

Coexpresión de CD4 y CD8 en linfocitos de sangre periférica en pacientes positivos para VIH

Peripheral blood lymphocyte CD4 and CD8 co-expression in HIV positive patients

Alberto Gómez^{1,2}, Claudia González¹, Luz Mabel Ávila^{1,3}, María Consuelo Casas¹, Santiago Padilla¹

Resumen

Objetivo. La coexpresión en membrana de las moléculas CD4 y CD8 en leucocitos de sangre periférica se halla generalmente restringida a casos de leucemias agudas T prolinfocíticas o de leucemias T del adulto y no representa más de 3% a 5% de los linfocitos T periféricos. En este trabajo buscamos establecer la frecuencia de elevación de los linfocitos CD4⁺CD8⁺ de la totalidad de las muestras de pacientes remitidos para tipificación al Instituto de Referencia Andino en el año 2007.

Diseño. Se hizo la tipificación de 1.883 subpoblaciones de linfocitos T de individuos diferentes y, luego, se procedió a la revisión retrospectiva de los resultados que correspondían a la totalidad de los análisis del 2007 en nuestro instituto. Además, se tabularon 142 muestras recibidas en enero de 2008 con el fin de determinar valores de referencia para la población estudiada.

Metodología. Las muestras de sangre total se marcaron con anticuerpos monoclonales fluorescentes utilizando el reactivo *Cyto-Stat® triCHROME™* CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 y, luego, se procesaron en un citómetro Epics XL-MCL.

Resultados. El análisis de los pacientes tipificados en 2007 reveló la existencia de dos individuos (0,11%) en los que se presentó el fenómeno de aumento de la coexpresión en membrana de las moléculas CD4 y CD8.

Conclusiones. El hallazgo de este fenotipo linfocitario en sangre periférica de pacientes no leucémicos debe alertar a los laboratorios que tipifican aisladamente los linfocitos CD4⁺ sin evaluar los marcadores CD3 y CD8, puesto que podrían estar sobreestimando los recuentos y porcentajes reales de células CD4⁺CD8⁺.

Correspondencia:

Alberto Gómez Gutiérrez, Ph.D., Unidad de Diagnóstico Molecular, Instituto de Referencia Andino, S.A., Calle 13 N° 60-49, Bogotá, D.C., Colombia.

Correo electrónico: agg@iralabs.com

Fecha de recepción: 3/4/2008

Fecha de aceptación: 7/11/2008

1 Instituto de Referencia Andino, Bogotá, D.C., Colombia

2 Instituto de Genética Humana, Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

3 Servicio de Reumatología, Hospital Militar Central, Bogotá, D.C., Colombia

en la sangre periférica de sus pacientes y subestimando una subpoblación de linfocitos que es infrecuente, pero que se ha reportado como funcional y diferenciada en una variedad de infecciones y modelos experimentales.

Palabras clave: linfocitos CD4+, linfocitos CD8+, linfocitos CD4+CD8+, VIH

Abstract

Objective: Membrane co-expression of CD4 and CD8 molecules in peripheral blood leukocytes is usually restricted to acute polymphocytic T cell leukemia or adult T cell leukemias, and it does not represent more than 3-5% of peripheral T lymphocytes in non-leukemic patients. The aim of this work was to define the frequency of CD4⁺CD8⁺ lymphocytes among all the patient samples received at a reference laboratory in Colombia during 2007.

Design: A total of 1,883 different samples were typed for T cell subpopulations in 2007, and the corresponding results were reviewed. Additionally, 142 samples received and typed in January 2008 were tabulated in order to establish reference values.

Materials and methods: Whole blood samples were labeled with fluorescent monoclonal antibodies using the Cyto-Stat® triCHROME™ CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 reagent and thereafter processed in an Epics XL-MCL cytometer.

Results: The review of all of the patients analysed in 2007 revealed the existence of 2 individuals (0.11%) in which we found high levels of CD4⁺CD8⁺ membrane co-expression.

