realizadas en el Banco Municipal de Sangre de Caracas, Venezuela.

Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales usados en este estudio fueron: CD3-PerCp/CD8-APC, CD4-APC, CD45RA-FITC, CD45RO-PE, anti-BrdU-FITC, CD95/Fas-FITC, CD127-PE (Becton Dickinson, BD).

Análisis del fenotipo de las subpoblaciones de linfocitos T

A partir de 100 μ L de sangre total, el fenotipo de las subpoblaciones celulares de linfocitos T de los individuos fue analizado por citometría de flujo. Los linfocitos T CD8 fueron marcados con anticuerpos específicos CD3-PerCp/CD8-APC, mientras que las respectivas subpoblaciones vírgenes y de memorias fueron identificadas con la combinación de anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos: antiCD45RA-FITC y antiCD45RO-PE, respectivamente. Las células fueron incubadas con los anticuerpos conjugados por 30 min a temperatura ambiente, en oscuridad, se lavaron las células y se lisaron los glóbulos rojos mediante una solución de lisis (BD) por 15 min. Poste-

riormente, se lavaron las células y se resuspendieron en 500 μ L de PBS (Santa Cruz, USA) para ser analizadas en un citómetro de flujo FACS ExCalibur (BD), donde se seleccionó la población de leucocitos vivos, según las características de dispersión frontal (side scatter) y lateral de la luz (forward scatter). Por cada muestra, se adquirieron y analizaron 10.000 eventos.

Ensayo de proliferación de linfocitos *in vitro* (PLs)

A partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) aisladas de sangre fresca heparinizada mediante un gradiente de densidad de Ficoll (Histopaque, Sigma, USA) fueron cultivadas en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 1×10^5 células/pozo en 0,2 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO, USA) suplementado con antibióticos y 10% de suero fetal bovino (GIBCO, USA) en ausencia o presencia de 5 μ g/l de PHA (Sigma), 1 μ g/mL de un cóctel de péptidos de envoltura (Env) de VIH (BD). La PLs fue cuantificada a las 72 horas de estimulación por la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU, Sigma) en cultivos triplicados de las células, las cuales fueron incubadas por 4-5 horas con BrdU e inmediatamente permeabilizadas con saponina (0,5%) con el fin de marcar las células que hubiesen incorporado BrdU, mediante un anticuerpo anti-BrdU-FITC con DNasa. La incubación con este anticuerpo se realizó por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad en conjunto con una serie de otros marcadores para células T CD8, vírgenes y memoria mediante una batería de anticuerpos: CD3-PerCp/CD8-APC/CD45RO-PE. Después de haber sido lavadas, las muestras fueron analizadas por citometría de flujo, seleccionando para su análisis en la población de leucocitos vivos, las poblaciones de linfocitos T totales (CD3) y de linfocitos T CD8. Por cada muestra, 10.000

eventos fueron adquiridos. Los resultados fueron expresados como porcentajes de células positivas para el marcaje de BrdU.

Cuantificación de apoptosis

El marcaje con annexina V fue desarrollado para detectar los cambios de la membrana plasmática que ocurren en las primeras fases del proceso apoptótico. El marcaje fue realizado en cada condición del cultivo de CMSP a las 72 horas de estimulación. Las células fueron recolectadas y marcadas con Annexina V-FITC y con yoduro de propidio (PI), para identificar las células apoptóticas y necróticas respectivamente, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (BD). Además se incluyeron en la incubación los anticuerpos respectivos para identificar a los linfocitos T CD8 (CD3-PerCp/CD8-APC). Después de 15 min de incubación se lavaron las células y se resuspendieron en PBS y se analizaron en el citómetro de flujo.

Determinación de la expresión *ex vivo* e *in vitro* de Fas (CD95) en las subpoblaciones de los linfocitos T

Se determinó la expresión *ex vivo* de la molécula CD95/Fas en la superficie de diferentes subpoblaciones linfocitarias mediante el marcaje selectivo de esta molécula con un anticuerpo anti-CD95-FITC y con una serie de anticuerpos (CD3, CD4/CD8, CD45RO). Se incubaron 50 μ L de sangre periférica con estos anticuerpos por 30 min en oscuridad, se lavaron las células y se lisaron los glóbulos rojos mediante una solución de lisis por 15 min. Posteriormente, se lavaron las células y se resuspendieron en 500 μ L de paraformaldehído al 1% para ser analizadas en el citómetro de flujo. La expresión *in vitro* de la molécula CD95/Fas, se determinó en las células cultivadas y estimuladas por 72 h mediante el marcaje selectivo utilizando el mismo protocolo descrito para el análisis *ex vivo*.

Determinación de la expresión *ex vivo* e *in vitro* de IL-7alfa (CD127) en las subpoblaciones de los linfocitos T

Se cuantificó la expresión *ex vivo* de esta molécula CD127 en la superficie de diferentes subpoblaciones linfocitarias mediante el marcaje selectivo de esta molécula por un anticuerpo anti-CD127-PE y con una serie de anticuerpos (CD3, CD4/CD8, CD45RO). Se incubaron 50 μ L de sangre con estos anticuerpos por 30 min en oscuridad, se lavaron las células y se lisaron los glóbulos rojos con una solución de lisis por 15 minutos. Posteriormente, se lavaron las células y se resuspendieron en 500 μ L de paraformaldehído al 1% para ser analizadas en el citómetro de flujo. La expresión *in vitro* de la molécula CD127 se determinó en las células cultivadas y estimuladas por 72 h por el marcaje selectivo de esta molécula y utilizando el mismo protocolo descrito para el análisis *ex vivo*.

Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso del programa SIGMASTAT (versión 9.2 para Windows, SIGMA, USA). Los resultados fueron expresados como el promedio \pm la desviación estándar. Se verificó la distribución normal de los datos, por

lo que las diferencias en los promedios fueron comparados por el método t de Student para datos no pareados. Los análisis de regresión fueron realizados por la prueba estadística de Pearson para determinar las correlaciones entre los niveles sanguíneos de linfocitos T CD4 y de linfocitos CD8 vírgenes y de memoria con la expresión de CD95/Fas y CD127 en linfocitos T CD8. Se consideraron significativos las diferencias cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Las concentraciones sanguíneas de linfocitos T CD8 vírgenes y memoria se correlacionan con el número de linfocitos T CD4 en sangre en la infección por VIH. La presencia de la infección VIH ocasiona una alteración en el número de linfocitos T CD8 totales y sus subpoblaciones vírgenes y de memoria sanguíneos con respecto a los valores del grupo de individuos sanos. Efectivamente, se encontró que los pacientes con más linfocitos CD4 en sangre ($CD4 > 250/\mu$ L) presentan un número significativamente mayor de linfocitos T CD8 totales ($p < 0,01$), vírgenes ($p < 0,01$) y de memoria ($p < 0,05$) en relación a los valores del grupo control (Tabla I). Sin embargo, en

TABLA I
CONTAJE DE SUBPOBLACIONES CELULARES EN SANGRE, CARGA VIRAL PLASMÁTICA Y EDAD DE LOS INDIVIDUOS

Grupos	CD3CD4+	CD3CD8+	CD8CD45RA+	CD8CD45RO+	Carga viral	Edad ^f
Pacientes (CD4>250) (n= 11)	420 \pm 210 ^{a,c} (258-727) ^b	1261 \pm 759 ^c (457-3212)	511 \pm 298 ^c (191-1042)	524 \pm 213 ^c (215-757)	19.871 \pm 10.215 ^e	39 \pm 10 (29-58)
Pacientes (CD4<250) (n= 9)	144 \pm 87 ^c (11-247)	738 \pm 650 (87-2324)	221 \pm 165 ^d (29-598)	321 \pm 237 (59-757)	103.967 \pm 149.968	36 \pm 9 (24-63)
Controles (n= 14)	1111 \pm 367 (615-1830)	620 \pm 418 (19-1297)	289 \pm 203 (49-713)	194 \pm 168 (39-670)	ND	33 \pm 12 (19-52)

^aLos promedios absolutos son expresados como célula/ μ L \pm DS. ^bLos valores encerrados entre paréntesis representan el mínimo y máximo del conjunto de datos. ^c $p < 0,01$ vs control. ^d $p < 0,05$ vs grupo (CD4 > 250). ^eLos valores son expresados como N° copias ARN viral/mL plasma. ^fEdad en años.

aqueellos pacientes que presentan un número más bajo de linfocitos T CD4 sanguíneos ($CD4 < 250/\mu L$), muestran una disminución en el número de linfocitos T CD8 totales, de memoria y vírgenes, esta última subpoblación estadísticamente diferente ($p < 0,05$) a los valores de los pacientes con mayor número de células T CD4 ($CD4 > 250/\mu L$). Aunado a esto, analizamos la correlación que existe entre el número de linfocitos T CD8 vírgenes y de memoria en sangre y el número de linfocitos T CD4 sanguíneo que presentan los pacientes infectados con VIH, encontrándose una correlación positiva para ambas subpoblaciones ($p < 0,001$) (datos no mostrados), es decir, a un menor número de linfocitos T CD4 hay una reducción del número de células T CD8 vírgenes y memoria en sangre. Por otra parte, los valores de la carga viral fueron mayores pero sin diferencia estadísticamente significativa en el grupo de pacientes con menos linfocitos CD4 sanguíneos ($CD4 < 250/\mu L$) en relación al grupo con mayor cantidad de linfocitos T CD4 en sangre ($CD4 > 250 \mu L$).

La presencia de la infección por VIH ocasiona un aumento de la expresión *ex vivo* de Fas en linfocitos T CD8, independiente de los niveles sanguíneos de linfocitos T CD4. La molécula CD95/Fas es uno de los factores inductores de la apoptosis celular mediante la unión de su ligando natural, FasL, cuyo papel en la inmunopatología del VIH es de gran importancia. Se investigó la expresión *ex vivo* de esta molécula, encontrando aumentada su expresión de manera significativa (tanto en porcentaje como en promedio de intensidad de fluorescencia, MFI) en la superficie de los linfocitos T CD8 totales y vírgenes de los pacientes infectados tal como se puede observar en la Figs. 1A, 1B y 1C. Las células T CD8 de los pacientes con menos CD4 sanguíneos ($CD4 < 250/\mu L$) expresaron valores promedios muchos más altos de CD95/Fas con respecto a los del grupo control al analizarlos como población total ($P < 0,0005$), y como subpoblación virgen ($P < 0,005$). No fue significativa la diferencia en la subpoblación de memoria. Se pudo observar que

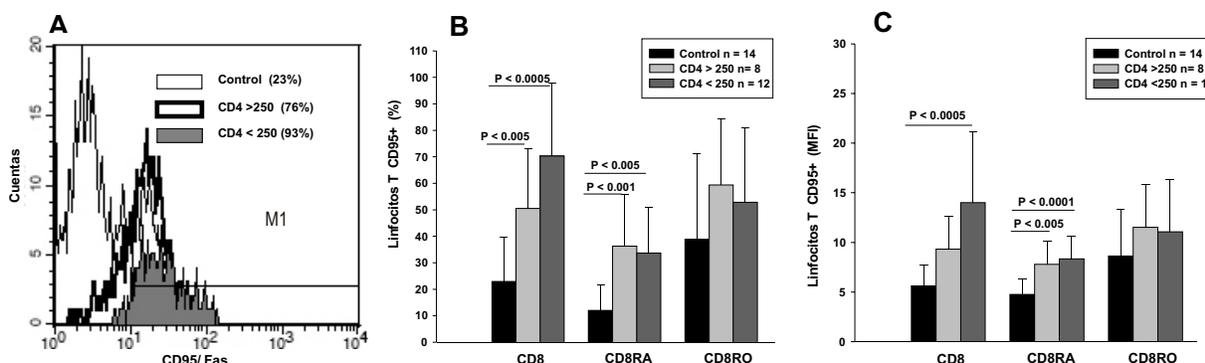


Fig. 1. Expresión *ex vivo* de CD95/Fas en linfocitos T CD8 en la infección VIH. Se determinó la expresión *ex vivo* de la molécula CD95/Fas en linfocitos T CD3CD8 totales, vírgenes y de memoria a partir de sangre total. (A). Histograma de resultados de un experimento típico por cada grupo estudiado (controles, voluntarios sanos; $CD4 > 250$, pacientes VIH+ con más de 250 células T CD4/ μL sangre; $CD4 < 250$, pacientes con menos de 250 células T CD4/ μL sangre) (B). Resultados totales en porcentaje (%) de la expresión *ex vivo* de CD95/Fas en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8 (C) y en promedio de la intensidad de fluorescencia (MFI). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método t de Student para datos no pareados ($p < 0,05$) vs control.

los pacientes con mayores niveles sanguíneos de linfocitos T CD4 ($CD4 > 250/\mu L$) presentaban un aumento de la expresión de CD95/Fas en los linfocitos T CD8 totales ($P < 0,05$) en relación al grupo control pero con menores valores en relación al grupo de pacientes infectados ($CD4 < 250/\mu L$) ($P < 0,005$ vs grupo control). También se pudo observar que el aumento de la expresión de CD95/Fas sobre la superficie de los linfocitos T CD8 de los pacientes infectados es independiente de los niveles sanguíneos de linfocitos T CD4 ($P = 0,80$), (datos no mostrados).