Conclusions: The finding of this rare lymphocytic phenotype in peripheral blood of

non-leukemic patients should alert the laboratories that in typing CD4⁺ lymphocytes alone and not evaluating CD3 and CD8 markers, they might be overestimating the real percentages of CD4⁺CD8⁻ cells on some patients, as well as underestimating an uncommon lymphocyte subpopulation that has been characterized as functionally distinct in a variety of infections and experimental models.

Key words: CD4⁺ lymphocytes, CD8⁺ lymphocytes, CD4⁺CD8⁺ lymphocytes, HIV

Introducción

Clásicamente se ha considerado que los linfocitos T diferenciados en sangre periférica se dividen en dos grandes subpoblaciones de acuerdo con la expresión mutuamente excluyente de los marcadores de membrana CD4 o CD8. En estos términos, se ha desestimado la posibilidad de encontrar subpoblaciones periféricas que expresen simultáneamente CD4 y CD8, hasta el punto de considerarlas aberrantes cuando se hallan por encima de 3% a 5% *in vivo* ^(1, 2, 3) y éstas se asocian usualmente a síndromes linfoproliferativos ^(4, 5, 6, 7). Sin embargo, algunos investigadores han reportado, tanto en modelos animales como en el humano, una elevada coexpresión de estas dos moléculas en células diferenciadas y funcionales tanto en individuos sanos como en enfermedades no linfoproliferativas ^(8, 5, 9, 10, 11, 12, 13).

Los primeros reportes que referían la posibilidad de coexpresión CD4⁺CD8⁺, lo hicieron de manera indirecta por la infección de células CD8 por parte del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ⁽¹⁴⁾, o bien por efecto de la coestimulación *in vitro* de linfocitos CD8 vírgenes ^(15, 16, 17). Reportes recientes han explorado la fisiología de la coexpresión CD4⁺CD8⁺, asociándola a una eventual potenciación de

la respuesta inmune antiviral (18-20). Por otra parte, se ha estimado que las subpoblaciones diferenciadas y funcionales CD4⁺CD8⁺, en cuanto no expresan el marcador tímico CD1a, podrían constituir a su vez un grupo heterogéneo de células T, de acuerdo con los niveles de expresión, tanto de CD4 como de CD8, con dos tipos predominantes: CD4^{bajo/tenue}CD8^{alto/brillante} y CD4^{alto/brillante}CD8^{bajo/tenue} (21). La caracterización fenotípica de las células CD4^{bajo/tenue}CD8^{alto/brillante} circulantes ha demostrado que se trata de células activadas de acuerdo con la expresión de los marcadores CD25, CD69, CD38, CD95, CD28 y CD45RO, y a la secreción de citocinas tales como IL-4, IFN- γ y FTLN- (13).

Aunque la coexpresión CD4⁺CD8⁺ se ha puesto en evidencia en diferentes infecciones virales, y dado que la expresión de CD4 es crítica en la patogénesis del VIH, se ha considerado que la expresión de esta molécula en la membrana de las células CD8 sería un factor determinante de la susceptibilidad a una eventual inmunodeficiencia, y ésta dependería de la expresión de la molécula CXCR4 (17). Además del estudio de la carga viral, la tipificación de las subpoblaciones CD4 y CD8 se ha definido como criterio de referencia para el seguimiento de la infección con el VIH y también para hacerle seguimiento al tratamiento antirretroviral en los pacientes infectados (22).

La cuantificación de la subpoblación CD4 en sangre periférica se basa en la marcación de las células de la muestra con anticuerpos monoclonales fluorescentes específicos de la molécula CD4 y en su contraste con células CD8 marcadas a su vez con anticuerpos monoclonales fluorescentes específicos de la molécula CD8. Se estima que el porcentaje de células que coexpresan CD4 y CD8 no incide en el cálculo final de la proporción de cada una de las subpoblaciones por separado, a pesar de que

se ha reportado hasta 5% de células CD4⁺CD8⁺ en sangre periférica de individuos sanos (1). Sin embargo, otros reportes han establecido expansiones persistentes de células T CD4⁺CD8⁺ que pueden conformar desde 10% hasta 70% de los linfocitos T totales en sangre periférica, particularmente en individuos que presentan un amplio espectro de enfermedades aparentemente no relacionadas entre sí (3, 4).

En el presente artículo reportamos el hallazgo de dos pacientes seropositivos para VIH que mostraron altos niveles de coexpresión CD4⁺CD8⁺ y proponemos su posible interpretación.

Metodología

Muestras. De cada paciente se recibieron 10 ml de sangre total en EDTA, analizados en los laboratorios remitentes de diferentes ciudades del país, con las usuales precauciones de la fase preanalítica requeridas por el Instituto de Referencia Andino, S. A. Ambas poblaciones de pacientes remitidos a nuestro laboratorio, tanto los 1.883 analizados en 2007, como los 142 analizados en enero de 2008, fueron ingresadas como constituidas por pacientes colombianos de origen mestizo.

Tipificación de subpoblaciones linfocitarias. Las muestras de sangre total se marcaron utilizando el reactivo *Cyto-Stat® triCHROME™* CD8-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) y, luego, se procesaron en un citómetro Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Fullerton, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, como sigue: se incubaron 100 μ l de sangre EDTA con el anticuerpo monoclonal durante 15 minutos, después de lisis con el reactivo Optilyse C (Beckman Coulter, Brea, California), se agregó solución tampón PBS pH 7,2, y se procedió a su análisis en el citómetro. El análisis se efectuó con el programa

System II para Epics-XL versión 3.0 sobre un total de 5.000 linfocitos. La población de linfocitos se delimitó con los parámetros FS y SS buscando una clara diferenciación de detritos celulares mediante la fijación del umbral y de la demarcación de la región de análisis.

Resultados

Al hacer la revisión de 1.883 tipificaciones de subpoblaciones linfocitarias efectuadas en el Instituto de Referencia Andino en el año 2007, de las cuales 66,9% provenían de hombres y 33,1% de mujeres, se encontraron dos casos de pacientes masculinos con porcentajes de coexpresión CD4⁺CD8⁺ superiores a los valores de referencia aceptados de 0% a 5% (tabla 1).

Estos dos casos correspondían a pacientes que presentaron una leucopenia moderada y fueron seropositivos para VIH. Ninguno de los pacientes tuvo seguimiento de otros marcadores de la infección por habitar en lugares distantes de los laboratorios en donde fueron atendidos, respectivamente, en el departamento de Cundinamarca y en el departamento del Valle del Cauca. Los laboratorios que los atendieron remitieron la muestra de sangre anticoagulada en EDTA al Instituto de Referencia Andino en Bogotá controlando cui-

dadosamente la fase preanalítica. Al encontrar los elevados porcentajes de células CD4⁺CD8⁺, se procedió a repetir el marcaje monoclonal y la lectura en el citómetro, confirmando el mismo tipo de resultado tres veces consecutivas, mientras que todas las demás muestras procesadas en el mismo día arrojaron valores por debajo de 1% de coexpresión CD4⁺CD8⁺.

Se procedió a revisar los valores de referencia para las células CD4⁺CD8⁺ en nuestro laboratorio con la misma tecnología y reactivos utilizados en los dos casos reportados, tomando como base la totalidad de las solicitudes de subpoblaciones de linfocitos T recibidas en enero de 2008, las cuales ascendieron a 142 pacientes (tabla 2). En éstos se encontró un rango de 0,04% a 1,57% de células CD3⁺CD4⁺CD8⁺ con un promedio de 0,32% de este fenotipo celular (figuras 1 y 2), lo cual coincidió con lo reportado en la literatura y confirmó lo excepcional de los dos casos que presentaron cifras superiores a 40% en la subpoblación CD4⁺CD8⁺. El promedio de la subpoblación CD4⁺ en los 142 pacientes fue de 18,9% y el de la subpoblación CD8⁺ fue de 46,3% con un promedio total de células CD3⁺ de 69,2%, muy cercano a la suma de los promedios de células CD4⁺ y CD8⁺ de 65,2%. Por el contrario, el promedio de células CD4⁺ y de