La expresión de CD95/Fas en linfocitos T CD8 de pacientes infectados con VIH está aumentada tanto en ausencia de estímulo como en presencia de antígenos del VIH (Env). Se estudió en diferentes condiciones de cultivo la expresión de CD95/Fas en los linfocitos T CD8 totales provenientes de ambos grupos de pacientes infectados con VIH. Observamos que estas células presentaron una mayor expresión de Fas tanto en ausencia de estímulo como en presencia de Env con respecto al control (Fig 2A),

siendo estadísticamente significativa la diferencia entre los pacientes con menos linfocitos T CD4 en sangre ($CD4 < 250/\mu L$) y el grupo control: Sin estímulo: ($58,0 \pm 26,4$ vs $34,0 \pm 18,9$, $P < 0,05$) y Env ($55,6 \pm 23,0$ vs $38,2 \pm 16,5$, $P < 0,05$). Sin embargo, cuando se analizó la expresión de CD95/Fas en las subpoblaciones vírgenes y de memoria de las células T CD8 cultivadas por 72 horas en presencia de Env, se pudo observar que ambos grupos de pacientes VIH+ expresaron un aumento de la expresión de esta molécula con respecto a los valores del grupo control, pero sin diferencia significativa entre ambos (Figs. 2B y 2C).

La expresión *ex vivo* de la moléculas IL-7alfa (CD127) está disminuida en los linfocitos T CD8 en la infección por VIH y es independiente del número de linfocitos T CD4 sanguíneos. La molécula IL-7alfa (CD127) es una de las sub-unidades del receptor de membrana de la citocina IL-7, la cual es otra de las citocinas responsables de la supervivencia de los linfocitos T, vírgenes y de memoria (28). Cuando se midió la ex-

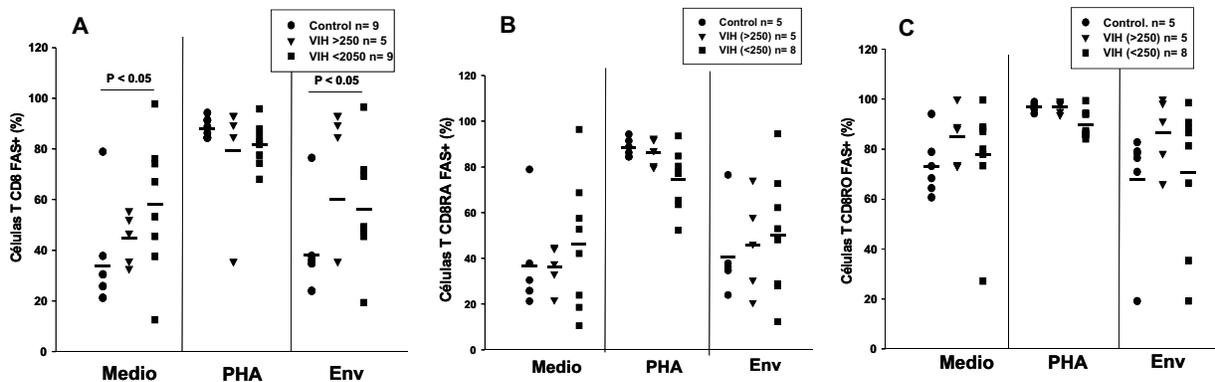


Fig. 2. Medición de la expresión *in vitro* de CD95/Fas en linfocitos T CD8. Se determinó la expresión *in vitro* de la molécula CD95/Fas en linfocitos T CD3CD8 totales (A), vírgenes (B) y memoria (C) de los diferentes grupos experimentales (controles, voluntarios sanos; $CD4 > 250$, pacientes VIH+ con más de 250 células T CD4/ μL sangre; $CD4 < 250$, pacientes con menos de 250 células T CD4/ μL sangre), en presencia de diferentes condiciones de estímulos (PHA $5 \mu g/mL$ y Env $1 \mu g/mL$) después de 72 horas de cultivo de PBMC. Los resultados fueron obtenidos mediante la adquisición de 10.000 eventos, cuyas barras representan el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método t de Student para datos no pareados ($p < 0,05$) vs control.

presión *ex vivo* de la molécula CD127 sobre la superficie de linfocitos T CD8 de pacientes infectados, se pudo constatar una significativa disminución con respecto a la del grupo control, tanto en porcentaje como en densidad de receptores por célula (Figs. 3A y 3B, respectivamente). Al analizar si este comportamiento en la expresión *ex vivo* de CD127 tanto en linfocitos T CD4 como en CD8 presentaba alguna correlación con los valores de linfocitos T CD4 sanguíneos de estos pacientes, encontramos que no existía tal correlación ($P = 0,52$ y $P = 0,25$, respectivamente) (datos no mostrados).

Se investigó también la expresión de la CD127 en linfocitos T CD8, en las subpoblaciones vírgenes y de memoria, en ensayos *in vitro*, tanto en ausencia como en presencia de estimulación con PHA o péptidos del VIH (Env). Los resultados obtenidos indican claramente que la expresión de esta molécula está disminuida en todas estas subpoblaciones celulares de pacientes infectados con VIH, siendo mayor la diferencia en aquellos pacientes con menos células CD4 sanguíneas en comparación a los valores del grupo de individuos sanos (Figs 4A, 4B y 4C), presentando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) la subpoblación virgen comparándola con el control en ausencia de estímulo (Fig 4B).

La apoptosis en linfocitos T CD8 se encuentra aumentada en pacientes VIH+. Se conoce que una de las causas de la inmunopatología de la infección por el VIH es la alta tasa de apoptosis en los linfocitos T. Medimos la tasa de apoptosis espontánea e inducida en linfocitos T CD8 cultivados por 72 horas en ausencia o en presencia de estimulación con PHA y Env. Se pudo observar que la infección viral produjo un aumento de la apoptosis espontánea en estas células con respecto al control (Fig. 5). Así mismo, se observó que los pacientes con menos linfocitos CD4 sanguíneos ($CD4 < 250/\mu$) presentaban un mayor porcentaje de apop-

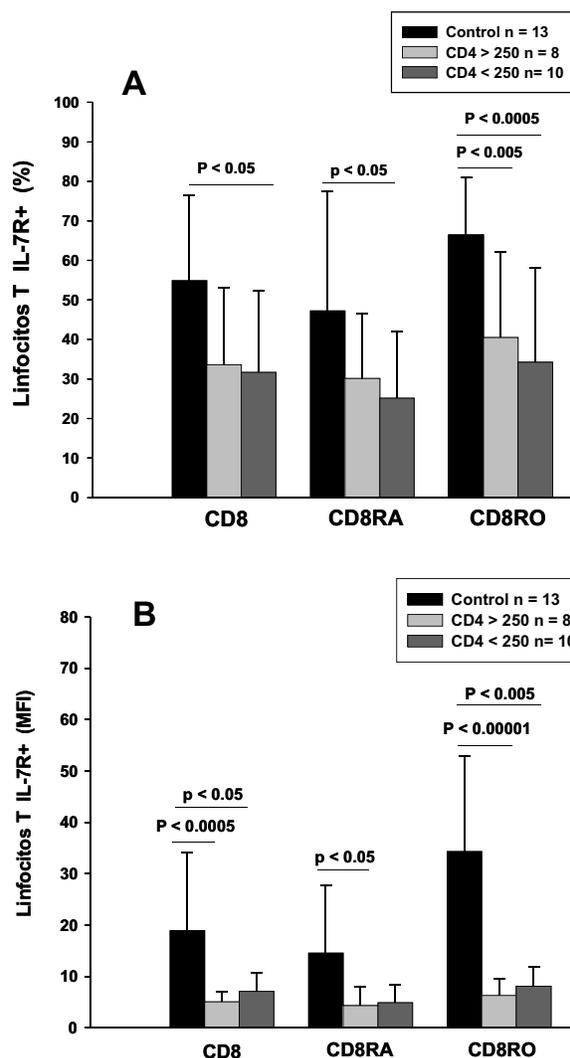


Fig. 3. Determinación de la expresión *ex vivo* de IL-7alfa (CD127) en linfocitos T CD8 en la infección VIH. Se determinó la expresión *ex vivo* de la molécula CD127 en linfocitos T CD3CD8 totales, vírgenes y memoria a partir de sangre total. (A). Resultados totales en porcentaje (%) de la expresión *ex vivo* de la CD127 en las diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD8 (B) y en promedio de la intensidad de fluorescencia (MFI). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método t de Student para datos no pareados ($p < 0,05$) vs control.

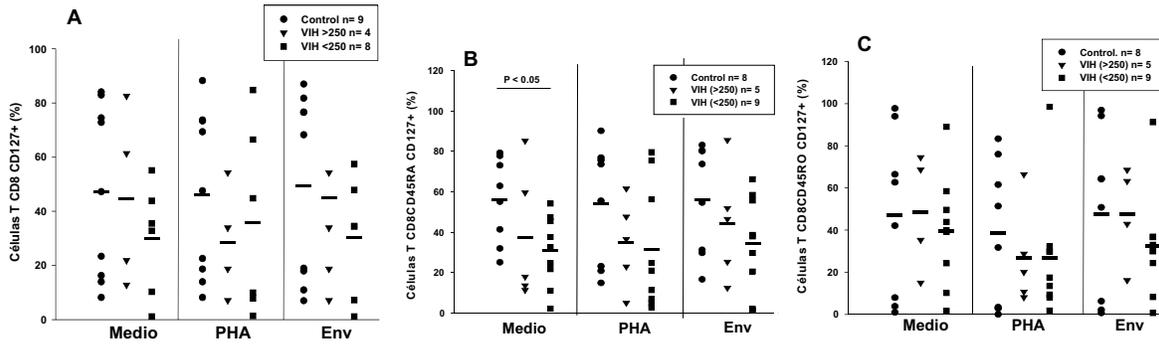


Fig. 4. Cuantificación de la expresión *in vitro* de CD127 en linfocitos T CD8. Se determinó la expresión *in vitro* de la molécula CD127 en linfocitos T CD3CD8 totales (A), vírgenes (B) y memoria (C) de los diferentes grupos experimentales (controles, voluntarios sanos; CD4 >250, pacientes VIH+ con más de 250 células T CD4/ μ L sangre; CD4 < 250, pacientes con menos de 250 células T CD4/ μ L sangre), en presencia de diferentes condiciones de estímulos (PHA 5 μ g/mL y Env 1 μ g/mL) con 72 horas de cultivo de PBMC. Los resultados fueron obtenidos mediante la adquisición de 10.000 eventos, cuyas barras representan el promedio \pm desviación estándar. Las diferencias en los promedios fueron comparados por el método t de Student para datos no pareados ($p < 0,05$) vs control.

tosis con respecto al control ($P < 0,01$). Igualmente, cuando se estimularon las células T CD8 con péptidos virales Env se produjo un aumento de la apoptosis, en este caso inducida, en ambos grupos de pacientes infectados. Este aumento fue estadísticamente significativo con respecto al grupo de pacientes con menos células CD4 en sangre ($P < 0,05$). Sin embargo, estos valores no fueron mayores que los encontrados para la apoptosis espontánea. Finalmente, en presencia de PHA, se evidenció un ligero aumento de la apoptosis inducida con respecto al control. Este no fue estadísticamente significativo.

La capacidad proliferativa específica de linfocitos T CD8 está afectada en la infección por VIH. Se estudió la capacidad de proliferación de los linfocitos T CD8, incluyendo a las subpoblaciones vírgenes y de memoria, en ausencia o en presencia de estímulos (PHA y Env) mediante la medición de la incorporación de BrdU. Se midió por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-BrdU-FITC. En la Fig. 6, podemos observar que los linfocitos T CD8 totales de ambos grupos de pacientes infectados perdieron parcialmente su capacidad de proli-

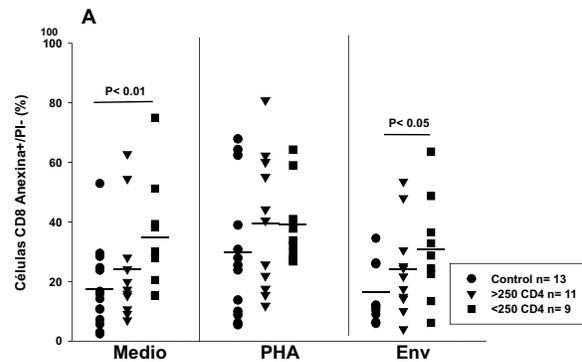


Fig. 5. Apoptosis de Linfocitos T CD8. Se determinó la apoptosis de linfocitos T CD8 en presencia de diferentes estímulos, PHA 5 μ g/mL y Env 1 μ g/mL después de 72 horas de cultivo de PBMC. Los diferentes grupos estudiados fueron: (controles, voluntarios sanos; CD4 > 250, pacientes VIH+ con más de 250 células T CD4/ μ L sangre; CD4 < 250, pacientes con menos de 250 células T CD4/ μ L sangre). La medición se realizó a través del marcaje con annexina V y yoduro de propidio que fue analizada por citometría de flujo. El promedio está representado con una barra de color negro y la dispersión de los resultados representada por cada símbolo. Las diferencias en la media fueron comparadas por el método t de Student para datos no pareados ($p < 0,05$).