Tabla 1. Cuantificación de subpoblaciones CD3, CD4 y CD8 en dos pacientes positivos para VIH que presentaron elevación en la subpoblación CD3⁺CD4⁺CD8⁺ por encima de los valores de referencia

No.	Paciente	Sexo	Células CD3+ /ul	CD3+ (%)	CD3+ CD4+ (%)	CD3+CD8+ (%)	CD3+ CD4+CD8+ (%)	Células CD3+ CD4+CD8+ /ul	Células CD3+ CD4+CD8+ /ul
1	6XXX66	M	505	68,3	58,3	49,7	40,9	302,41	431,06
2	6XXX26	M	1.201	61,4	76,6	54,6	47,1	921,29	1.498,32

células CD8⁺ en los dos pacientes analizados fue de 67,5% y de 52,5% con un promedio total de células CD3⁺ de 64,5%, muy distante de la suma aritmética de los promedios de células CD4⁺ y CD8⁺ en estos casos, que fue de 120%.

De las 142 muestras remitidas a nuestro laboratorio en enero de 2008, 62% incluía en las órdenes de proceso un diagnóstico preliminar y 38% venía sin diagnóstico de origen. Entre los 88 diagnósticos presuntivos asociados a cada una de las muestras, se incluían los siguientes: 55 seropositivos para VIH, 28 con enfermedad retroviral y 5 casos únicos cada uno con uno de los diagnósticos de tratamiento antirretroviral, inmunodeficiencia, inmunosupresión, alergia y accidente cerebrovascular.

Al evaluar los resultados según estos diagnósticos presuntivos, no fue posible asociar la

tendencia a la elevación de los porcentajes de la subpoblación CD4⁺CD8⁺ a ninguna de las condiciones en particular, ya que todas estuvieron por debajo de 1,6%, con un promedio de 0,53% (tabla 3). Los casos excepcionales reportados en este trabajo corresponden a dos individuos seropositivos para VIH y, en comparación con éstos, ninguno de los 55 seropositivos restantes presentó la tendencia a la elevación de los porcentajes de coexpresión CD4⁺CD8⁺, presentando un promedio de 0,32% de células CD4⁺CD8⁺ por microlitro, igual al promedio global de los 142 pacientes investigados en enero de 2008, con un máximo de 1,57% y un mínimo de 0,06% de células CD4⁺CD8⁺, y con un máximo de 25,84 y un mínimo de 0,36 células CD3⁺CD4⁺CD8⁺, si se estiman la totalidad de células T CD3 que presentaron coexpresión CD4⁺CD8⁺ por cada microlitro de sangre periférica.

Tabla 2. Frecuencia de subpoblaciones T en sangre periférica de 142 pacientes del Instituto de Referencia Andino

No.	Sexo	(%)	Células CD3 ⁺ /ul	CD3 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%)	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ (%)	Células CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ /ul	Células CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻ /ul
95	M	66,9	1.564,19	69,35	18,22	47,15	0,31	6,98	393
47	F	33,1	1.287,83	68,67	20,37	44,45	0,36	6,68	440
	Promedio		1.472,72	69,13	18,93	46,26	0,32	6,88	424,54
	Máximos		3.969	89,3	50,2	81,2	1,57	39,94	2.136
	Mínimos		161	19,1	1,6	12,9	0,04	0,36	8
						DE	0,26	6,37	346,63
						Coefficiente de variación	0,04	1,05	57,01

DE: desviación estándar

Tabla 3. Promedio de subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con diferentes diagnósticos presuntivos