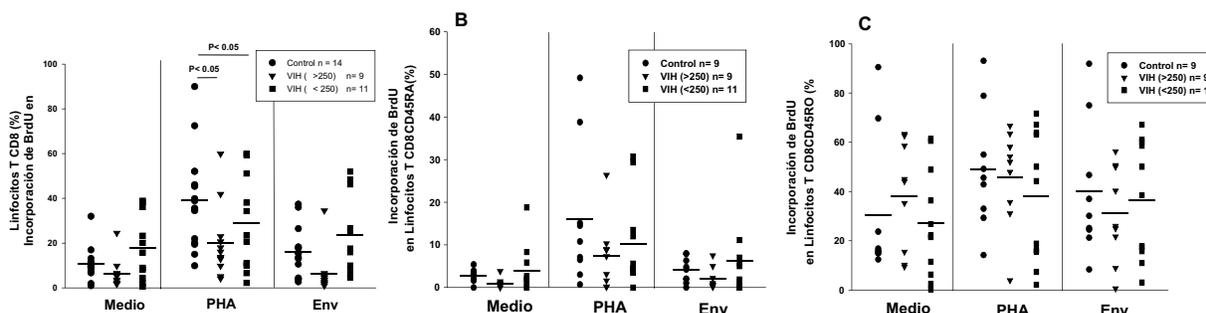


Fig. 6. Proliferación de Linfocitos T CD8. Se determinó la proliferación de linfocitos T CD8 totales (A), vírgenes (B) y memoria (C) en presencia de diferentes estímulos PHA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Env 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ después de 72 horas de cultivo de PBMC, a través de la medición de la incorporación de Bromodeoxiuridina (BrdU), gracias a un anticuerpo monoclonal anti-BrdU-FITC que fue analizada por citometría de flujo. El promedio está representado con una barra de color negro y la dispersión de los resultados está representada por cada símbolo. Las diferencias en la media fueron comparadas por el método T de Student para datos no pareados ($p < 0,05$).

feración, en presencia del mitógeno PHA, el cual es capaz de producir una mayor proliferación en las células del grupo control ($P < 0.05$). En presencia de antígenos específicos del VIH, estas células no fueron capaces de proliferar, obteniéndose valores similares a los del grupo control (Fig 6A). De igual forma, cuando se estudiaron las subpoblaciones vírgenes y de memoria, se observó una disminución de la proliferación pero ésta no fue estadísticamente significativa al compararla con el grupo control (Figs. 6B y 6C).

DISCUSIÓN

La respuesta celular de los linfocitos T CD8 juega un papel esencial en la habilidad de los individuos infectados con el VIH para controlar la replicación viral (5, 44), donde el balance de señales positivas y negativas moduladas por citocinas y por sus receptores en estas células parece ser crítico para su homeostasis y por ende, para el destino último de esta respuesta celular (4). En este sentido, en el presente trabajo estudiamos la expresión *ex vivo* e *in vitro* de receptores de muerte (CD95/Fas) y de supervivencia (CD127) en linfocitos T CD8 totales,

vírgenes y de memoria de pacientes infectados con el VIH, así como la capacidad de proliferación específica y la frecuencia de apoptosis espontánea e inducida que presentaban estas células en presencia de antígenos de la envoltura viral (Env). Los resultados muestran claramente una alteración en la expresión *ex vivo* e *in vitro* de ambos tipos de receptores, además de una respuesta proliferativa deficiente y una alta frecuencia de apoptosis espontánea e inducida por estimulación antigénica, siendo mayores estos cambios en los pacientes con menores concentraciones sanguíneas de linfocitos T CD4 ($\text{CD4} < 250$), sugiriendo que durante el transcurso de la infección por el VIH se producen numerosos y profundos cambios en los mecanismos homeostáticos y funcionalidad de los linfocitos T CD8 que pudiesen llevar a la fase de SIDA de la enfermedad.

Cuando se estudiaron las proporciones de las subpoblaciones linfocitarias sanguíneas en diferentes grupos, los resultados muestran que los dos grupos de pacientes infectados presentan cambios importantes con respecto al grupo control, destacando una disminución de los linfocitos T CD4 en ambos grupos, y un aumento de los linfoci-

tos T CD8 totales, vírgenes y de memoria en el grupo de pacientes con mayor cantidad de linfocitos T CD4 en sangre ($CD4 > 250/\mu L$), mientras que en los pacientes con niveles más bajos de linfocitos T CD4 sanguíneo ($CD4 < 250/\mu L$) presentaron una disminución de estos linfocitos T CD8 y de sus subpoblaciones respectivas. Estos resultados sugieren que a medida que transcurre la infección, comienza a ocurrir una pérdida de linfocitos T CD8 en las etapas más avanzadas. Hecho que es confirmado con las correlaciones positivas que encontramos entre el número de linfocitos T CD4 sanguíneos y los niveles sanguíneos de linfocitos T CD8 vírgenes y de memoria (datos no mostrados). Es decir, a medida que van disminuyendo los linfocitos T CD4 en sangre durante la infección, lo cual se utiliza como un indicador del progreso de la infección, se van perdiendo las células T CD8 vírgenes y memoria en estos pacientes.

Existen numerosas evidencias de que la infección VIH produce pérdida de los linfocitos T CD8 y que ésta está asociada a la progresión de la enfermedad (45-47). Se ha encontrado que en todas las etapas de la infección, principalmente en las iniciales, predomina una cepa del virus denominada R5, que es mucho menos agresiva que otra cepa, denominada X4, la cual comienza a predominar en las fases finales de la enfermedad y ha sido propuesta como un agente causal de la fase de SIDA (48). Además, se ha observado que los linfocitos T CD8 son más susceptibles a su destrucción por cepas X4 del VIH (4, 14).

Por otra parte, se han propuesto numerosos mecanismos relacionados con la apoptosis para explicar también la pérdida de los linfocitos T CD8 en la infección VIH: apoptosis espontánea, apoptosis inducida por activación (AICD) por CD95/Fas, por los receptores TNFR1 y TNFR2 (4, 45, 49-52) y recientemente, se ha descrito una nueva vía que involucra la molécula PD-1, la

cual induce una fuerte apoptosis en las células T CD8 (19, 23). En nuestro caso, se pudo observar un aumento en la expresión *ex vivo* de CD95/Fas en la superficie de linfocitos T CD8 totales y vírgenes de los pacientes. Este aumento fue estadísticamente significativo con respecto a los individuos sanos en los pacientes con menos linfocitos T CD4 sanguíneos ($CD4 < 250/\mu L$). Asimismo, cuando se estudió la expresión de esta molécula en ausencia o en presencia de antígenos virales (Env), se pudo observar que los niveles de linfocitos T CD8 totales de los pacientes se encontraban elevados, siendo este efecto mayor en los pacientes con menos CD4 sanguíneos ($CD4 < 250/\mu L$). Estos altos valores en la expresión de CD95/Fas en estas condiciones de cultivo coincidieron con altos porcentajes de apoptosis. Efectivamente, se observó que los linfocitos T CD8 totales de ambos grupos de pacientes infectados presentaban una alta frecuencia de apoptosis espontánea, en donde los valores más altos se encontraron en el grupo de pacientes con menos linfocitos T CD4 sanguíneos. Estos resultados sugieren que la inducción de la muerte por apoptosis sea el resultado del aumento de la expresión de CD95/Fas. En efecto, se conoce que la unión de su ligando, FasL sobre el receptor (CD95/Fas) induce apoptosis por vía de la activación de las caspasas en linfocitos T CD8 (53). Sin embargo, el hecho de que no encontramos correlación alguna entre la expresión *in vitro* de CD95/Fas en los linfocitos T CD8 totales con la sensibilidad para la apoptosis espontánea e inducida antigénicamente (datos no mostrados), sugiere la posibilidad que una alta expresión de CD95/Fas no sea responsable exclusivamente de una alta frecuencia de apoptosis en estas células. Trabajos anteriores en la infección VIH (53) y en la infección SIV (54) confirman esta hipótesis. Estos autores sugieren que la alta frecuencia de apoptosis encontrada no depende de la alta expresión

de CD95/Fas, sino posiblemente se deba a daños de la señalización intracelular de la vía CD95/Fas o defectos en la maquinaria antiapoptótica intrínseca de los linfocitos T CD8 específicos al VIH.

En este orden de ideas, se ha encontrado que el aumento de la sensibilidad para la apoptosis en linfocitos T CD8 es específico a la infección con VIH. Pacientes co-infectados con VIH/CMV, presentan linfocitos T CD8 específicos al VIH mucho más sensibles a la inducción de la muerte celular a través del receptor CD95/Fas que los linfocitos T CD8 específicos al CMV (53). Además, se ha demostrado que los linfocitos T CD8 anti-VIH presentan bajos niveles intracelulares de la proteína anti-apoptótica Bel-2 y son incapaces de sobreexpresar la molécula anti-apoptótica Bel-xL, hechos que son contrarios en los linfocitos T CD8 anti-CMV (18).

Otro de los mecanismos propuesto para explicar la pérdida de los linfocitos T CD8 durante la infección VIH, es la reducción de la expresión en la superficie celular de la sub-unidad alfa del receptor para la citocina IL-7 (CD127) (8, 9, 43, 55), la cual juega un papel muy importante en la supervivencia de los linfocitos T (37). Cuando cuantificamos la expresión *ex vivo* de este receptor en la superficie de los linfocitos T CD8 totales, vírgenes y de memoria, pudimos observar que existe una reducción significativa de la expresión, especialmente en el grupo de los pacientes con menos linfocitos T CD4 en sangre con respecto a los individuos seronegativos. Se pudo observar que esta disminución de la expresión *ex vivo* de la CD127 en los linfocitos T CD8 totales no depende de los niveles plasmáticos de linfocitos T CD4 ni de CD8 (datos no mostrados), sugiriendo que las causas son otras, lo cual requiere de estudios posteriores para profundizar en este aspecto.

Otro hecho interesante de nuestros resultados es que se pudo constatar que la ex-

presión más baja de CD127 se encontraba en los linfocitos T CD8 vírgenes, coincidiendo con una cantidad reducida de esta subpoblación en sangre en esta cohorte de pacientes. Esto sugiere que la CD127 pudiese estar jugando un papel en la supervivencia de estas células. Se ha demostrado que la IL-7 es capaz de aumentar la supervivencia de los linfocitos T y su proliferación regulada (29-31), induciendo la síntesis de la proteína antiapoptótica Bel-2 (32,33).

En el caso de los linfocitos T CD8 de memoria, nuestro trabajo se limitó a estudiar la expresión de CD127 en células T CD8 de memoria totales, ya que la discriminación por marcadores de superficie abarcó solamente la expresión de CD45RO. Sin embargo, podemos decir que esta subpoblación presenta un defecto notable en la expresión de esta molécula. Estos resultados coinciden con los de la literatura (8, 9, 21-23, 42, 43). Así mismo, se ha encontrado que la subpoblación efectora de los linfocitos T CD8 expresa una reducción marcada de la expresión de este receptor simultáneamente con un incremento en los niveles plasmáticos de IL-7 (42, 43, 56). Esto sugiere la posibilidad de que la baja expresión del receptor se deba a un mecanismo de autorregulación por la alta concentración plasmática de su citocina, la cual se encuentra aumentada en estos pacientes infectados como un posible mecanismo de compensación por la pérdida de linfocitos que se observa durante el progreso de la enfermedad. No obstante, recientemente, se ha podido evidenciar que el defecto puede radicar en una alteración en los mecanismos de regulación del receptor por la presencia de la infección VIH, independientemente de la presencia o ausencia de la IL-7 (20, 23), y se ha propuesto que la carga viral esté asociada con la disfunción del receptor CD127.

En relación a los resultados obtenidos en la expresión *in vitro* de la CD127, se

pudo observar nuevamente que los pacientes con niveles sanguíneos más bajos de CD4 ($CD4 < 250/\mu L$) presentaban una disminución en dicha expresión en todas las poblaciones de linfocitos T CD8, especialmente en la subpoblación vírgenes, y esto condiciones de estimulación o no, sugiriendo que las poblaciones vírgenes son más susceptibles a presentar este defecto durante el curso de la infección.

Cada día cobra más fuerza la importancia que tiene la IL-7 en la inmunopatología del VIH. Se conoce que la IL-7 es capaz de inducir la producción de Bcl-2 y Bcl-xL (33, 41) y que una alteración de su receptor puede ocasionar que sus efectos sean defectuosos. En este orden de ideas, Colle y col. (57), realizando incubaciones de linfocitos T CD4 y CD8 de pacientes infectados con VIH, con o sin tratamiento antiretroviral con IL-7, pudieron constatar un mayor aumento de la producción intracelular de Bcl-2 y de la capacidad proliferativa de linfocitos T en los pacientes tratados con HAART que presentaban un mayor conteo de linfocitos T CD4 plasmáticos ($CD4 > 400$) en relación a los pacientes tratados pero con una menor recuperación en el conteo de estas células ($CD4 < 250$) o con respecto a pacientes no tratados. Estos resultados indican que la recuperación en la expresión del receptor CD127 en los linfocitos T puede ocasionar que la IL-7 pueda ejercer mejor sus efectos, por lo que la recuperación inmunológica pueda ser mayor en los pacientes bajo terapia antiretroviral. Todos estos resultados indican el enorme potencial que presenta el uso de la IL-7 conjuntamente con la terapia antirretroviral para la recuperación de la homeostasis y funcionalidad de los linfocitos T en estos pacientes.

Finalmente, al estudiar la capacidad proliferativa de los linfocitos T CD8 y de sus subpoblaciones, encontramos que está par-

cialmente perdida en los linfocitos T CD8 totales de ambos grupos de pacientes, evidenciándose en los bajos valores de proliferación en presencia de PHA con respecto a los valores del grupo control. Sin embargo, encontramos que su capacidad de proliferación específica al VIH estaba perdida totalmente para los antígenos utilizados en este estudio, debido a que los valores de proliferación fueron similares a los del grupo control en presencia de antígenos Env. La pérdida de esta función ya ha sido descrita anteriormente (21). Sin embargo, es interesante destacar que a pesar de que los pacientes con mayor número de linfocitos CD4 en sangre ($CD4 > 250/\mu L$) presentaron alteraciones menos acentuadas en la expresión de los receptores estudiados, sus linfocitos T CD8 presentaron una capacidad proliferativa menor, similar a la del grupo de pacientes con menos linfocitos T CD4 sanguíneos. Esto sugiere que la pérdida de los clones de linfocitos T CD8 contra estos antígenos (Env) ocurrió antes que ocurrieran cambios drásticos en el receptor CD127. Recientemente, se han reportado interesantes resultados sobre el papel que está jugando la PD-1 sobre la supervivencia, proliferación y capacidad de producción de citocinas en linfocitos T CD8 en la infección por VIH (19, 20), en donde los autores han demostrado que esta molécula influye en forma negativa en estas funciones de los linfocitos T CD8 cuando está expresada altamente sobre la superficie de estas células, hecho que ocurre en la infección por VIH (20). Al bloquear esta molécula con anticuerpos específicos, ocasiona una recuperación en su supervivencia, en su capacidad proliferativa y en menor grado en su producción de IFN- γ y TNF- α . Este nuevo mecanismo abre grandes perspectivas sobre la comprensión de los fenómenos que afectan a la homeostasis de los linfocitos T CD8 durante la infección por VIH.