No. Pa- cientes	Células CD3+/ul	CD3+ (%)	CD3+CD4+ -	CD3+CD8+ (%)	CD3+ CD4+CD8+ (%)	Células CD3+ CD4+CD8- / ul	Células CD3+ CD4+CD8+ /ul	Diagnóstico presuntivo
1	804	54,5	20,9	27,8	0,34	308,32	5,02	Alergias
1	3.969	48,5	26,1	17,7	0,08	2135,89	6,55	Inmunodeficiencia
1	161	19,1	5,5	12,9	0,16	46,36	1,35	Inmunosupresión
1	407	52,2	37,6	13,9	0,53	293,16	4,13	Secuelas de accidente cerebrovascular
1	1.441	56,1	9,6	42,8	0,17	246,59	4,37	Tratamiento antirretroviral
28	1.685,1	70,6	21,3	44,7	0,39	509,16	8,51	Enfermedad retroviral
54	1.544,9	69,7	17,9	48,1	0,3	396,58	7,29	Sin diagnóstico
55	1.304,4	69,9	18,6	47,3	0,32	347,63	5,89	Seropositivo VIH
142	1.414,54	55,07	19,69	31,91	0,29	535,46	5,39	Total

Figura 1. Número de células CD3+CD4+CD8+ por microlitro de sangre periférica en 142 pacientes remitidos al Instituto de Referencia Andino en enero de 2008

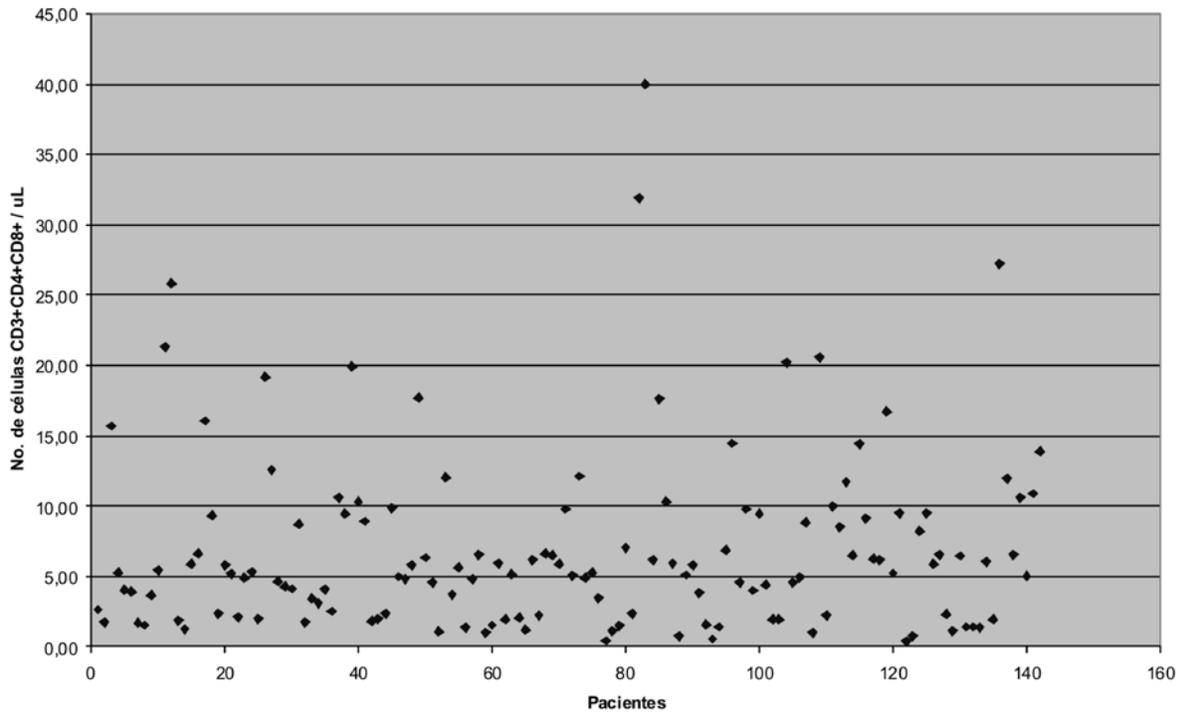
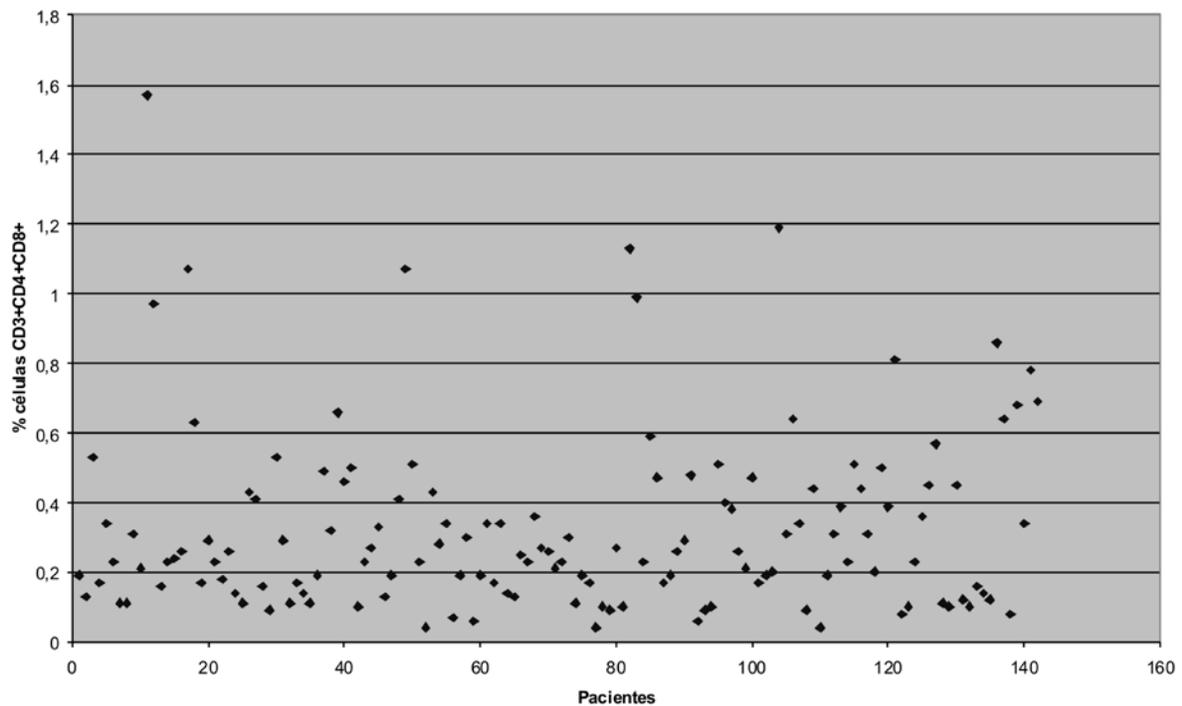