En conclusión, nuestros resultados demuestran una alteración simultánea en la expresión de receptores de muerte y de supervivencia en los linfocitos T CD8 en pacientes infectados con VIH, la cual, a medida de que avanza más la infección, es más exacerbada, ocasionando un desequilibrio en la homeostasis de los linfocitos T CD8, en su capacidad proliferativa y en su sensibilidad para la apoptosis. Estos hechos pueden ser causas para el progreso de la infección hacia etapas más graves de la enfermedad.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo recibió apoyo financiero de la Universidad Central de Venezuela a través de los proyectos N° 09.11.5191.03 y N° 09.11.5424-2004.

REFERENCIAS

1. Walker CM, Moody DJ, Stites DP, Levy JA. CD8+ lymphocytes can control HIV infection in vitro by suppressing virus replication. *Science* 1986; 234:1563-1566.
2. Walker BD, Chakrabarti S, Moss B, Paradis TJ, Flynn T, Durno AG, Blumberg RS, Kaplan JC, Hirsch MS, Schooley RT. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 1987; 328:345-348.
3. Plata F, Autran B, Martins LP, Wain-Hobson S, Raphael M, Mayaud C, Denis M, Guillon JM, Debre P. AIDS virus-specific cytotoxic T lymphocytes in lung disorders. *Nature* 1987; 328:348-351.
4. Pantaleo G, Demarest JF, Soudeyns H, Graziosi C, Denis F, Adelsberger JW, Borrow P, Saag MS, Shaw GM, Sekaly RP, and et al. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 1994; 370:463-467.
5. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994; 68:4650-4655.
6. Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, Segal JP, Cao Y, Rowland-Jone, SL, Cerundolo V, Hurley A, Markowitz M, Ho DD, Nixon DF, McMichael AJ. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 1998; 279: 2103-2106.
7. Cao Y, Qin L, Zhang L, Safrit J, Ho DD. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 1995; 332:201-208.
8. Oxenius A, Price DA, Hersberger M, Schlaepfer E, Weber R, Weber M, Kundig TM, Boni J, Joller H, Phillips RE, Flepp M, Opravil M, Speck RF. HIV-specific cellular immune response is inversely correlated with disease progression as defined by decline of CD4+ T cells in relation to HIV RNA load. *J Infect Dis* 2004; 189: 1199-1208.
9. Oxenius A, Price DA, Trkola A, Edwards C, Gostick E, Zhang HT, Easterbrook PJ, Tun T, Johnson A, Waters A, Holmes EC, Phillips RE. Loss of viral control in early HIV-1 infection is temporally associated with sequential escape from CD8+ T cell responses and decrease in HIV-1-specific CD4+ and CD8+ T cell frequencies. *J Infect Dis* 2004; 190:713-721.
10. Barouch DH, Kunstman J, Kuroda MJ, Schmitz JE, Santra S, Peyerl FW, Krivulka, GR, Beaudry K, Lifton MA, Gorgone DA, Montefiori DC, Lewis MG, Wolinsky SM, Letvin NL. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 2002; 415: 335-339.
11. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med* 1997; 3:205-211.
12. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit

- JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 1999; 189: 991-998.
13. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P, Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* 1999; 283:857-860.
 14. Blanco J, Barretina J, Cabrera C, Gutierrez A, Clotet B, Este JA. CD4(+) and CD8(+) T cell death during human immunodeficiency virus infection in vitro. *Virology* 2001; 285:356-365.
 15. Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1998; 391: 397-401.
 16. Goulder PJ, Sewell AK, Lalloo DG, Price DA, Whelan JA, Evans J, Taylor GP, Luzzi G, Giangrande P, Phillips RE, McMichael AJ. Patterns of immunodominance in HIV-1-specific cytotoxic T lymphocyte responses in two human histocompatibility leukocyte antigens (HLA)-identical siblings with HLA-A*0201 are influenced by epitope mutation. *J Exp Med* 1997; 185: 1423-1433.
 17. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 1998; 188: 2205-2213.
 18. Petrovas C, Mueller YM, Dimitriou ID, Bojezuk PM, Mounzer KC, Witek J, Altman JD, Katsikis PD. HIV-specific CD8+ T cells exhibit markedly reduced levels of Bcl-2 and Bcl-xL. *J Immunol* 2004; 172:4444-4453.
 19. Petrovas C, Casazza JP, Brenchley JM, Price DA, Gostick E, Adams WC, Precopio ML, Schacker T, Roederer M, Douek DC, Koup RA. PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. *J Exp Med* 2006; 203:2281-2292.
 20. Trautmann L, Janbazian L, Chomont N, Said EA, Gimmig S, Bessette B, Boulassel MR, Delwart E, Sepulveda H, Balderas RS, Routy JP, Haddad EK, Sekaly RP. Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat Med* 2006; 12:1198-1202.
 21. Tanchot C, Lemonnier FA, Perarnau B, Freitas AA, Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science* 1997; 276:2057-2062.
 22. Tough DF, Sprent J. Turnover of naive and memory-phenotype T cells. *J Exp Med* 1994; 179:1127-1135.
 23. Tough DF, Sprent J. Lifespan of lymphocytes. *Immunol Res* 1995; 14:1-12.
 24. Bruno L, von Boehmer H, Kirberg J. Cell division in the compartment of naive and memory T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1996; 26:3179-3184.
 25. Kassiotis G, Garcia S, Simpson E, Stockinger B. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol* 2002; 3:244-250.
 26. Murali-Krishna K, Lau LL, Sambhara S, Lemonnier F, Altman J, Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 1999; 286:1377-1381.
 27. Swain SL, Hu H, Huston G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 1999; 286:1381-1383.
 28. Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, Surh CD. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:8732-8737.
 29. Khaled AR, Durum SK. Lymphocyte: cytokines and the control of lymphoid homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 817-830.
 30. Lenz DC, Kurz SK, Lemmens E, Schoenberger SP, Sprent J, Oldstone MB, Homann D. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral

- CD4+T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:9357-9362.
31. **Seddon B, Tomlinson P, Zamoyska R.** Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 2003; 4:680-686.
 32. **Akashi K, Kondo M, von Freeden-Jeffrey U, Murray R, Weissman IL.** Bel-2 rescues T lymphopoiesis in interleukin-7 receptor-deficient mice. *Cell* 1997; 89:1033-1041.
 33. **Maraskovsky E, O'Reilly LA, Teepe M, Corcoran LM, Peschon JJ, Strasser A.** Bel-2 can rescue T lymphocyte development in interleukin-7 receptor-deficient mice but not in mutant rag-1^{-/-} mice. *Cell* 1997; 89: 1011-1019.
 34. **Fry TJ, Mackall CL.** Interleukin-7: from bench to clinic. *Blood* 2002; 99:3892-3904.
 35. **Dardalhon V, Jaleco S, Kinet S, Herpers B, Steinberg M, Ferrand C, Froger D, Leveau C, Tiberghien P, Charneau P, Noraz N, Taylor N.** IL-7 differentially regulates cell cycle progression and HIV-1-based vector infection in neonatal and adult CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9277-9282.
 36. **Kovanen PE, Leonard WJ.** Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev* 2004; 202:67-83.
 37. **Hellerstein MK, McCune JM.** T cell turnover in HIV-1 disease. *Immunity* 1997; 7:583-589.
 38. **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.
 39. **Napolitano LA, Grant RM, Deeks SG, Schmidt D, De Rosa SC, Herzenberg LA, Herndier BG, Andersson J, McCune JM.** Increased production of IL-7 accompanies HIV-1-mediated T-cell depletion: implications for T-cell homeostasis. *Nat Med* 2001; 7:73-79.
 40. **Read SW, Higgins J, Metcalf JA, Stevens RA, Rupert A, Nason MC, Lane HC, Sereti I.** Decreased CD127 expression on T Cells in HIV-1-infected adults receiving antiretroviral therapy with or without intermittent IL-2 therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42:537-544.
 41. **MacPherson PA, Fex C, Sanchez-Dardon J, Hawley-Foss N, Angel JB.** Interleukin-7 receptor expression on CD8(+) T cells is reduced in HIV infection and partially restored with effective antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 28:454-457.
 42. **Paiardini M, Cervasi B, Albrecht H, Muthukumar A, Dunham R, Gordon S, Radziejewicz H, Piedimonte G, Magnani M, Montroni M, Kaech SM, Weintrob A, Altman JD, Sodora DL, Feinberg MB, Silvestri G.** Loss of CD127 expression defines an expansion of effector CD8+ T cells in HIV-infected individuals. *J Immunol* 2005; 174: 2900-2909.
 43. **Vingerhoets J, Bisalinkumi E, Penne G, Colebunders R, Bosmans E, Kestens L, Vanham G.** Altered receptor expression and decreased sensitivity of T-cells to the stimulatory cytokines IL-2, IL-7 and IL-12 in HIV infection. *Immunol Lett* 1998; 61:53-61.
 44. **Klein MR, van Baalen CA, Holwerda AM, Kerkhof-Garde SR, Bende RJ, Keet IP, Eeftink-Schattenkerk JK, Osterhaus AD, Schuitemaker H, Miedema F.** Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med* 1995; 181:1365-1372.
 45. **Estaquier J, Idziorek T, Zou W, Emilie D, Farber CM, Bourez JM, Ameisen JC.** T helper type 1/T helper type 2 cytokines and T cell death: preventive effect of interleukin 12 on activation-induced and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of CD4+ T cells from human immunodeficiency virus-infected persons. *J Exp Med* 1995; 182:1759-1767.
 46. **Katsikis PD, Wunderlich ES, Smith CA, Herzenberg LA.** Fas antigen stimulation induces marked apoptosis of T lymphocytes in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Exp Med* 1995; 181: 2029-2036.

47. **Moretti S, Marcellini S, Boschini A, Famularo G, Santini G, Alesse E, Steinberg SM, Cifone MG, Kroemer G, De Simone C.** Apoptosis and apoptosis-associated perturbations of peripheral blood lymphocytes during HIV infection: comparison between AIDS patients and asymptomatic long-term non-progressors. *Clin Exp Immunol* 2000; 122:364-373.
48. **Glushakova S, Grivel JC, Fitzgerald W, Sylwester A, Zimmerberg J, Margolis LB.** Evidence for the HIV-1 phenotype switch as a causal factor in acquired immunodeficiency. *Nat Med* 1998; 4:346-349.
49. **de Oliveira Pinto LM, Garcia S, Lecoeur H, Rapp C, Gougeon ML.** Increased sensitivity of T lymphocytes to tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1)- and TNFR2-mediated apoptosis in HIV infection: relation to expression of Bel-2 and active caspase-8 and caspase-3. *Blood* 2002; 99:1666-1675.
50. **Gougeon ML, Garcia S, Heeney J, Tschopp R, Lecoeur H, Guetard D, Rame V, Dauguet C, Montagnier L.** Programmed cell death in AIDS-related HIV and SIV infections. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9:553-563.
51. **Lelievre JD, Petit F, Arnoult D, Ameisen JC, Estaquier J.** Interleukin 7 increases human immunodeficiency virus type 1 LAI-mediated Fas-induced T-cell death. *J Virol* 2005; 79: 3195-3199.
52. **Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F.** Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992; 257:217-219.
53. **Mueller YM, De Rosa SC, Hutton JA, Witek J, Roederer M, Altman JD, Katsikis PD.** Increased CD95/Fas-induced apoptosis of HIV-specific CD8(+) T cells. *Immunity* 2001; 15:871-882.
54. **Arnoult D, Petit F, Lelievre JD, Lecossier D, Hance A, Monceaux V, Hurtrel B, Ho Tsong-Fang R, Ameisen JC, Estaquier J.** Caspase-dependent and -independent T-cell death pathways in pathogenic simian immunodeficiency virus infection: relationship to disease progression. *Cell Death Differ* 2003; 10:1240-1252.
55. **Boutboul F, Puthier D, Appay V, Pelle O, Ait-Mohand H, Combadiere B, Carcelain G, Katlama C, Rowland-Jones SL, Debre P, Nguyen C, Autran B.** Modulation of interleukin-7 receptor expression characterizes differentiation of CD8 T cells specific for HIV, EBV and CMV. *AIDS* 2005; 19:1981-1986.
56. **Colle JH, Moreau JL, Fontanet A, Lambotte O, Joussemet M, Jacod S, Delfraissy JF, Theze J.** Regulatory dysfunction of the interleukin-7 receptor in CD4 and CD8 lymphocytes from HIV-infected patients –effects of antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42:277-285.
57. **Colle JH, Moreau JL, Fontanet A, Lambotte O, Joussemet M, Delfraissy JF, Theze J.** CD127 expression and regulation are altered in the memory CD8 T cells of HIV-infected patients-reversal by highly active anti-retroviral therapy (HAART). *Clin Exp Immunol* 2006; 143:398-403.