Figura 2. Porcentaje de células CD3+CD4+CD8+ en sangre periférica de 142 pacientes remitidos al Instituto de Referencia Andino en enero de 2008



Discusión

El destino final de la diferenciación de los linajes de los linfocitos T en sangre periférica se ha considerado clásicamente como excluyente en función de la expresión de los marcadores de membrana CD4 y CD8. Sin embargo, está claro que esta diferenciación mutuamente excluyente parte en todos los casos de poblaciones de timocitos doblemente positivos CD4⁺CD8⁺. El papel de la restricción del estímulo del receptor T mediante las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad autólogas, tanto como el rol de algunas citocinas, como la IL-7, han sido postulados como determinantes en este proceso de diferenciación ⁽²³⁾. Una de las particularidades de este proceso es la existencia de fenotipos intermedios doblemente positivos que pueden revertir, bien a CD4 o bien a CD8, en función de influencias microambientales que inciden en el silenciamiento o en la transcripción de las moléculas CD4 y CD8 en cada célula. Sin embargo, este proceso, característico del timo, es inusual en sangre periférica.

La revisión de los resultados de 1.883 solicitudes de subpoblaciones linfocitarias T recibidas y tipificadas en el Instituto de Referencia Andino en el año 2007, reveló la existencia de dos pacientes (0,11%) en los que se presentó el fenómeno de la coexpresión en membrana de las moléculas CD4 y CD8 por encima del umbral de referencia. Si bien en la literatura se había reportado este fenotipo en sangre periférica, principalmente en casos de infección viral, no hay antecedentes en la literatura colombiana ni en otros laboratorios nacionales consultados sobre este tipo de anomalía. La coexpresión de estas moléculas de membrana se halla usualmente restringida a casos de leucemias agudas T prolinfocíticas o a algunos casos de leucemias T del adulto.

Una explicación posible de este fenómeno en el caso de los pacientes que nos ocupan, es que las muestras se hubieran degradado y que éstas absorbieran de manera inespecífica los anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8. Sin embargo, las tasas de mortalidad en estos dos pacientes eran semejantes a otras muestras y los restos celulares fueron descartados del análisis al seleccionar la ventana correspondiente a células viables en el dispersograma correspondiente. Su integridad se aseguró al observar una clara demarcación entre la población linfocitaria analizada y los detritos celulares que se observaban claramente en el área bajo la población estudiada en la gráfica emitida por el citómetro. Estos detritos fueron sistemáticamente eliminados del análisis. Otra posibilidad es que los pacientes evaluados presentaran una neoplasia hematológica concomitante, lo cual no fue reportado por los clínicos remitentes.

Ahora bien, teniendo en cuenta que en pacientes que expresan simultáneamente las moléculas CD4 y CD8 en la membrana de células periféricas, es difícil concluir sobre el número total de cada subpoblación y, en particular, sobre los correspondientes porcentajes de linfocitos CD3⁺CD4⁺CD8⁻ en pacientes que expresan simultáneamente las moléculas CD4 y CD8 en la membrana de células periféricas. Además, en la medida en que no hay claridad sobre la funcionalidad de las células CD4⁺CD8⁺ en pacientes con VIH, si no se aclara en el reporte que algunas células presentan este tipo de coexpresión por encima de los valores considerados normales, alrededor de 5% del total de células CD3⁺, al reportar simplemente las células CD4⁺ se podría estar sobrestimando la cantidad real de células CD4⁺CD8⁻. Por lo tanto, es importante evaluar los tres marcadores (CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺) para identificar aquellos pacientes que presentan esta característica y así alertar al clínico. Nuestro hallazgo de este

fenotipo linfocitario en sangre periférica de pacientes que presentaban una virosis, debe alertar a los laboratorios que solamente tipifican los linfocitos CD4⁺ y no evalúan los marcadores CD3 y CD8.

Finalmente, desde el punto de vista clínico, debe atenderse a la particularidad de la coexpresión de las moléculas CD4⁺ y CD8⁺ en membrana, puesto que podrían estar asociadas a condiciones específicas de la respuesta inmune con eventuales implicaciones para su pronóstico y tratamiento. Desde el punto de vista fisiológico, la expansión de poblaciones linfocitarias que coexpresan CD4 y CD8 puede corresponder, tal y como lo muestran algunos de los trabajos preliminares citados, a un fenotipo funcional en respuesta al estímulo viral que no debe ser pasado por alto y debe ser explorado con mayor profundidad.

Financiación

El presente trabajo fue financiado por el Instituto de Referencia Andino, S.A.

Referencias

- Blue ML, Daley JF, Levine H, Schlossman SF. Coexpression of T4 and T8 on peripheral blood T cells demonstrated by two-color fluorescence flow cytometry. *J Immunol.* 1985;134:2281-6.
- Schlesinger I, Rabinowitz R, Brenner T, Abramsky O, Schlesinger M. Changes in lymphocyte subsets in myasthenia gravis: correlation with level of antibodies to acetylcholine receptor and age of patient. *Neurology.* 1992;42:2153-7.
- Ortolani C, Forti E, Radin E, Cibin R, Cossarizza A. Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4⁺, CD8⁺) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191:601-9.
- Sala P, Tonutti E, Feruglio C, Florian F, Colombatti A. Persistent expansions of CD4⁺CD8⁺ peripheral blood T cells. *Blood.* 1993;82:1073-7.
- Nah EH, King DE, Fiona EC. CD4 and CD8 antigen coexpression: a flow cytometric study of peripheral blood, bone marrow, body fluid, and solid lymphoreticular specimens. *Arch Path Lab Med.* 1997;121:381-4.
- Kim YJ, Hwang ES, Kim IH, Yu DS. CD4/CD8 double positive, acute type of adult T-cell leukemia/lymphoma with extensive cutaneous involvement. *Int J Dermatol.* 2006;45:1193-5.
- Skriptenova S, Salama M. Mature T-cell leukemia/lymphoma with CD4 CD8 double-positive Sézary cells and extensive cutaneous involvement. *Arch Path Lab Med.* 2007;131:1428.
- Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology.* 1996;87:500-12.
- Ober BT, Summerfield A, Mattlinger C, Wiesmüller KH, Jung G, Pfaff E, et al. Vaccine-induced, pseudorabies virus-specific, extrathymic CD4⁺CD8⁺ memory T-helper cells in swine. *J Virol.* 1998;72:4866-73.
- Nam K, Akari H, Terao K, Shibata H, Kawamura S, Yoshikawa Y. Peripheral blood extrathymic CD4(+)CD8(+) T cells with high cytotoxic activity are from the same lineage as CD4(+)CD8(-) T cells in cynomolgus monkeys. *Int Immunol.* 2000;12:1095-103.
- Sullivan YB, Landay AL, Zack JA, Kitchen SG, Al-Harthi L. Upregulation of CD4 on CD8⁺ T cells: CD4^{dim}CD8^{bright} T cells constitute an activated phenotype of CD8⁺ T cells. *Immunology.* 2001;103:270-80.
- Jiménez E, Sacedon R, Vicente A, Hernández-Loópez C, Zapata AG, Varas A. Rat peripheral CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol.* 2002;168:5005-13.
- Zloza A, Sullivan YB, Connick E, Landay AL, Al-Harthi L. CD8⁺ T cells that express CD4 on their surface (CD4^{dim}CD8^{bright} T cells) recognize an antigen-specific target, are detected *in vivo*, and can be productively infected by T-tropic HIV. *Blood.* 2003;102:2156-64.
- Yang LP, Riley JL, Carroll RG, June C, Hoxie J, Patterson BK, et al. Productive infection of neonatal CD8⁺ T lymphocytes by HIV-1. *J Exp Med.* 1998;187:1139-44.
- Flamand L, Crowley RW, Lusso P, Colombini-Hatch S, Margolis DM, Gallo RC. Activation of CD8⁺ T lymphocytes through the T cell receptor turns on CD4 gene expression: implications for HIV pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:3111-16.
- Kitchen SG, Korin YD, Roth MD, Landay A, Zack JA. Costimulation of naïve CD8(+) lymphocytes induces CD4 expression and allows human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* 1998;72:9054-60.
- Kitchen SG, LaForge S, Patel VP, Kitchen CM, Miceli MC, Zack JA. Activation of CD8 T cells induces expression of CD4 which functions as a chemotactic receptor. *Blood.* 2002;99:207-12.

18. Kitchen SG, Jones NR, LaForge S, Whitmire JK, Vu BA, Galic Z, *et al.* CD4 on CD8(+) T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:8727-32.

19. Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood.* 2004;104:478-86.

20. Kitchen SG, Whitmire JK, Jones NR, Galic Z, Kitchen CM, Ahmed R, *et al.* The CD4 molecule on CD8+ T lymphocytes directly enhances the immune response to viral and cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:3794-99.

21. Zloza A, Al-Harhi L. Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. *J Leukocyte Biol.* 2006;79:4-6.

22. DiazGranados CA, Álvarez C, Prada G, Sarmiento C, Martínez F, *et al.* Guía para el manejo de VIH/SIDA basada en la evidencia. Bogotá: Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia y Fedesalud; 2005. p. 59-69.

23. Singer A, Adoro S, Jung-Hyun P. Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4 *versus* CD8 lineage choice. *Nature Rev Immunol.* 2008;8:788-801.